

005622ef 16



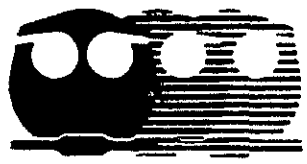
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACTIVIDAD DE BOMBEO DE H+ POR LA ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMATICA EN EMBRIONES DE MAIZ DURANTE LA GERMINACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN: MAESTRIA EN CIENCIAS ( B I O Q U I M I C A ) P R E S E N T A : LUIS TONATIHUT SANCHEZ LINARES



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

25 9665



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: Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou.  
Vocal: Dr. Edgardo Escamilla Marván.  
Secretario: Dr. Blas Lotina Hensen.  
1er. Suplente: Dr. Rafael Moreno Sánchez.  
2o. Suplente: Dr. Luis Vaca Domínguez.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab. 101. Departamento de Bioquímica Vegetal  
División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM

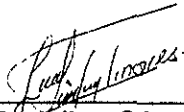
Asesor del Tema:



---

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante:



---

Luis Tonátihut Sánchez Linares

Este proyecto fue financiado por CONACyT (4836-N9406) y parcialmente por DGAPA.UNAM (IN204097). El sustentante fue becario de CONACyT con el No. de registro 94689.

# AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química.

**Al CONACyT**

Por el apoyo recibido durante  
el desarrollo de este trabajo.

**Al Comité Tutorial** integrado por:

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Dra. Irma Bernal Lugo

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Por su orientación y aportaciones  
durante el desarrollo experimental.

**Al Jurado Revisor**

Por las oportunas observaciones  
en el contenido de este trabajo.

**A la M. en C. Sobeida Sánchez Nieto**

Por compartir su entusiasmo y disposición,  
así como por la revisión crítica del escrito.

**A la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo**

Por el apoyo técnico.

**A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz.**

Por su interés y gran apoyo en la formación y superación  
académica de sus alumnos. Particularmente, por la confianza y la  
oportunidad que me ha dado de acercarme más a este mundo de  
preguntas y modelos.

**Al Dr. Rafael Moreno Sánchez.**

Por su amable ayuda en facilitarme el equipo necesario para el  
trabajo experimental. Por su confianza.

A mis compañeras de laboratorio: **Sobeida, Chelo, Nora y Andrea**, por  
soportarme tantas locuras y hacer de este tiempo compartido una grata  
experiencia. En especial a **Manuela**, por que a pesar de sus múltiples  
ocupaciones ha tenido la ocasión de permitirme compartir dudas, esperanzas,  
proyectos, pequeños logros y uno que otro plantón.

GRACIAS ☺

*“Los griegos habían comprendido la potencia misteriosa de este interior de las cosas. Ellos nos han legado una de las más bellas palabras de nuestra lengua, la palabra entusiasmo, un dios interior. La grandeza de las acciones humanas se mide con la inspiración que las hace nacer. Dichoso el que lleva en sí un dios interior, un ideal y le obedece. Esas son las fuentes vivas de las grandes acciones. Todas se iluminan con reflejos del infinito”.*

*Louis Pasteur.*

## ABREVIATURAS

$\Delta$ pH.	Gradiente transmembranal de pH.
ABA.	Ácido abscísico.
ACMA.	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina.
ATP.	Adenosin trifosfato.
Brig-58.	Polietilen-20-cetil éter.
BSA.	Albúmnina de suero bovino.
BTP.	1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano.
CCCP.	Carbonilcianuro-3-cloro-fenilhidrazona.
DTE.	Ditioeritol.
DTT.	Ditiotreitol.
EDTA.	Etilendiamino tetraácetico.
EGTA.	Etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'tetraacético.
H-N.	Fracción de homogenado sin núcleos.
IAA.	Ácido Indolacético.
MES.	Ácido 2-[N-morfolino]etansulfónico.
MOPS.	Ácido 3-[N-morfolino]propansulfónico.
SDS.	Dodecil sulfato de sodio.
SMP.	Partículas submitocondriales.
TLCK.	1,1-dicloro-3,4-tosilamido-7-amino-3-hetanona-HCl.
TPCK.	1,1-dicloro-3,4-tosilamido-4,2-hepanona.
TRIS.	2-amino-2-(hidroximetil)propan-1,3-diol.
U.F.	Unidades de fluorescencia.
U <sub>1</sub> .	Fase superior de un primer reparto de fases.
VMP.	Vesículas de membrana plasmática.

# INDICE

RESUMEN.	.1
INTRODUCCIÓN.	.3
1. Estructura y Función de las Semillas..	.3
2. El Proceso de Germinación.	.5
2.1. Imbibición.	
2.2. Fases de la Germinación.	
2.3. Metabolismo del Proceso de Germinación.	
2.4. Hormonas en el proceso de Germinación.	
3. Crecimiento Celular.	.11
3.1. Teoría de Crecimiento Ácido.	
3.2. Acidificación, Elongación y Pared Celular.	
4. Organización y Función de las Membranas Biológicas.	.14
4.1. Transporte a través de las Membrana Biológicas.	
5. Sistemas de Transporte en Plantas.	.18
6. ATPasa de H <sup>+</sup> de la Membrana Plasmática de Plantas.	.22
6.1. Características Bioquímicas.	
6.2 <i>Mecanismo Cinético.</i>	
6.3 Estructura y Mecanismo Molecular.	
6.4 Fisiología y Regulación.	
OBJETIVO E HIPÓTESIS..	.32
MATERIALES Y MÉTODOS.	.33
1. Material biológico.	.33
2. Imbibición de embriones.	.33
3. Determinación del porcentaje de germinación y acumulación de peso húmedo.	.33
4. Preparación de vesículas enriquecidas en membrana plasmática de embriones de maíz en germinación.	.34
5. Actividad de hidrólisis de ATP.	.35
6. Cuantificación de fosfato inorgánico.	.36
7. Actividad de acidificación por VMP.	.36
8. <i>Curva estándar de apagamiento de fluorescencia.</i>	.37
9. Determinación de proteína.	.38
RESULTADOS.	.39
1. Determinación del porcentaje de germinación y curva de imbibición de embriones de maíz de la línea H-355.	.39
2. Obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP) mediante reparto de fases acuosas.	.41
3. Actividad de hidrólisis de ATP.	.43

4. Actividad de acidificación en VMP por bombeo de H <sup>+</sup> . . . . .	44
5. Actividad de ATPasa en vesículas de membrana plasmática aisladas de embriones de maíz embebidos a diferentes tiempos. . . . .	.54
ANÁLISIS DE RESULTADOS. . . . .	.59
Alcance Experimental.	
CONCLUSIONES. . . . .	.68
APÉNDICE A.	
Aislamiento de membrana plasmática por partición en fases acuosas. . . . .	.69
APÉNDICE B.	
Cuantificación del $\Delta$ pH transmembranal. . . . .	.72
BIBLIOGRAFÍA. . . . .	.75



## RESUMEN

El proceso de germinación de una semilla consiste en la adsorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento. Aunque la germinación empieza con la entrada de agua, se requieren de otros factores integrados y regulados en varios procesos metabólicos y fisiológicos.

Durante la germinación se ha observado un cambio morfológico de las células que es su alargamiento, dado solamente por el aumento en volumen. Puesto que las células vegetales están rodeadas por la pared celular, la elongación requiere del estiramiento plástico de la pared celular. Se ha observado que la acidificación del espacio apoplástico conlleva una desrigidificación de la pared celular.

Por otro lado, el desarrollo de la presión de turgor es un factor que induce la elongación celular, forzando a la pared celular y a la membrana plasmática a expandirse. La translocación de solutos, como iones, aminoácidos y carbohidratos, mantiene el potencial osmótico interno de la célula más negativo que fuera de ella, de forma que la presión de turgor no se pierda. Asimismo, estos solutos sustentarán el crecimiento de la célula al ser asimilados como sustratos metabólicos.

Por lo que, durante el proceso de germinación de una semilla, el crecimiento y la elongación celular son determinantes. Dos son los eventos que están asociados a la elongación de una célula vegetal:

- i) desrigidización de la pared celular, que facilita el aumento de volumen de la célula y es promovido por la acidificación del espacio apoplástico, y
- ii) translocación de solutos al interior de la célula para mantener el potencial osmótico y proveer de los nutrientes necesarios para el posterior crecimiento celular.

Está bien documentado que la ATPasa de  $H^+$  favorece ambos procesos, por lo tanto, esta enzima de la membrana plasmática puede estar involucrada en el proceso de germinación en aquellas fases en las que existe elongación celular. Esta enzima bombea protones hacia el espacio apoplástico, acoplado este transporte a la hidrólisis de ATP. La diferencia transmembranal del potencial electroquímico de protones así generado, produce la acidificación del apoplasto y además representa la fuerza motriz para la movilización de solutos por medio de los transportadores secundarios.

Durante el desarrollo de este proyecto, se han establecido los tiempos de germinación para los embriones de la línea de maíz híbrido H-355; precisando el periodo en el que existe elongación celular, la cual ocurre entre las 12 y 18 horas de imbibición.

Posteriormente a la optimización de la obtención de vesículas de membrana plasmática por la técnica de reparto en fases acuosas, hemos aislado vesículas de membrana plasmática de los embriones embebidos a diferentes tiempos (6, 12, 18 y 24 horas) con el propósito de observar el perfil de actividad de la ATPasa de  $H^+$  durante la germinación.

La actividad ha sido medida tanto por la hidrólisis de ATP por medio de la cuantificación del fosfato inorgánico liberado, como por el bombeo de protones a través de la acidificación en las vesículas de acuerdo al apagamiento de la fluorescencia de ACMA.

El perfil de la actividad de hidrólisis de ATP en la vesículas de los embriones embebidos a diferentes tiempos, mostró un incremento de actividad a las 18 horas, el cual fue paralelo al tiempo en el cual se inició la protusión de la radícula. La actividad de bombeo de protones también mostró el mismo patrón de actividad temporal durante la imbibición.

Esta asociación entre la actividad de la enzima y la elongación celular sugiere la participación de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática en las fases de la germinación en las que se presenta elongación celular.

## INTRODUCCION

### 1. Estructura y Función de las semillas.

La semilla es una estructura en reposo. Por lo general está en un estado deshidratado, y consecuentemente los procesos metabólicos están suspendidos o tienen lugar muy lentamente. La semilla está en una condición de vida latente, debido principalmente a la carencia de agua [15]. Las semillas proceden de los primordios o rudimentos seminales de la flor, una vez fecundados y maduros [124]. Después de la maduración y la caída de los frutos, la semilla generalmente entra en letargo por un tiempo más o menos largo. Esto quiere decir que aunque se le humedezca y se le den las condiciones que favorezcan la germinación, esta no se produce en cierto periodo. El letargo se debe a la formación de sustancias inhibitorias de la germinación, a la carencia de las sustancias estimulantes necesarias (que más tarde suministrará el embrión), o a la resistencia mecánica que proporciona la testa de la semilla a la entrada de agua y de oxígeno. El letargo se rompe luego de que la semilla se sujeta a varias condiciones ambientales que pueden incluir un prolongado periodo de frío intenso, condiciones de humedad en presencia de oxígeno (estratificación), calor intenso (incluso fuego), paso a través del intestino de aves o mamíferos, abrasión física (escarificación) o ataque por hongos [15].

La semilla consta esencialmente de un embrión (formado por un eje embrionario y uno o varios cotiledones), una provisión de reservas nutritivas, que puede almacenarse en un tejido especializado (albúmen o endospermo) o en el propio embrión, y una cubierta seminal o pericarpio, que recubre y protege a ambos [124].

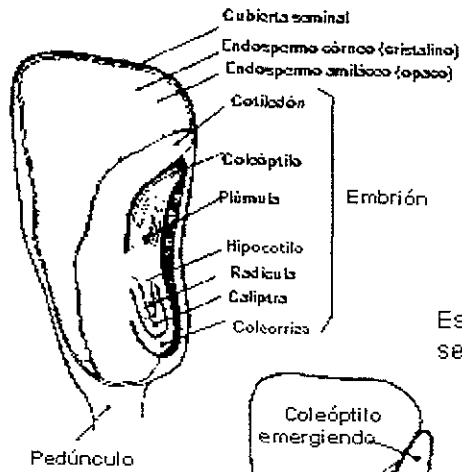
Consideremos en breve cada uno de los componentes de la semilla, los cuales pueden ser identificados en la Figura 1 para el caso de maíz:

#### *Embrión.*

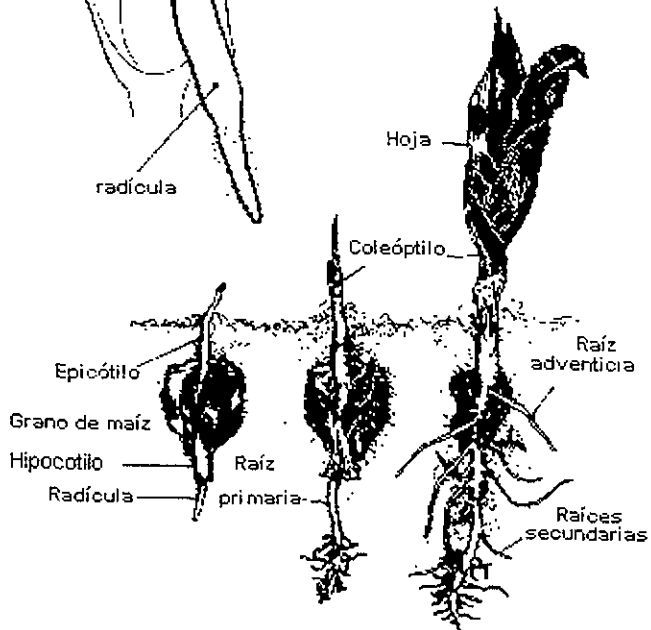
El embrión consiste del eje embrionario, junto con uno, dos o más cotiledones (monocotiledones, dicotiledones y gimnospermas, respectivamente). El eje embrionario está compuesto del hipocotilo, al cual se encuentran unidos los cotiledones, la radícula (que es difícil de delinear a partir del hipocotilo) y raramente el mesocotilo (un internodo entre los cotiledones). Estas estructuras son generalmente fáciles de distinguir en un embrión de dicotiledóneas, pero difíciles en el caso de monocotiledóneas [13].

#### *Pericarpio.*

Su importancia fisiológica surge a partir de la presencia de la cutícula externa e interna, a menudo grasosa o encerada, y una o más capas de gruesas células protectoras. Estas características confieren al pericarpio cierto grado de impermeabilidad al agua y/o gases, incluyendo oxígeno; así que consecuentemente ejerce una influencia reguladora sobre el metabolismo y crecimiento de los tejidos y órganos internos de la semilla [13].



**Figura.1**  
 Estructura y germinación de una semilla de maíz. Tomada de [15]



### *Endospermo.*

Las semillas pueden clasificarse como endospérmicas y no endospérmicas, en relación a la presencia o ausencia en la semilla madura de un endospermo definido. Aunque el endospermo esté presente, algunas semillas no son consideradas como endospérmicas; ya sea por que el tejido esté destruído y es solo un remanente del que se formó durante el desarrollo, o bien porque el tejido es de sólo unas capas celulares. En estos casos, son otras estructuras, usualmente los cotiledones, los principales órganos de almacenamiento. Para las semillas con un endospermo grande, es esta la principal reserva en la semilla madura [14].

En los cereales y algunas leguminosas endospérmicas, la mayoría de las células están muertas en la madurez, y es el contenido citoplásmico que ha sido ocluido el que sustenta el desarrollo del embrión. Sin embargo, en el exterior del endospermo permanece un tejido vivo, la capa de aleurona, que si bien no almacena reservas, sí es el responsable de la producción de enzimas hidrolíticas para su movilización.

La semilla es, en general, la fase de la vida de la planta que está mejor adaptada para resistir las condiciones ambientales adversas. Su función es la de dar lugar a un nuevo individuo, perpetuando y multiplicando la especie a la que pertenece, por lo que la semilla es, además, uno de los elementos más eficaces de dispersión de la especie, tanto en el tiempo como en el espacio [124].

La maduración de la semilla puede definirse morfológicamente como el desarrollo completo de las distintas estructuras que la constituyen y frecuentemente está asociada con la deshidratación de los diferentes tejidos que la forman. Fisiológicamente, la madurez de la semilla implica la pérdida de sustancias inhibitorias de la germinación, ó la acumulación de sustancias promotoras; en general supone reajustes en el equilibrio hormonal de la semilla y/o en la sensibilidad de sus tejidos para las distintas sustancias activas [124].

Cuando las condiciones de temperatura, humedad y aereación son las adecuadas, la semilla germinará dando origen, tras una serie de acontecimientos metabólicos, a una plántula. En tanto no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un periodo variable, que puede ser muy largo, hasta que llegado un momento pierde su capacidad para germinar. La longevidad de la semilla (tiempo durante el cual mantiene su viabilidad o capacidad para germinar) depende de la especie y de las condiciones de conservación.

## 2. El Proceso de Germinación.

Como unidad de reproducción sexual por excelencia en las plantas superiores, la semilla es la encargada de propagar y dispersar la especie. La recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla con la finalidad de formar una nueva planta, constituye precisamente el proceso de germinación. El proceso de germinación comienza con la rehidratación de los diferentes tejidos que constituyen la semilla y termina con el inicio del crecimiento de la radícula.

Como regla práctica, se considera que una semilla ha germinado cuando su radícula atraviesa la cubierta seminal. En el caso de embriones desnudos, la germinación estaría indicada por el inicio de la elongación de la radícula [15,124].

Tras la rehidratación de la semilla, aumenta considerablemente la actividad específica de numerosas enzimas relacionadas directamente con el proceso de germinación. La germinación es en realidad el resultado de una serie de acontecimientos metabólicos que van sucediéndose de forma escalonada desde la absorción de agua por parte de la semilla, hasta que se inicia el crecimiento de la radícula.

## 2.1. Imbibición.

Como primer evento hacia la germinación, la toma de agua es esencial en el proceso. La cantidad total de agua tomada durante la imbibición es generalmente poca y puede no exceder dos o tres veces el peso seco de la semilla.

Junto con la ósmosis, la imbibición puede considerarse un tipo especial de difusión, ya que el movimiento de agua se hace por medio de un gradiente de potencial químico de agua. Sin embargo, en la imbibición se involucra un adsorbente y se requieren dos condiciones [43,138]:

- i) Debe existir un gradiente de potencial químico de agua entre la superficie del adsorbente y el líquido en el que se está imbibiendo.
- ii) Debe existir cierta afinidad entre los componentes del adsorbente y la sustancia embebida.

El potencial hídrico ( $\Psi$ ) es una expresión del estado energético del agua, como componente en una solución. Ocurre un proceso de difusión de agua, entre dos fases que difieran en este potencial, desde la fase de mayor potencial a la de menor (por ejemplo de agua pura a una solución acuosa) [14].

El potencial hídrico en una célula de semilla puede expresarse de la siguiente manera:

$$\Psi_{\text{cell}} = \Psi_{\pi} + \Psi_c + \Psi_p$$

$\Psi_{\pi}$  - Potencial Osmótico. La concentración de solutos presentes en la célula determina el potencial osmótico. A mayor concentración, menor es el potencial osmótico del agua, y por tanto mayor el gradiente de potencial en el que difunde el agua.

$\Psi_c$  - Componente matricial. Esta contribución se debe a las propiedades adsorbentes del tejido y su capacidad de retener agua. En particular, las células y tejidos de plantas poseen una cantidad considerable de celulosa y almidón, por los que el agua tiene gran afinidad. La adsorción de agua sobre los coloides hidrofílicos es de gran importancia en el proceso de imbibición.

$\Psi_p$  - Potencial de presión (turgor). Se debe a la fuerza ejercida sobre la pared celular desde el interior de la célula, a causa de la entrada de agua a la célula. Puesto que esta fuerza tiene un sentido opuesto a la dos anteriores, se le asigna un valor positivo.

El suelo tiene su propio potencial hídrico, y es la diferencia de potencial de agua entre el suelo y la semilla lo que determina la disponibilidad y velocidad del flujo de agua hacia la semilla. Existen algunos otros factores que determinan la disponibilidad de agua a las semillas, como son la conductividad hidráulica del suelo, el grado de contacto entre el suelo y la semilla, la textura y compactación del suelo. Bajo condiciones óptimas de suministro, la toma de agua por la semilla tiene un patrón trifásico en el tiempo.

## 2.2. Fases de la Germinación.

Normalmente se distinguen en el proceso de germinación tres fases sucesivas [5,14,124], las cuales se esquematizan en la Figura 2.

### *i) Fase de hidratación.*

Debido a un alto  $\Psi_c$  la fase I es principalmente una consecuencia de las fuerzas matriciales y por tanto corresponde a una intensa absorción de agua por los distintos tejidos que forman la semilla. Con ello ocurre la hidratación y reactivación de las moléculas y organelos preexistentes, los cuales fueron formados durante la maduración de la semilla y posteriormente almacenados. Por lo general va acompañada de un aumento proporcional de la actividad respiratoria.

### *ii) Fase de germinación.*

Es una fase relativamente estacionaria en la que  $\Psi_c$  deja de ser significativo y el potencial hídrico celular está determinado principalmente por el balance entre  $\Psi_\pi$  y  $\Psi_c$ . Es una fase en la que se reduce considerablemente la absorción de agua por la semilla. En este periodo ocurre la síntesis activa de ATP, sustratos, coenzimas, proteínas, y materiales de la pared celular, necesarios para el alargamiento y división de las células del eje embrionario. Todo se realiza a expensas de las reservas de nutrientes que fueron almacenados en el endospermo. En esta fase el único cambio morfológico observable es el alargamiento de las células y no su división.

### *iii) Fase de crecimiento.*

Corresponde a la iniciación de cambios morfológicos visibles en la semilla, en concreto, a la elongación de la radícula. Fisiológicamente, esta fase se caracteriza por un constante incremento en la absorción de agua y en la actividad respiratoria. El incremento en la toma de agua está relacionado inicialmente con los cambios que ocurren en las células de la radícula durante su elongación. En esta fase, la toma de agua está influenciada por el decremento en  $\Psi_\pi$ , resultado de la producción de compuestos de bajo peso molecular osmóticamente activos generados a partir de la hidrólisis de las reservas almacenadas.

En resumen, tanto la actividad respiratoria como la absorción de agua por las semillas son crecientes en la primera fase, se estabilizan en la segunda, y vuelven a aumentar en la última de las fases de toma de agua presentes en el proceso de germinación.

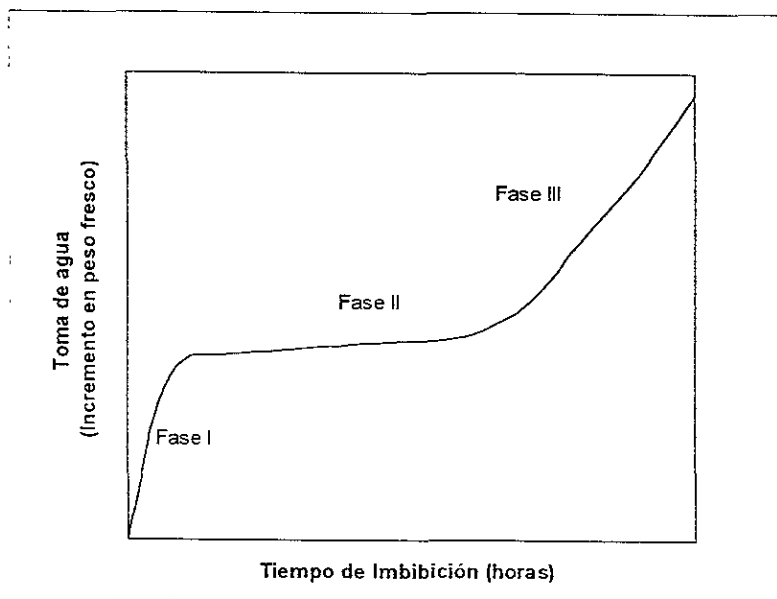


Figura 2 Fases de la Germinación. Adaptada de [5].

### 2.3. Metabolismo del Proceso de Germinación.

Los eventos metabólicos relacionados con la germinación que han sido más estudiados son la respiración y la movilización de las sustancias de reserva. En las semillas rehidratadas son funcionales tres rutas metabólicas: glucólisis, ciclo de Krebs y vía de las pentosas-fosfato [124]. Estas tres vías metabólicas generan distintos compuestos intermediarios y fundamentalmente gran cantidad de energía química en forma de ATP. Por su parte, la movilización de las sustancias de reserva ocurre gracias al aumento de la actividad específica de enzimas hidrolíticas, este incremento se debe en parte a la activación de las enzimas preexistentes, pero sobre todo a la síntesis de nuevas moléculas enzimáticas.

En los frutos monospermos de los cereales, el embrión está conectado al endospermo a través del escutelo, tejido derivado de la transformación del cotiledón único. Debajo de la cubierta seminal, que está soldada al pericarpio, hay una o varias capas de células ricas en proteínas (células de aleurona) que constituyen la llamada capa de aleurona. Estas células forman parte del endospermo y tienen un papel fundamental en la germinación de los cereales.

Los principales acontecimientos metabólicos relacionados con el proceso de germinación en los granos de cereales son los siguientes [124]:

a. El embrión, una vez rehidratado, libera giberelinas que se difunden hacia el endospermo a través del escutelo.



- b. Las giberelinas alcanzan las células de aleurona, donde inducen la producción de enzimas hidrolíticas, al desreprimir los genes que codifican dichas enzimas.
- c. Entre las enzimas hidrolíticas sintetizadas se encuentra la  $\alpha$ -amilasa, la cual se difunde hacia el endospermo para liberar en este glucosa a partir del almidón, mismo que representa del 70 al 80% de los carbohidratos almacenados en el endospermo.
- d. Las moléculas de glucosa liberadas alcanzan por difusión el embrión y le sirven a este como fuente de energía metabólica.
- e. De esta manera es como el embrión dispone de las moléculas estructurales necesarias para iniciar la síntesis de sus propias biomoléculas, así como el aporte energético necesario.
- f. Con todo lo anterior, el embrión inicia las divisiones mitóticas, el crecimiento celular y la diferenciación de las células que se van originando. El conjunto de todos estos procesos permite el crecimiento del embrión para formar una joven plántula.

#### 2.4. Hormonas en el Proceso de Germinación.

Las características que se consideran para definir una hormona o fitorregulador es que se trata de sustancias químicas específicas que son producidas en una zona específica del organismo y son transportadas hacia otras zonas (blancos) donde ejercen efectos regulatorios sobre las respuestas fisiológicas [43]. Tres de los fitoreguladores más estudiados y relacionados con el proceso de germinación son las giberelinas, el ácido abscísico y las auxinas.

##### *Giberelinas.*

Se ha reportado un aumento en el contenido de giberelinas durante la germinación. Tal aumento puede deberse a la liberación a partir de las formas no libres y su posterior transporte desde una región a otra de la semilla, o bien a su síntesis [107].

El modo de acción aceptado para este compuesto en la germinación de cereales, es que se transporta del escutelo o del eje embrionario hacia la capa de aleurona, donde induce la síntesis de enzimas específicas que se encuentran activas durante la germinación. La enzima más estudiada a este respecto ha sido la  $\alpha$ -amilasa [99]

El trabajo de Varner condujo al descubrimiento de que la síntesis de  $\alpha$ -amilasa en la capa de aleurona está controlada por ácido giberélico. La nueva enzima hidroliza el almidón que se encuentra en el endospermo. La aparición de  $\alpha$ -amilasa en la capa de aleurona depende de la síntesis *de novo* de la proteína, la cual a su vez depende de la síntesis de mRNA, puesto que el proceso global puede ser prevenido por el uso de inhibidores de la síntesis de RNA.

Debe aclararse que, a pesar de que la formación de  $\alpha$ -amilasa es un buen marcador para identificar el efecto de ácido giberélico y ha sido usado para estudiar los efectos de esta hormona, la formación de  $\alpha$ -amilasa ocurre después de la germinación. Por tanto, es muy incierto que la inducción de  $\alpha$ -amilasa tenga un papel importante en el rompimiento del letargo ó en facilitar la germinación [5].

### Ácido Abscísico.

El ácido abscísico (ABA) se encuentra en varias especies de semillas, y se encuentra localizado en diversas zonas de la semilla dependiendo de la especie. Se ha encontrado una estrecha relación entre el contenido de ABA en el embrión de soya y su capacidad para germinar. La semilla no germinará sino hasta 21 días después de la antesis (floración), y es en este tiempo cuando los niveles de ABA han disminuido considerablemente. Asimismo, cuando se ha eliminado ABA por lavado, la germinación puede ocurrir [128].

ABA induce la síntesis de proteínas de almacenaje, mientras que inhibe la síntesis de la carboxipeptidasa C, la cual se considera como una enzima específica de la germinación y que se relaciona a la hidrólisis de proteínas de reserva. Sin embargo, aún no se conoce a nivel molecular, como estos dos eventos pueden conducir a la inducción y mantenimiento del letargo y su término [46].

Probablemente, la evidencia más importante sobre el papel de ABA en la inducción del letargo primario, proviene de los estudios usando mutantes simples de *Arabidopsis thaliana* [85,83]. En el inicio del letargo en semillas de *Arabidopsis* se observó que esta correlacionaba con la presencia de ABA en el embrión, y no con el ABA proveniente de la planta madre. Mutantes con un contenido reducido de ABA en el embrión, tenían un menor tiempo de letargo. En otra mutante, el contenido de ABA endógeno era igual o mayor que en el tipo silvestre, esta mutante tenía una sensibilidad reducida a ABA, resultando igualmente en un semilla con un menor letargo.

Bajo condiciones apropiadas, se ha observado que estas mutantes deficientes en ABA presentan viviparidad, el cual es un fenómeno de germinación precoz (antes de la madurez); esto último indica que ABA tiene una función en prevenir la germinación precoz de los embriones en desarrollo. Las mutantes deficientes en ABA, producen semillas sin letargo que germinan rápido, mientras que semillas deficientes en ácido giberélico no germinan sin la adición de giberélico exógeno, y el porcentaje de germinación aumenta junto con la concentración de giberélico aplicado [65,66,67].

El efecto inhibitorio de ABA en la germinación, como varios otros efectos de la hormona, pueden ser revertidos por el ácido giberélico, ABA parece ser un factor natural importante en el letargo primario de algunas semillas y en la inhibición de la germinación, pero no es el único. La inducción del letargo, y su terminación, aparentemente es el resultado de la interacción entre ABA y giberélico, y posiblemente también con otras hormonas y factores [5].

### Ácido Indolacético.

El efecto de ácido indolacético (IAA) y compuestos relacionados (auxinas), ha sido por largo tiempo motivo de debate. Varios trabajos han investigado el efecto de IAA, encontrando resultados contrapuestos, activación o inhibición, dependiendo de la concentración y el tipo de semilla usados.

Los niveles de IAA en semillas de *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays* y *Pinus silvestris* aumentan claramente durante la imbibición, especialmente durante las

primeras horas [158]. Sin embargo, los niveles de IAA, en contraste con los reportados para otras hormonas, muestran amplia divergencia; se encontraron en 27 ng/g en *Phaseolus*, 182 en *Pinus* y 4505 en *Zea*. Tal divergencia podría sugerir que probablemente se trate de una liberación de los contenidos de IAA que en su forma conjugada se encuentran en los tejidos de reserva, y que tal liberación sea el resultado de la germinación.

A este respecto, debe notarse que existe evidencia de que los ésteres de IAA se encuentran al menos en las semillas de *Zea mays* y de *Oryza sativa* [48,70,115]. En *Zea mays*, las formas conjugadas de IAA han sido estudiadas con algún detalle, y en este caso, la auxina conjugada alcanza hasta los 100 mg/Kg de peso fresco. Las formas pueden ser de dos tipos dependiendo de su peso molecular y solubilidad.

Un grupo de alto peso molecular, es soluble en lípidos y contiene entre otros compuestos IAA esterificado con  $\beta$ -1,4-glucano de longitud de cadena variable [90]. El segundo grupo consiste de sustancias de bajo peso molecular y solubles en agua e incluyen IAA-mioinositol y IAA-mioinositolgalactosidos [127,162].

### 3. Crecimiento Celular.

Las células de las plantas están rodeadas por la pared celular, la cual permite el desarrollo de la presión de turgor de la célula y el cambio de su forma. Es esta presión de turgor la que induce el crecimiento, forzando a la pared celular y a la membrana plasmática a expandirse. La rapidez de entrada de agua a la célula que desarrolla la presión de turgor es regida por dos factores: el gradiente de potencial hídrico y la permeabilidad de la membrana hacia el agua. Por lo tanto, la velocidad de agrandamiento de la célula también es proporcional a estos factores [43].

Hay dos formas en que el potencial hídrico dentro de la célula puede ser más negativo que fuera de ella, haciendo posibles la captación de agua y el crecimiento [43,124]:

- i) los solutos dentro de la célula pueden aumentar haciendo que el potencial osmótico dentro sea más negativo, o bien,
- ii) la presión dentro de la célula podría disminuir.

En el caso en que las concentraciones de solutos en las células en crecimiento permanezcan constantes, la fuerza impulsora debe ser un descenso en la presión de turgencia. La presión dentro de la célula es causada por la resistencia mecánica de la pared celular a estirarse. Si esta resistencia se reduce de modo que se relaje la pared, su estiramiento conduce a una menor presión, con lo cual se reduce el potencial hídrico de la célula, de lo que resulta un mayor gradiente de dicho potencial y la entrada de agua.

El estiramiento plástico (estiramiento sin regresar a sus dimensiones originales) de la pared celular se alcanza cuando esta "se afloja", de modo que las microfibrillas de celulosa puedan deslizarse entre sí con mayor facilidad. A esto se le llama cisallamiento e implica la ruptura de los enlaces entre las

microfibrillas adyacentes, pero el mecanismo exacto del aflojamiento (cedencia de la pared), todavía no se comprende por completo [124].

En la célula en crecimiento, si no se absorbieran solutos de los alrededores o se sintetizaran en el tejido, el agua que entra diluiría pronto los solutos y con ello reduciría el potencial osmótico interno. Si no sucediera así, el crecimiento se detendría finalmente cuando se alcanzara el umbral de cedencia (presión mínima necesaria para causar el crecimiento celular).

Normalmente el crecimiento se detiene en ausencia de una fuente de solutos, al parecer debido a que la pared retiene su rigidez o bien se hace menos plástica. Es obvio que una planta requiere agua como fuerza impulsora del crecimiento, pero para la captación continua de agua se requiere la absorción de sales minerales o de carbohidratos y de otros solutos orgánicos que se suministran por translocación o fotosíntesis.

### 3.1. Teoría de Crecimiento Ácido.

La germinación, como se ha definido, culmina con la protrusión de la radícula, lo cual implica solo la elongación y no la división celular. La toma de agua es obviamente un requisito en la elongación de la células. Por lo anteriormente expuesto, la toma de agua depende de los cambios en el potencial hídrico celular, debido a la disminución de potencial osmótico y/o a la disminución de la presión de turgor.

Es en el mecanismo por el cual la pared celular pierde rigidez, y consecuentemente deriva en la disminución de la presión de turgor, que se ha desarrollado un vasto campo de investigación en la fisiología vegetal [13].

Se sabe desde hace tiempo que el ácido indolacético estimula el alargamiento de la célula. Se han desarrollado muchas teorías de la acción de auxinas, fundamentadas en su efecto de relajamiento de las ligaduras que mantienen a las microfibrillas de la pared celular juntas y entrecruzadas, provocando que se deslicen unas sobre las otras. Por otro lado se ha sugerido que uno de los factores que promueven la relajación de la pared celular son los hidrogeniones ( $H^+$ ), a esta concepción se le ha llamado "Teoría del crecimiento ácido" [32].

La Teoría del crecimiento ácido se basa en observaciones realizadas sobre muchos tejidos en los que los cambios rápidos en la concentración de protones sigue en términos de minutos a la aplicación de auxina, y en que además, se ha encontrado que la sola disminución del pH induce plasticidad celular durante un corto tiempo (de 1 a 4 horas), por lo que se piensa que las auxinas deben mediar eventos adicionales a la acidificación de la pared celular, ya que pueden promover la elongación por periodos prolongados [130].

De acuerdo con esta teoría, los protones son secretados hacia la pared celular. Esta acidificación promueve la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los carbohidratos de la pared celular y/o estimula la actividad enzimática en la pared celular, aunque el mecanismo preciso no se conoce.

El hecho de que ciertos tejidos vegetales incrementen su velocidad de crecimiento y sean estimulados en la secreción de protones cuando son expuestos a auxinas, sugiere que la protrusión de la radícula en las semillas puede ser estimulada por la acidificación sobre la pared celular y lleva a la posibilidad de que la secreción de protones sea un preludio a la germinación [13,14].

Se ha planteado que el mecanismo por el cual se produce una acidificación inducida por auxina está mediada por la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática. Hager y cols. [69] han demostrado que el tratamiento con auxina en coleoptilos de *Zea mays* aumenta la cantidad inmunodetectable de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática; y que el inhibidor traduccional cicloheximida, que a su vez es un inhibidor del crecimiento inducido por auxina, interfiere con el incremento de la cantidad de proteína. Esto sugiere que la auxina tiene un papel activador en los procesos de biosíntesis de la ATPasa, ya sea a nivel de la replicación y/o traducción, y que además esta enzima está involucrada en el proceso de acidificación del apoplasto en respuesta a auxina.

### 3.2. Acidificación, Elongación y Pared Celular.

Sobre los efectos de la acidificación en la plasticidad de la pared celular que conducen a la elongación celular se han propuesto distintas explicaciones. Una de ellas propone que uno o más tipos de enlaces encargados de mantener la estructura de la pared celular se debilitan por la acción del ácido, ya sea en forma directa, como lo indican los resultados de Holhl y cols. [78] quienes comprobaron la liberación no enzimática de  $\beta$ -glucano a pH 2.5; o bien de forma indirecta, como en el caso en que se ha observado que después de un tratamiento con auxina, la velocidad de autólisis por parte de la pared celular aumenta, alcanzando su máximo a las dos horas de iniciado el tratamiento, y declina totalmente después de ocho horas [80]. Este efecto no pudo ser observado con un pretratamiento ácido, lo que hace suponer que el cambio de pH no es el único modulador de la actividad de las hidrolasas de la pared celular y que estas pueden activarse por efecto de la auxina.

Entonces, en el caso de que los enlaces sean covalentes, el mecanismo más aceptado es aquel que propone que el cambio de pH en la pared celular inducido por auxinas, activa enzimas hidrolíticas. La actividad de hidrólisis sobre ciertos polímeros de la pared celular durante el crecimiento se ha comprobado tanto en las dicotiledóneas, como en las gramíneas. En el caso de las dicotiledóneas, el polímero que se hidroliza preferentemente es el xiloglucano; y en el caso de las gramíneas es el glucouronarabinosilano; en ambos casos los contenidos son restablecidos al final del periodo de elongación [80].

Como un mecanismo alternativo a los mencionados anteriormente, se ha documentado [38] la presencia de dos proteínas de 29 y 30 KDa en preparaciones crudas de extractos de hipocotilos en crecimiento de avena y pepino [100,172]

Estas proteínas llamadas expansinas, presentan una actividad que induce la extensión de paredes celulares aisladas. Posteriormente, se demostró [101]

que el mecanismo por el cual estas proteínas logran la elongación de la pared celular, no es la ruptura de los enlaces glucosídicos, sino que al parecer es romper los puentes de hidrógeno que estabilizan los diferentes polímeros de la pared celular. Al parecer su acción no cambia la estructura covalente de la pared celular [102], pues su efecto es reversible. Así, se ha propuesto que la actividad de las expansinas, inducida por la acidificación, es el principal elemento que determina la relajación de la pared celular. Recientemente se ha logrado el aislamiento y purificación de dos proteínas en arroz [29] que son similares en secuencia y actividad a la observadas en pepino y avena. La inmunolocalización de estas proteínas [30] ha demostrado su presencia en aquellos tejidos que tienen actividad de elongación celular. De este modo, se pone en claro que el mecanismo de relajación de la pared celular mediado por expansinas se encuentra distribuido en varios tipos de especies y tejidos.

Resumiendo, puede proponerse que el efecto de acidificación inducido por la auxina, tiene dos niveles de acción, el primero asociado sólo a la disminución de pH, el cual puede provocar la elongación celular durante un breve periodo; y el segundo, en el que se involucra la participación de diversas enzimas que son activadas (ya sea por el pH y/o la auxina), y que son responsables de la continuidad de la relajación de la pared celular.

#### 4. Organización y Función de las Membranas Biológicas.

El paradigma actual sobre la organización de las membranas biológicas está basado en el modelo de mosaico fluido propuesto en 1972 por Singer y Nicolson [153], considerando todas las evidencias disponibles. Las características esenciales del modelo en el caso de membranas en plantas son las siguientes [110]:

- a) La membrana está constituida por una bicapa molecular de fosfolípidos, glucolípidos y esteroides. La bicapa de lípidos funciona como un medio "solvente" para las proteínas integrales de la membrana y como una barrera semipermeable al paso de solutos.
- b) Existen dos tipos de proteínas asociadas con las membranas biológicas. Por una parte las proteínas integrales que se extienden a través de la bicapa lipídica y que presentan dominios polares en ambos lados de la membrana. El centro de la proteína está inmerso en el seno hidrofóbico de la membrana, tales proteínas son capaces de difundir lateralmente y pueden ser extraídas de la membrana mediante el uso de agentes caotrópicos tales como detergentes. Por otro lado, existen las proteínas no integrales o extrínsecas o periféricas que solo están adsorbidas a la superficie membranaral y no atraviesan el seno hidrofóbico de la bicapa lipídica.
- c) Aunque la mayoría de los lípidos se encuentran en un estado fluido, existe una población de ellos que se encuentra específicamente asociada a las proteínas integrales de la membrana. Tales lípidos tienden a permanecer por periodos prolongados en las vecindades de las proteínas integrales y tienden a acompañar a estas proteínas mientras difunden a lo largo del plano de la membrana.

Las membranas llevan a cabo funciones críticas para el funcionamiento celular. Primeramente, y tal vez lo más obvio, las membranas proveen de una barrera relativamente impermeable para los diferentes metabolitos y enzimas necesarias para el funcionamiento celular. Las membranas son capaces de transmitir la información del medio exterior al espacio interior de la célula u organelo. Pueden también regular procesos metabólicos por medio de la regulación del transporte de iones y/o metabolitos hacia dentro o hacia afuera de la célula, o bien de uno a otro compartimento celular [3]. A este respecto, la capacidad de las células y organelos de regular la concentración de solutos (metabolitos) dentro de estos, es de vital importancia para el crecimiento celular y el metabolismo. Las diferencias de concentración de solutos entre la célula y sus alrededores permite que los nutrientes sean transportados hacia los espacios en que son necesarios o útiles en alguna función, ya sea reguladora o metabólica. El control de estas diferencias es también importante para regular las relaciones osmóticas y por ende el volumen y tamaño de la célula.

Puesto que las funciones de la membrana, tales como transporte y catálisis, son mediadas por proteínas y cada membrana tiene su muy particular y única función, no es sorprendente encontrar que las diferentes membranas tengan diferente contenido de proteínas y composición lipídica. Así entonces, cada organismo o tejido presentará en su membrana una serie de proteínas específicas que le ayudarán a realizar sus funciones particulares.

#### 4.1 Transporte a través de las Membranas Biológicas.

Existen dos tipos de transporte: El transporte mediado y no mediado. El transporte no mediado ocurre por difusión simple. En cambio, el transporte mediado ocurre a través de la participación de proteínas transportadoras, que son llamadas acarreadores, permeasas, portadores, translocasas, translocadores y/o transportadores [167].

En el caso del transporte mediado, se ha subclasificado en dos categorías, dependiendo de la termodinámica del sistema:

- 1) El transporte mediado pasivo ó difusión facilitada, en la cual un tipo específico de molécula fluye de una zona de alta concentración a una de baja, de modo que la tendencia es a equilibrar su gradiente de concentración y es energéticamente favorable o exergónico.
- 2) El transporte mediado activo, en el cual las moléculas son transportadas de una zona de baja concentración a una de alta, es decir, en contra de sus gradiente de concentración. Tal proceso resulta endergónico, y por tanto debe encontrarse acoplado a un proceso suficientemente exergónico para hacerlo favorable.

El tipo de transporte no mediado, generalmente se aplica a solutos que por su naturaleza no polar, tienden a difundir a través de la membrana a una tasa más o menos proporcional a su solubilidad en lípidos o en solventes no polares, e inversamente proporcional a su tamaño molecular [15]. Este tipo de transporte ocurre en favor de su gradiente de concentración, es decir, de altas a bajas

concentraciones, y por tanto, de acuerdo con la termodinámica, la fuerza directriz es su propio gradiente de concentración; y de acuerdo a la primera ley de Fick, el movimiento del soluto A quedará descrito por un flujo  $J_A$  ( $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), según la expresión

$$J_A = (D_A/\Delta x)([A]_{\text{ext}} - [A]_{\text{int}}) = P_A ([A]_{\text{ext}} - [A]_{\text{int}})$$

donde el término  $P_A = D_A/\Delta x$ , es conocido como el coeficiente de permeabilidad y es dependiente del coeficiente de difusión membranar ( $D_A$ ) y del espesor de la membrana ( $\Delta x$ ) [3].

No todas las moléculas neutras siguen este comportamiento lineal en función del gradiente de concentración y su coeficiente de permeabilidad es mucho mayor del que se espera a partir de su coeficiente de difusión membranar. En este caso se trata de un sistema de transporte mediado pasivo o difusión facilitada; en el que proteínas membranales "catalizan" el paso de solutos específicos a través de la membrana en favor de su gradiente de concentración.

Algunas características que se pueden asociar a este sistema de transporte son: a) velocidad y especificidad, b) cinética de saturación y c) susceptibilidad a la inhibición y/o activación por ciertos agentes químicos [167].

En el caso de los iones y aquellos metabolitos que contienen grupos polares, el ambiente hidrofóbico del interior de la bicapa lipídica representa una barrera considerable para el paso de los mismos a través de ella. Por tanto, el movimiento de tales solutos implica necesariamente la actividad de proteínas que funcionen como sistemas de transporte [20].

La existencia de estos sistemas de transporte específicos para ciertos solutos, representa la base de la selectividad en la acumulación observada a través de las membranas de plantas y la unión entre el transporte y la energía metabólica [7].

El transporte activo mediado, puede categorizarse de acuerdo a la estequiometría del proceso de transporte. A menudo, el transporte de una molécula o ión puede estar asociado a el movimiento de una segunda molécula. De hecho, tal relación es común y puede ocurrir de diversa formas, como ha sido esquematizado en la Figura 3.

El uniporte involucra el movimiento de una sola sustancia a través de la membrana. En el caso de los otros mecanismo de transporte, el movimiento de una sustancia está estrechamente relacionada al flujo de otra, es decir, ambos procesos se encuentran acoplados. Si tal acoplamiento implica el movimiento de dos solutos en la misma dirección, el proceso se denomina cotransporte o simporte. En cambio, el transporte de dos solutos en direcciones opuestas es llamado antiporte.

En términos de flujos de carga eléctrica, los procesos de transporte son descritos como electroneutro, si el soluto transportado no presenta carga, o si el movimiento de un ión está balanceado por el cotransporte de un ión de carga opuesta, o el antiporte de un ión igualmente cargado. Si el transporte de solutos no se encuentra balanceado de este modo, el proceso conducirá a la acumulación y separación de cargas a través de la membrana. En este caso el proceso será



electrogénico. En el caso de que el flujo de un soluto cargado esté favorecido por el potencial eléctrico transmembranal, de forma que migre en la dirección en la que sea atraído por la carga contraria, el transporte se denomina electroforético.

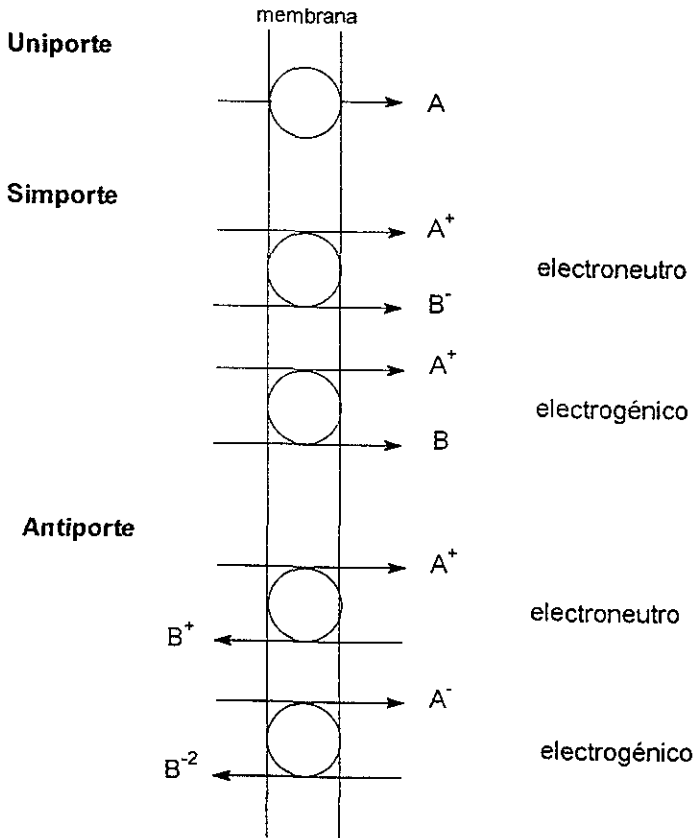


Figura 3. Sistemas de transporte secundario

Este tipo de procesos de transporte son referidos como transporte activo, puesto que se trata de sistemas que para establecer y mantener los gradientes de concentración de solutos específicos, requieren de energía dependiente del metabolismo celular. El transporte activo en contra del gradiente de potencial electroquímico, requiere del gasto energético, el cual puede ocurrir en varias formas, y es con base en esto que se diferencian el transporte activo primario y el secundario [87].

Los sistemas de transporte activo primario son relativamente heterogéneos dependiendo de la fuerza impulsora del sistema, que en el caso de la bacteriorodopsina y la halorodopsina son promovidos por luz, en el de la cadena

de transporte de electrones se utiliza la energía redox, y en otros sistemas la fuerza impulsora es la energía química de la hidrólisis de ATP. En cualquiera de estos casos se dice que se trata de un transporte activo primario. Alternativamente, el transporte de solutos puede asociarse al flujo transmembranal exergónico de un segundo soluto; esto se conoce como un transporte activo secundario y puede ocurrir por alguno de los mecanismos mencionados de simporte o antiporte. En ambos casos, el proceso completo ocurre con un decremento en la energía libre.

En las membranas vegetales, tales como la membrana plasmática, la vacuolar y la de Golgi, un sistema de transporte primario utiliza la reacción química de la hidrólisis de ATP para realizar el transporte de  $H^+$  a través de la membrana (ATPasa de  $H^+$ ). Esto resulta en la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, el cual consiste en una diferencia en la concentración de protones ( $\Delta pH$ ) y en una diferencia de potencial eléctrico ( $\Delta \Psi$ ) a ambos lados de la membrana.

Este gradiente electroquímico de protones o "fuerza protomotriz" puede ser utilizado por un sistema de transporte secundario como fuente de energía para el movimiento de otros solutos. De este modo, teniendo sistemas membranales de simporte y/o antiporte asociado a los protones, es posible llevar a cabo el movimiento de solutos en una u otra dirección a través de la membrana y en contra de su propio gradiente de potencial electroquímico [20].

En el caso de los uniportadores que median el paso de solutos cargados, la diferencia de potencial eléctrico del gradiente de potencial electroquímico puede utilizarse para el movimiento y acumulación del soluto en un modo electroforético. Tal es el caso de los canales que median el flujo de iones, cuando se trata de canales sensibles a voltaje.

## 5. Sistemas de Transporte en Plantas.

En los siguiente párrafos se describirán algunos de los sistemas de transporte secundario que se han reportado en plantas y particularmente aquellos asociados a la membrana plasmática. Estos sistemas de transporte han sido caracterizados e incluyen el simporte  $H^+$ /sacarosa [26], simporte  $H^+$ /hexosas [161] simporte  $H^+$ / $NO_3^-$  [106,137], simporte  $H^+$ /aminoácidos [173], además de canales iónicos [74].

Recientemente, gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, ha sido posible la identificación de tales sistemas de transporte en las membranas vegetales [96].

### *Sacarosa.*

La primera clonación exitosa de un transportador de sacarosa en plantas [132], fue lograda por complementación funcional de una cepa de *S. cerevisiae* modificada e incapaz de transportar e hidrolizar eficientemente sacarosa externa, pero capaz de metabolizarla una vez que esta ha sido tomada.

Esta actividad de transporte de sacarosa es inhibida por protonóforos y estimulada por la disminución del pH externo, lo que sugiere un mecanismo de simporte asociado a  $H^+$ . El análisis tipo Northern blot, indica que el gene StSUT1 (de *Spinacia oleracea* sucrose transporter), se expresa con altos niveles en tejidos de reserva (hojas maduras), mientras que los niveles de mRNA son menores en tejidos profundos (hojas jóvenes en desarrollo). La hibridización *in situ*, muestra que el gene StSUT1 se expresa principalmente en el floema de hojas maduras [133].

Entonces, se ha propuesto que el gene StSUT1 codifica para un simportador  $H^+$ /sacarosa, involucrado en el llenado activo del floema con sacarosa, en hojas maduras exportadoras. Se ha llegado a conclusiones similares para el transportador SUC2 de *A. thaliana* [159] y de *Plantago major* [56].

#### Nitrato.

La clonación del gene que codifica para el transportador de  $NO_3^-$  (CHL1), ocurrió en dos etapas. Primero se identificaron mutantes en *Arabidopsis*, con resistencia al clorato ( $ClO_3^-$ ), un análogo tóxico del nitrato; una de esas mutantes presentaba un nivel disminuído de toma de nitrato [41]. Segundo, se muestrearon cepas mutagenizadas por inserción para identificar una versión marcada con T-DNA de la mutante que permitiera la clonación del gen CHL1 que confiere resistencia al clorato [160].

La toma de nitrato en ovocitos que expresan el gene CHL1, se encuentra asociada a cambios en el potencial de membrana y en las corrientes iónicas, lo que evidencia la idea de que al menos dos equivalentes de  $H^+$  son transportados por  $NO_3^-$ . El análisis de Northern blot revela que el mRNA de CHL1 se encuentra predominantemente en raíces y que la expresión de CHL1 se induce por la presencia de nitrato.

Se han identificado recientemente en tomate dos homólogos de CHL1 específicos de raíz [95].

#### Amonio.

Se ha identificado un transportador de  $NH_4^+$  de alta afinidad de *A. thaliana* (AMT1), por complementación de una mutante de levadura defectuosa en el transporte de amonio [114]. Cuando se expresa el gene AMT1 (de *Arabidopsis* methylammonium transporter 1), este media la toma de [ $^{14}C$ ]metilamina, en un proceso que es dependiente de energía y sensible a protonóforos. Los experimentos de expresión muestran que AMT1 se transcribe en el tallo y las hojas, además de la raíz [114]. En contraste, el mRNA homólogo en tomate se expresa exclusivamente en raíz, sugiriendo un papel en la toma de amonio del suelo [95].

#### Aminoácidos.

La toma de aminoácidos en células vegetales está acompañada de una despolarización y alcalinización del espacio extracelular [27,131]. La complementación funcional de diferentes mutantes defectuosas en el transporte

de aminoácidos ha permitido el aislamiento de varios genes que codifican para transportadores de aminoácidos [54]. Se han identificado cinco genes agrupados en la familia AAP, los cuales pueden clasificarse en dos grupos [52]:

- 1) Transportadores de amplia especificidad, aquellos que reconocen tanto aminoácidos ácidos como neutros (AAP1, AAP2 y AAP4), y
- 2) Transportadores generales, que reconocen tanto aminoácidos básicos, al igual que ácidos y neutros (AAP3 y AAP5).

Todos ellos pueden funcionar como simportadores  $H^+$ /aminoácido, puesto que la toma es reducida por protonóforos, estimulada por la disminución del pH externo y puede ocurrir en contra de un gradiente de concentración [55,89].

Por otro lado, se ha identificado otra proteína que no muestra homología con la familia AAP [52]. Esta proteína, llamada AAT1, media el transporte de alta afinidad de aminoácidos básicos, pero también reconoce en cierto grado aminoácidos ácidos y neutros.

#### *Péptidos.*

El transporte de péptidos en plantas fue primeramente descrito en escutelo aislado de semillas en germinación, y se postuló que estaba involucrado en el transporte de péptidos como fuente de nitrógeno y carbono desde el endospermo hacia el embrión en germinación [77].

Se han aislado dos diferentes genes de transportadores de péptidos en *A. thaliana*: AtPTR2-A [155], y AtPTR2-B [154]. Transportan tanto dipéptidos como tripéptidos, pero no péptidos de cuatro o más residuos. El sustrato preferido tiene un carácter hidrofóbico, pero parece haber poca especificidad en cuanto a los residuos laterales de los aminoácidos.

#### *Potasio.*

Se han reportado sistemas involucrados en la toma de potasio que difieren en la afinidad por este ion y en el acoplamiento energético asociado a su transporte en plantas. Esencialmente se distinguen los transportes de alta y baja afinidad. Las vías de alta afinidad son utilizadas cuando la concentración extracelular de  $K^+$  se encuentra en el rango micromolar; en cambio las vías de baja afinidad operan cuando esta concentración extracelular está en el rango milimolar [143].

El transporte de alta afinidad es de especial importancia en la toma de  $K^+$  desde el suelo hacia las raíces [143]. Recientemente se ha aislado el primer gene para un transportador de  $K^+$  (HKT1) [142] por complementación de una mutante de levadura deficiente en la toma de potasio con una librería de cDNA construida a partir de raíces de trigo en ausencia de potasio. Se expresó el mRNA para HKT1 en ovocitos y las corrientes generadas fueron inicialmente interpretadas como debidas a un simporte  $H^+/K^+$  [142]. Sin embargo, un estudio posterior por el mismo grupo reveló que esto era incorrecto, y que en realidad HKT1 se trata de un cotransporte  $Na^+/K^+$  [136]. Este último resultado está apoyado por el aislamiento de dos mutaciones puntuales en HKT1 que incrementan la tolerancia a  $Na^+$  en células de levadura complementadas con HKT1 mutado.

Por otro lado, el transporte de baja afinidad está mediado por los canales rectificadores hacia dentro [74], también llamados canales de entrada de  $K^+$ . La rectificación es la propiedad que presentan algunos canales por la cual se encuentran abiertos a ciertos potenciales y están cerrados en otros; lo que resulta en el paso de corriente en una sola dirección.

Los primeros dos cDNA que codifican para canales de  $K^+$ , fueron reportados en 1992: AKT1 [145] y KAT1 [4]. Ambos fueron clonados a partir de *Arabidopsis thaliana*, con base en su capacidad de complementar una mutante de levadura deficiente en el transporte de potasio.

El análisis de la secuencia de KAT1 y AKT1, predice una proteína que comparte motivos estructurales con la familia de canales de potasio en animales, denominada "Shaker". Estos rasgos de similitud, incluyen seis segmentos transmembranales, un segmento anfipático sensible a voltaje y un dominio de poro altamente conservado y selectivo para  $K^+$  [4,145].

También se ha identificado otra clona, llamada KST1 ( $K^+$  channel from *Solarium tuberosum* 1), que fue aislada en papa usando KAT1 para sondear una librería de cDNA construida a partir de fragmentos de epidermis [112].

El análisis histoquímico en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen el promotor de KAT1 fusionado a  $\beta$ -glucoronidasa como gen reportero (KAT1-GUS), ha mostrado que KAT1 se expresa primordialmente en la células guardia [113]. KST1 también se expresa en las células guardia de papa [112].

Cuando se inyectó a ovocitos de *Xenopus* con RNA de KST1 se produjo una corriente rectificadora hacia dentro de  $K^+$ , la cual mostró una rápida activación y un incremento en la amplitud en respuesta a una disminución en el pH de 7.4 a 4.5. Esta sensibilidad al pH pone de manifiesto el papel de KST1 en el control de la apertura de los estomas. Puesto que la membrana plasmática de las células guarda presenta una ATPasa de  $H^+$  que hiperpolariza la membrana y genera un decremento de pH en el apoplasto durante la apertura de los estomas, entonces el decremento en pH puede activar posteriormente a KST1 y así promover la toma de  $K^+$  hacia el interior de las células guardia [112].

La caracterización electrofisiológica de KAT1 [75,79,141,165] y de KST1 [112], ambos por su expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus*, indica que ambos sistemas funcionan como canales de  $K^+$  rectificadores hacia dentro, altamente específicos para  $K^+$ . Sin embargo, difieren en la conductancia unicanal, en la cinética de activación y en su farmacología [112].

En el caso de AKT1 no se ha obtenido ninguna señal eléctrica asociada a su expresión en ovocitos; sin embargo, usando un sistema de expresión en baculovirus de células de insecto, se ha establecido que AKT1 es también un canal altamente selectivo para potasio y dependiente de voltaje, rectificador hacia dentro [61].

La expresión de la construcción AKT1-GUS, muestra que este canal está localizado preferentemente en los tejidos no vasculares de la regiones maduras de raíz. En los análisis tipo Western de membranas plasmáticas de *Brassica napus*, una especie relacionada, confirma que AKT1 está presente en las membranas plasmáticas de raíz. AKT1 también se expresa en los primordios

diferenciados de hoja y en hydathodus (grupos especializados de células que se encuentran en los márgenes de la hoja y que exudan agua del tejido vascular del xilema [92].

## 6. ATPasa de $H^+$ de la Membrana Plasmática de Plantas.

La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática tiene un papel primario en el acoplamiento entre el metabolismo energético y el transporte de solutos que ocurre en la membrana plasmática de las células vegetales. Esta enzima membranar representa la maquinaria molecular en la cual se acopla la hidrólisis de ATP y el transporte de  $H^+$  hacia el exterior celular. Por medio de esta actividad, la ATPasa de  $H^+$  produce un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática, el cual consiste de una diferencia de pH ( $\Delta pH$ ), más ácido en el exterior, y una diferencia de potencial eléctrico ( $\Delta \Psi$ ), negativo en el interior.

El acoplamiento de la energía potencial conservada en este gradiente electroquímico, con el transporte endergónico de otros solutos, está mediado por los sistemas de transporte secundario presentes en la membrana. Este mecanismo de acoplamiento energético, donde la ATPasa de  $H^+$  funciona como el transductor primario entre la energía química y la energía potencial utilizable en el transporte acoplado, está considerado como un punto central en varios procesos de importancia fisiológica en las plantas, entre los que se incluyen la toma de nutrientes, la distribución de iones en toda la planta, la apertura de estomas, y la elongación celular [23,103,146].

### 6.1. Características Bioquímicas.

La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática forma un intermediario fosforilado identificable durante el ciclo catalítico de la enzima [163], en el cual el fosfato terminal del ATP se une a un residuo de aspártico en la proteína. Esta característica común entre las ATPasas hidrolíticas y translocadoras de cationes, es por lo cual son referidas como ATPasas tipo P [122]

Las ATPasas tipo P incluyen varias enzimas, tales como la ATPasa de  $Na^+/K^+$  de la membrana plasmática de animales, la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y la de membrana plasmática, la ATPasa de  $H^+/K^+$  de la mucosa gástrica y la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática [60].

La ATPasa de  $H^+$  es una proteína con un peso molecular de cerca de 100 KDa, está compuesta de un solo polipéptido que se encuentra embebido dentro de la membrana plasmática por 10 a 12 regiones de cruce transmembranar [168].

Las actividades de hidrólisis de ATP y de bombeo de protones de la enzima se han caracterizado en varios tipos de preparaciones: vesículas membranales crudas o purificadas, enzima pura solubilizada en detergentes y reconstituída en liposomas [147]. Los resultados obtenidos con preparaciones parcialmente purificadas indican que el sustrato de la enzima es el complejo  $Mg^{2+}$ -ATP [8,12]. Este sustrato presenta una cinética hiperbólica tipo michaeliana. Los valores de  $K_m$  reportados varían en un rango muy amplio [59], lo que podría deberse a

diferencias en las condiciones experimentales, especialmente en la concentraciones reales del complejo  $Mg^{2+}$ -ATP en solución. Además, no se puede descartar la preponderancia de diferentes isoformas en ciertos tejidos o condiciones de desarrollo. Asimismo la falta de paralelismo entre las  $K_m$ 's para ATP en la reacción de hidrólisis o en la de bombeo de protones, puede deberse a que las vesículas utilizadas tienen diferente permeabilidad a los protones [59].

La actividad enzimática es óptima cerca de pH 6.5, cuando se ensaya en presencia de magnesio y cloruro de potasio y muestra una gran especificidad por ATP como sustrato sobre otros nucleótidos trifosfato y compuestos fosforilados.

En el caso de fracciones membranales no selladas, se observa una estimulación por KCl que se relaciona con un efecto directo del catión sobre la enzima; y cuando la actividad enzimática se ensaya en presencia de diferentes cationes monovalentes presentes como cloruros, la secuencia de estimulación frecuentemente observada es:  $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$  [23].

Existen reportados varios inhibidores de la actividad catalítica. El ion vanadato es un inhibidor efectivo de la ATPasa de la membrana plasmática, se obtiene un 50% de inhibición con 2 a 10  $\mu M$ , y una inhibición total con 50 a 100  $\mu M$  [34,156,164]. Sin embargo, el vanadato es un inhibidor general para fosfohidrolasas, las que también forman un intermediario fosforilado y por tanto también son inhibidas. El uso de molibdato, como un inhibidor de las fosfatasa, ayuda a la identificación de la inhibición debida a la ATPasa de membrana plasmática [57,147].

Un problema importante en los estudios *in vivo*, es que el vanadato presenta poca permeabilidad y penetra en las células muy lentamente [9], además de que puede ser reducido a un forma no inhibitoria por el metabolismo celular [171]. La acción inhibitoria del vanadato sobre la ATPasa de la membrana plasmática favorece la presencia del intermediario fosforilado en el mecanismo de hidrólisis de ATP; por lo cual se ha propuesto un patrón de inhibición incompetitiva, en el que el inhibidor se une a la forma  $E_2$  de la enzima [116,117]. La inhibición incompetitiva se produce cuando el inhibidor se une a la enzima solo después de que se ha unido el sustrato, resultando en un complejo inactivo [144].

La eritrosina B es otro inhibidor efectivo de la ATPasa de la membrana plasmática, la cual se inhibe completamente en presencia de concentraciones de 10 a 50  $\mu M$ , tanto *in vivo* como *in vitro* [35,36]. El único efecto colateral al uso de este inhibidor, es la inhibición de la ATPasa vacuolar.

Existen otros inhibidores de la enzima, como el dietilestilbestrol, la dicitohexilcarbodiimida, el herbicida 2,2,2-tricloroetil-3,4-diclorocarbanilato (SW26). Sin embargo, estos tienen menor especificidad, ya que puede inhibir otras ATPasas y/o fosfatasa [147]. En cuanto al uso de inhibidores, se puede decir que no existe un inhibidor absolutamente específico de la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática.

En lo que respecta a agentes activadores, se ha observado que las preparaciones purificadas requieren de fosfolípidos exógenos para una actividad óptima. Aunque el grado de activación y especificidad es variable dependiendo del tejido y del método elegido para la solubilización, no se puede descartar que

las ATPasas de diferentes fuentes puedan presentar diferentes requerimientos. Un estudio detallado con la ATPasa de raíz de avena [148], muestra que la estimulación por lípidos de la enzima deslipidizada es relativamente inespecífica y que es probable que el requerimiento de fosfolípidos haya sido satisfecho durante la solubilización, por lo cual la aplicación exógena de los mismos ya no se necesite. Sin embargo, la actividad máxima estimulada se observa con lisofosfatidilcolina, el cual es un derivado de fosfolípido que actúa como un detergente y que interacciona con proteínas membranales, sin el requerimiento de reconstitución en vesículas; es probable que esto refleje un efecto directo sobre la enzima más que una reconstitución.

## 6.2. Mecanismo Cinético.

Clasificada como una ATPasa tipo P, como se mencionó anteriormente, la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática se caracteriza por la formación de un intermediario fosforilado cuando el fosfato gamma del ATP se une covalentemente a un residuo de aspártico de la propia enzima.

El acoplamiento energético entre la hidrólisis de ATP y el transporte de iones,  $H^+$  en este caso, se apoya en la diversidad de especies intermediarias que presenta la enzima durante su ciclo catalítico, las cuales se denominan: enzima desfosforilada y desprotonada (E), enzima desfosforilada y protonada ( $H^+$ -E), enzima fosforilada y protonada ( $H^+$ -E-P), enzima fosforilada y desprotonada (E-P). La enzima desfosforilada une protones con gran afinidad desde el lado citoplásmico de la membrana, mientras que la enzima fosforilada lo une débilmente en el lado externo, y por tanto es esta forma la que es susceptible de liberarlos con mayor facilidad [146].

Por lo tanto, la hidrólisis de ATP y el transporte de protones son dos eventos que se encuentran asociados necesariamente. Comenzando el ciclo con la conformación E (enzima desfosforilada y desprotonada), resulta que no es capaz de interactuar con el ATP si no toma primero un protón del lado citoplásmico y adquiere entonces la conformación  $H^+$ -E. Esta forma, que ahora une ATP, tiene actividad de cinasa y transfiere el fosfato gamma del ATP unido a un residuo de aspártico de la misma proteína. Una vez fosforilada, la enzima adquiere la conformación  $H^+$ -E-P, la cual para catalizar la hidrólisis del intermediario fosforilado, requiere de la liberación del protón hacia el medio externo, concluyendo de esta forma el ciclo. Este proceso se ilustra esquemáticamente en la Figura 4.

Generalmente se acepta que existe un cambio conformacional de la enzima, de modo que esta se presenta en dos posibles arreglos: la forma  $E_1$ , que es la responsable de la actividad de cinasa, y la forma  $E_2$  que lleva a cabo la actividad de fosfatasa.



### 6.3. Estructura y Mecanismo Molecular.

Aunque aún no se conocen con detalle los mecanismos moleculares por los que ocurre la catálisis de esta enzima, ha sido posible evidenciar para varias ATPasas tipo P los diferentes cambios conformacionales por técnicas como dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca [126]. Asimismo, el avance de las técnicas de biología molecular ha permitido proponer estructuras a partir de las cuales se han deducido algunos mecanismos posibles.

En las siguientes líneas se describen algunos de los aspectos estructurales de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática en plantas, deducidos a partir del análisis de la secuencia génica.

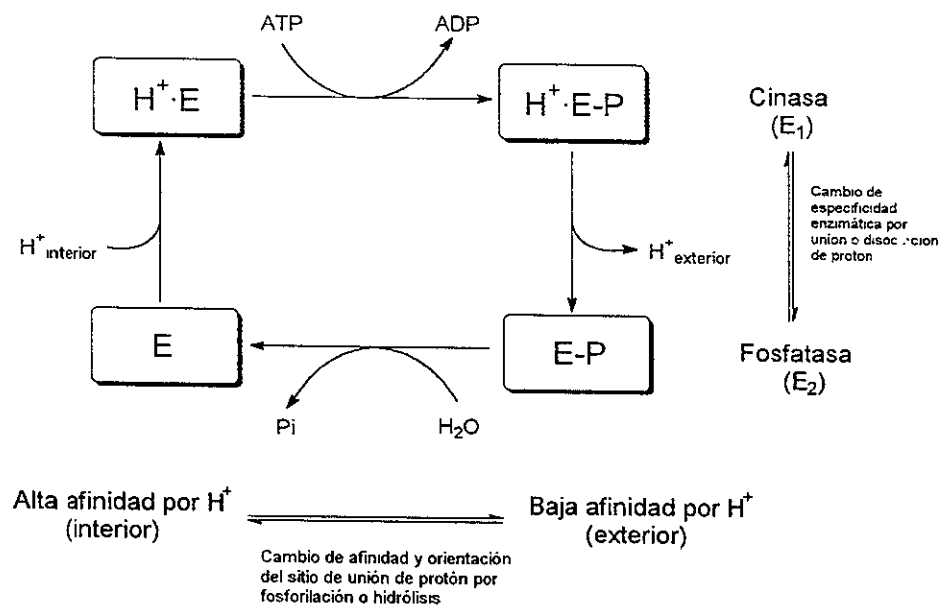


Figura 4. Mecanismo cinético de la ATPasa de  $H^+$ . Adaptada de [146]

Gracias a los avances logrados en la clonación y secuenciación de los genes de la ATPasa de la membrana plasmática en *Arabidopsis thaliana* [72,120], *Nicotiana plumbáginifolia* [19,125] y en *Lycopersicon esculentum* [49], se han determinado las estructuras primarias correspondientes y se han realizado predicciones sobre el arreglo de la enzima en la membrana. Asimismo, se han comparado estas secuencias con las de otros miembros del grupo de las ATPasa tipo P.

Como lo señala Serrano [149], a pesar de que en general el grado de similitud entre estas proteínas no es muy alta (cerca del 25%), existe una gran similitud en las regiones conservadas, las cuales se piensa están involucradas en la unión de ATP y en la formación y rompimiento del intermediario fosforilado.

Usando diferentes métodos de predicción de estructura secundaria de proteínas, la unión de compuestos químicos a residuos implicados en la catálisis, la unión de anticuerpos monoclonales y el análisis de mutaciones inducidas, se ha logrado construir un modelo de la topología de la enzima en la membrana. El modelo propuesto por Serrano para la ATPasa de  $H^+$  se presenta en la figura 5.

El análisis de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia génica, ha sugerido que la proteína presenta 8, 10 ó 12 segmentos transmembranales, los cuales se constituyen en el dominio membranal y pueden funcionar como el canal para el protón. Se acepta que los extremos amino terminal y carboxilo terminal son citoplásmicos, y que por consiguiente el número de regiones transmembranales debe ser par, cada dos regiones transmembranales determinaría una salida y reentrada de la cadena polipeptídica desde un lado de la membrana. En cuanto a la región del carboxilo terminal, a esta se le ha asignado una función reguladora (ver adelante).

El 70% de la enzima está expuesta hacia el lado citoplásmico y es en esta sección que existen dos dominios centrales que parecen contener los sitios activos. El mayor de ellos contiene el sitio de unión a ATP y sintetiza como intermediario fosforilado el aspartil fosfato (dominio cinasa); al dominio menor se le supone implicado en la hidrólisis de este intermediario (dominio fosfatasa) o en los cambios de conformación que esa hidrólisis necesita.

Existe otra región conservada que se encuentra localizada en la abertura citoplásmica del canal, en una posición ideal para acoplar el transporte iónico y la hidrólisis de ATP, ya que esta región se encuentra cerca del dominio fosfatasa.

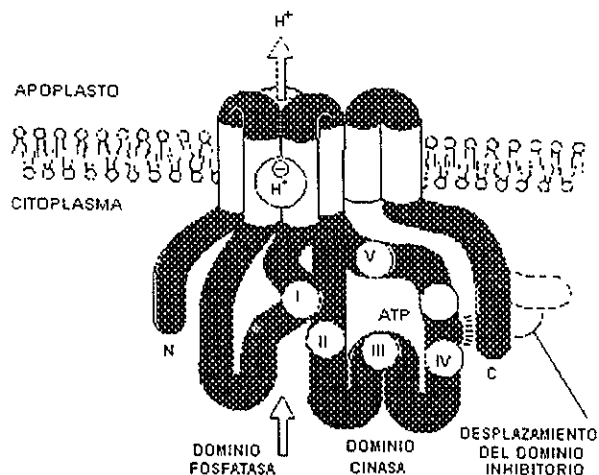


Figura 5 Estructura molecular de la ATPasa de  $H^+$  Tomada de [146]

Con base en estas características estructurales se ha propuesto que el mecanismo molecular de acoplamiento ocurre en la siguiente forma [147,149] (Figura 6): En la conformación  $E_1$ , el dominio cinasa está activo pero el dominio fosfatasa no, y el sitio de unión para el protón une al ión con gran afinidad desde el lado citoplásmico de la membrana. En la conformación  $E_2$ , el dominio fosfatasa está activo mientras que el dominio cinasa no lo está, y el sitio de unión para el protón en la apertura del canal, une débilmente al ion desde el lado externo de la membrana. Entonces, para que la enzima pueda completar un ciclo catalítico, debe alternar entre ambas conformaciones y al hacerlo efectúa el bombeo de protones. El cambio conformacional, parece estar dirigido por la fosforilación de la región conservada, y puesto que esta región se encuentra cerca de la apertura del canal, un cambio conformacional concertado podría modificar tanto la afinidad y orientación del canal así como la actividad de los dominios cinasa y fosfatasa.

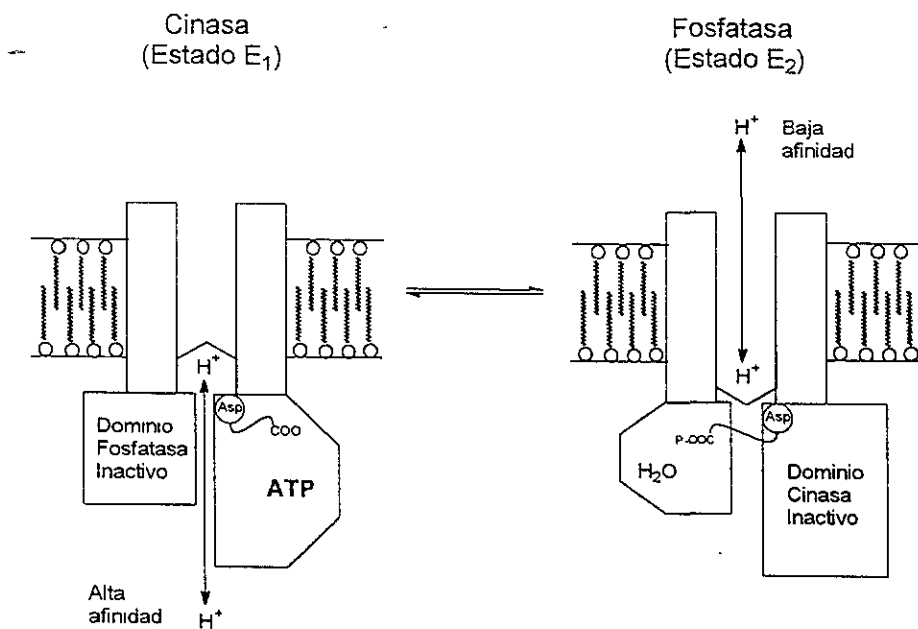


Figura 6. Mecanismo molecular de la ATPasa de  $H^+$ . Adaptada de [147]

#### 6.4. Fisiología y Regulación.

La ATPasa de  $H^+$  se encuentra involucrada en varios procesos de importancia fisiológica. Como ya se ha señalado, esta enzima representa la bomba primaria que logra el acoplamiento entre la energía metabólica y los

sistemas de transporte, los que a su vez son esenciales en otros procesos que han sido descritos anteriormente.

#### Activación del Transporte Secundario.

En las plantas la toma de los nutrientes minerales del suelo ocurre en contra de un gradiente de concentración. La toma de estos minerales por la raíz, ocurre por medio de proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática, que luego son transportados por la savia del xilema y después abandonan el xilema para entrar al simplasto de la planta vía el mismo tipo de proteínas [104]. Hemos ya revisado las características de algunos de estos sistemas de transporte como los relacionados a  $K^+$ ,  $NO_3^-$ , y  $NH_4^+$ . En el caso de fuentes de carbono y nitrógeno, estos son reducidos y asimilados en algunos órganos y después distribuidos a través de la planta. La toma de estos compuestos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos, dentro de los vasos conductores es *energéticamente desfavorable*, puesto que ocurre en contra de un gradiente de concentración [104]. Nuevamente es la ATPasa de  $H^+$  la que provee de la energía requerida para el transporte, mediante la fuerza protomotriz creada por la enzima. En este caso se han revisado en este texto los sistemas de transporte de sacarosa, péptidos y aminoácidos en simporte con protón.

#### Turgor y Crecimiento Celular.

Células de *Arabidopsis thaliana* en cultivo, sometidas a estrés osmótico responden con una extrusión de protones por la activación de la ATPasa de  $H^+$  [40]. Esto pone de manifiesto como la ATPasa de  $H^+$  puede involucrarse en varios fenómenos relacionados con el turgor celular, tales como la apertura de estomas del cual se conoce bien el mecanismo. Las células guarda son sensibles a la concentración de  $CO_2$ , la humedad, la luz y a hormonas; estas señales afectan también tanto a la ATPasa de  $H^+$  como a los canales de  $K^+$ . La activación de la ATPasa de  $H^+$  conduce a un hiperpolarización de la membrana y a una consecuente apertura de los canales de  $K^+$ ; la entrada de  $K^+$  produce influjo de agua, lo cual incrementa el turgor y el aumento de volumen de la célula [104,10]

La ATPasa de  $H^+$  también influye en el crecimiento celular. La auxina tiene un efecto en la actividad de acidificación por la enzima, lo cual resulta en el relajamiento de la pared celular, ya sea por rompimiento de los enlaces sensibles a ácido ó por activación de enzimas líticas de la pared celular [130]. Como consecuencia, la pared celular se relaja bajo la presión de turgor de la célula, y nuevamente se requiere de la ATPasa de  $H^+$  para compensar la disminución de turgor que acompaña a la elongación celular, por medio del transporte de solutos que propicien la absorción de agua.

Otra proteína importante en este proceso es la acuaporina [31], la cual se encuentra en la membrana de la vacuola y en la membrana plasmática. Esta proteína permite el flujo rápido de agua como una respuesta a la presión osmótica, permitiendo así su conversión en presión de turgor.

#### Regulación del pH celular.

La ATPasa de  $H^+$  tiene un pH óptimo de 6.5, es decir, bastante más ácido que el pH fisiológico del citoplasma de las células vegetales (cerca de 7.2 a 7.5). Por lo tanto, cuando ocurre una acumulación de protones en el interior de la

célula se incrementa la actividad de esta enzima, lo que resulta en una expulsión del exceso de protones [104].

La alcalinización del citoplasma, que puede resultar de un incremento en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , puede conducir a eventos celulares como respuesta a señales hormonales o de desarrollo [16,88]. Consecuentemente, la ATPasa de  $H^+$  puede mediar en la vía de transducción de señales, más que ser el blanco final.

Como puede esperarse de una enzima que está involucrada en varios procesos de importancia fisiológica, la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática de plantas, se encuentra altamente regulada por una variedad de mecanismos que ocurren en diferentes niveles de su expresión [157].

Los estudios de genética molecular han demostrado que existen varios genes que codifican para la ATPasa de  $H^+$  en el mismo organismo [157]. El número de miembros de esta familia de genes en *Arabidopsis* es de 10 [73] llamados AHA#; en *Lycopersicon* [50] existen siete secuencias (LHA#) que codifican para esta enzima y hay al menos cuatro genes identificados en la familia PMA# de *Nicotiana glauca* [109]. En otras especies también se han reportado casos similares, como en *Oryza sativa* [118,169], en *Vicia faba* [76], en *Solanum tuberosum* [71] y en *Zea mays* [53,81]. La existencia de familias de genes es ciertamente uno de los mayores factores que permite la regulación fina de la ATPasa de  $H^+$ , puesto que en esta forma se permite que diferentes miembros de la familia tengan una secuencia promotora distinta que dirija la expresión diferencial de un modo específico dependiente del tejido ó de la etapa de desarrollo [157].

La expresión de los diferentes miembros de la familia génica de ATPasa de  $H^+$  en plantas, ha sido investigada por análisis tipo Northern blot, usando GUS-A como gene reportero unido a la secuencia promotora del gene de la ATPasa de  $H^+$  [44,105]. Esta aproximación es específica para el gene estudiado, pero deja de lado los posibles cambios post-transcripcionales que pueden regular el gene estudiado. Empleando esta técnica se ha demostrado que AHA3 se expresa en los tejidos del floema [44]. El floema es el componente del sistema vascular responsable de la circulación de carbohidratos, aminoácidos y algunas hormonas vegetales. Además de estar presente en el floema, AHA3 se encuentra en el polen y en el funículo en desarrollo de la semilla, en el micropilo y la cázala. Estos resultados concuerdan con la inmunocitocalización de la enzima [45].

La transcripción de AHA10, otro miembro de la familia de genes de ATPasa de  $H^+$  en *Arabidopsis*, se efectúa principalmente en los tejidos de integumento que rodean al embrión [79]. Otros miembros muestran menor especificidad en su expresión. El gene PMA1 de tabaco, aparece expresado en la capa celular de la epidermis de la raíz, el tejido profundo del tallo y en las células guarda [105].

La inmunocitocalización ha sido otra herramienta en estos estudios que complementa la información con los estudios de expresión génica. Esta técnica inmunológica permite demostrar directamente la presencia de la enzima, pero no es posible distinguir entre isoenzimas.

Empleando esta última técnica, se ha detectado que la ATPasa de  $H^+$  se encuentra localizada en las células guarda y en las células del floema [121,166], especialmente en las células de transferencia que se encuentran cerca de los extremos de los haces del floema [18]. Todas estas células y tejidos tienen una función relacionada al transporte, absorción ó secreción de solutos, por lo que requieren de la presencia de la ATPasa de  $H^+$ .

La regulación a nivel transcripcional es responsable de la distribución específica de la enzima en diferentes tejidos. Sin embargo, se ha reportado [105] que en el caso de *AHA3* se encuentra también regulada por factores ambientales y de desarrollo, por lo que parece que la regulación traduccional también puede afectar la expresión de algunas isoenzimas. Varios mRNA de PMA (*PMA1*, *PMA3* y *PMA4*) contienen en su secuencia líder (aquella que se localiza en el extremo 5' hacia arriba del codón de inicio AUG) un marco de lectura abierto [109,123]. Esta característica puede influir en el control traduccional, como fue demostrado en el caso de *PMA1* [105].

En otro nivel de regulación, la ATPasa de  $H^+$  también puede ser regulada post-traduccionalmente por una modulación directa en la actividad de la enzima. Se sabe que esta enzima se puede regular por el dominio autoinhibitorio localizado en la región del carboxilo terminal de la proteína [119]. El tratamiento proteolítico de la ATPasa de  $H^+$  con tripsina y quimiotripsina en presencia de ATP resulta en la liberación de un segmento terminal de la enzima con un peso molecular de 7 KDa, concomitante a la activación del bombeo de protones a través de la membrana. La evidencia de que el segmento liberado proviene de la región del carboxilo terminal está dada por el mapeo del sitio de rompimiento con tripsina mediante anticuerpos específicos contra secuencias de ese extremo.

Varios otros son los factores que pueden modular la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, entre ellos se puede señalar a fitoreguladores como la auxina, fitotoxinas como la fusicocina, y la modificación covalente por fosforilación/desfosforilación.

Sobre el efecto de la auxina, se ha observado que en coleótilos de maíz, la hormona induce un incremento en la cantidad de enzima detectable por anticuerpos específicos, este aumento se debe a la síntesis *de novo*, ya que el efecto de auxina es inhibido al añadir cordicepina y cicloheximida, los cuales funcionan como inhibidores de la síntesis de proteínas [69]. De esta forma se ha propuesto que la auxina tiene un efecto sobre la síntesis de la enzima, la cual es transportada por exocitosis en vesículas secretoras que se incorporan en la membrana plasmática.

La toxina fusicocina tiene un efecto estimulador en la cinética de la enzima, similar al que se presenta por proteólisis de la enzima, por lo que se sugiere que interfiere con la acción del dominio autoinhibitorio [82]. En consistencia con esta hipótesis, el tratamiento con fusicocina no incrementa más la actividad de la ATPasa de  $H^+$ .

El hecho de que la toxina ejerza su efecto activador en vesículas de membrana aisladas de hojas pretratadas con fusicocina [129], pone de manifiesto

que las membrana y el medio de ensayo para ATPasa contiene todos los elementos necesarios para lograr la respuesta.

La fusicocina no se une directamente a la molécula de ATPasa, sino que interactúa con una proteína membranal receptora de la toxina. La secuenciación de una proteína purificada que une fusicocina [86,97], muestra una alta similitud (cerca del 90%) con miembros de la familia de proteínas cerebrales 14-3-3. Algunas de estas proteínas son inhibitorias de la proteína cinasa C [1], la cual es una cinasa que se activa por  $Ca^{2+}$ .

La modulación por fosforilación/desfosforilación es una hipótesis atractiva; puesto que se sabe que en levadura y en plantas, la ATPasa de  $H^+$  es fosforilada por una cinasa de proteínas asociada a la membrana. Existe evidencia que sugiere que una cinasa de proteínas dependiente de calmodulina puede regular a la ATPasa de  $H^+$  [150], y que la actividad de la enzima se encuentra inhibida por  $Ca^{2+}$  a concentraciones fisiológicas [84]. Además, se han caracterizado en *Arabidopsis thaliana* una familia de genes que codifican para cinasas de proteínas dependientes de calmodulina, y algunas de ellas pueden ser asociadas a la membrana [157].

Por otro lado, se especula que *in vivo*, una cinasa de proteína dependiente de  $Ca^{2+}$  y/o calmodulina, puede mediar la fosforilación de la ATPasa de  $H^+$ , disminuyendo la actividad. Si la actividad de esta cinasa es inhibida por el receptor unido a fusicocina, entonces la actividad de la enzima puede resultar incrementada [6].

## OBJETIVO E HIPOTESIS

Durante el proceso de germinación de una semilla, el crecimiento y la elongación celulares son determinantes. Dos son los eventos principales que están asociados a la elongación de una célula vegetal:

- i) desrigidización de la pared celular, para facilitar el aumento en el volumen de la célula y que es promovida por la acidificación del espacio apoplástico.
- ii) translocación de solutos al interior de la célula para mantener el potencial osmótico y proveer los nutrimentos necesarios para el posterior crecimiento celular.

Entonces, se plantea como hipótesis que una enzima como la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática puede asociarse al proceso de germinación durante la fase en que existe elongación celular, puesto que la actividad de esta enzima es el bombeo de protones acoplado a la hidrólisis de ATP. Este bombeo hacia el exterior celular; genera un gradiente de potencial electroquímico que promueve el transporte de solutos a través de los transportadores secundarios y acidifica la región del espacio apoplástico.

El presente trabajo pretende cuantificar la actividad enzimática de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, evaluada tanto por la hidrólisis de ATP como por el bombeo de protones, en la fase de elongación celular durante la germinación de embriones de maíz. De forma que se pueda establecer una asociación entre la participación de esta enzima y uno de los diversos eventos celulares que ocurren durante el proceso de germinación como es la elongación.



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Material biológico.

Se disecaron manualmente embriones del maíz híbrido H-355 (cosecha primavera-verano 1993/1993) con la ayuda de navaja de un solo filo. Las semillas fueron almacenadas en refrigeración. Una vez que los embriones fueron extraídos, estos fueron puestos en refrigeración hasta el momento de ser usados.

### 2. Imbibición de embriones.

Los embriones fueron desinfectados superficialmente usando una solución esterilizada de hipoclorito de sodio, que fue preparada a partir de una dilución en agua 1:37 de una solución comercial con un contenido de 6% de cloro activo. Se pusieron en contacto 3 gramos de embriones con 20 ml de esta solución, agitando por dos minutos y posteriormente se decantó la solución y se lavó dos veces con igual volumen de agua destilada estéril. Todo el procedimiento se hace en campo estéril bajo el mechero.

Los embriones ya desinfectados son transferidos a una caja de petri de 14 cm de diámetro con un disco de papel filtro de igual diámetro a la que se le añadieron de 15 a 18 ml de agua destilada estéril. La caja de petri, junto con el disco de papel filtro también fueron esterilizados en autoclave.

Los embriones embebidos en la caja de petri se incubaron a 30°C en la oscuridad, durante los tiempos indicados en cada experimento.

### 3. Determinación del porcentaje de germinación y acumulación de peso húmedo.

Se pusieron a embeber lotes de 20 embriones en cajas de petri de 15 cm de diámetro. Se usó un lote para cada uno de los tiempos necesarios durante el seguimiento de la germinación. Los tiempos utilizados fueron de 4, 8, 12, 16, 20, 30, 36 y 48 horas. En los tiempos más largos, mayores a 12 horas, se agrega un mililitro de agua estéril cada 12 horas para compensar la pérdida por evaporación.

A cada uno de los tiempos mencionados, en el lote correspondiente se contabilizaron los embriones que ya presentaban protusión de la radícula y se consideraron como germinados, tomando este número como el porcentaje de germinación.

Para cada lote, al final del tiempo de imbibición correspondiente, se tomó el lote completo y se midió el peso final. Se reportó la acumulación de peso húmedo como la relación del incremento en peso (final menos inicial) después del periodo de imbibición, entre el peso inicial del lote en estado seco.

#### 4. Preparación de vesículas enriquecidas en membrana plasmática de embriones de maíz en germinación.

##### A) Trituración del embrión.

Al término del periodo de imbibición, los embriones se congelaron con nitrógeno líquido, y fueron triturados en mortero de porcelana, hasta obtener un polvo fino que se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizado.

##### B) Obtención de Homogenado sin núcleos (H-N).

El sólido obtenido de la trituración de los embriones, se resuspendió con solución amortiguadora para homogenizar\* en relación de 1 gramo de embrión por mililitro de solución. La mezcla resultante se homogenizó con la ayuda de un homogenizador de tejidos a una velocidad de 12,000 rpm durante cuatro minutos, haciendo una pausa de cuatro minutos en la que se mezcló la masa obtenida y nuevamente se usó del homogenizador por igual tiempo y velocidad. El producto se filtró a través de cuatro capas de gasa que fueron previamente humedecidas con agua destilada. El filtrado se conservó en un recipiente en baño de hielo. El sólido se bajó y fue resuspendió nuevamente con solución amortiguadora de homogenización, esta vez con aproximadamente la mitad del volumen usado anteriormente y se homogenizó de igual forma. El filtrado resultante de mezcló con el anterior y el volumen total se centrifugó a 5000 g por 10 minutos.

Al final de la centrifugación se separó la fase acuosa intermedia entre una fase superior de aspecto lipídico y una inferior, con la ayuda de una pipeta pasteur. Esta fase así recuperada, se denominó fase de homogenado sin núcleos (H-N).

Se determinó la cantidad de proteína presente en esta preparación por el método de Lowry, que se describe mas adelante.

##### \*Solución amortiguadora de homogenización:

Sacarosa 250 mM, Tris/HCl 70 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, ATP 1 mM. Poco antes de ser utilizada, esta solución se complementó con inhibidores de proteasas y estabilizadores redox, las concentraciones finales de cada uno de ellos son las siguientes:  $\beta$ -mercaptoetanol 15 mM, Quimiostatina 7  $\mu\text{g/ml}$ , TLCK 50  $\mu\text{g/ml}$ , TPCK 100  $\mu\text{g/ml}$ , DTT ó DTE 4 mM

##### C) Sistema de reparto en fases acuosas de Polietilenglicol/Dextrán

Este sistema de reparto permite la separación de las vesículas de membrana plasmática que son recuperadas en la fase de polietilenglicol, los fundamentos son brevemente descritos en el apéndice A.

El método que se describe a continuación es el que se estandarizó como óptimo, después de los ensayos realizados y que se describen en parte de los resultados

Se requiere de las siguientes soluciones concentradas:

a) Dextrán T-500, 20% p/p.

Esta solución se preparó pesando 20 gramos de dextrán sólido y agregando agua hasta completar un peso final de 100 gramos. Para lograr la disolución total es recomendable poner la mezcla en baño de hielo con agitación constante. El estándar fue repartido en frascos Nalgene® y puestos en congelación, hasta el momento de su uso en que se descongelaron a 4°C con un día de anticipación.

b) Polietilenglicol (Peg) 3350, 40% p/p.

Se preparó pesando 40 gramos de sólido y agregando agua hasta completar un peso total de 100 gramos. Igual que en el caso anterior se disolvió en baño de hielo. Se tomaron las mismas recomendaciones anteriores.

c)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M, pH 7.8

Se preparó la solución pesando el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sólido previamente secado en horno a 120°C, y ajustando el pH con hidróxido de potasio.

Se preparó una mezcla de fases en un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad, agregando las siguientes cantidades:

	<i>Cantidad agregada</i>	<i>Concentración final</i>
Dextrán T-500 20%	11.52 g	6.4%
Peg 3350 40%	5.76 g	6.4%
Sacarosa sólida	3.05 g	330 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2 M pH 7.8	0.675 ml	5 mM
$\text{H}_2\text{O}$	cbp 27 g	

Sobre esta mezcla se agregó el volumen de H-N necesario que contenía aproximadamente 100 mg de proteína (de 4.5 a 5.0 ml), y finalmente se ajustó el peso a un total de 36 gramos agregando una solución de sacarosa 330 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM pH 7.8.

La mezcla final se agitó por inversión repetida 25 veces y se centrifugó a 1500 g por 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se recuperó la fase superior correspondiente a Polietilenglicol y que contenía las vesículas de membrana plasmática (VMP). Se diluyó esta fase con una solución de sacarosa 250 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0, con una relación de volúmenes de 1:1, y la dilución se centrifugó a 100,000g por cuatro horas a 4°C. El sedimento membranar obtenido se resuspendió en solución de sorbitol 250 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0, que fue complementada poco antes de su uso con los siguientes compuestos: Quimiostatina 7 µg/ml, TLCK 50 µg/ml, TPCK 100 µg/ml, DTT ó DTE 4 mM

La suspensión final corresponde a una fase enriquecida en vesículas de membrana plasmática (VMP)

## 5. Actividad de hidrólisis de ATP

La actividad de la enzima se determinó por cuantificación espectrofotométrica del fosfato liberado, según el método de González-Romo *et al.* [63].

El medio de reacción contenía Sorbitol 250 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0, ATP 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM. La reacción se inició por la adición de VMP, a una

concentración final de 0.1 mg/ml. La reacción se incubó de una a dos horas en baño a temperatura de 30°C, y se detuvo por la adición de SDS (99.9% de pureza) a una concentración final de 12% (añadiendo un volumen igual al de reacción de un estándar de SDS al 24%)

Se utilizaron inhibidores específicos para otras ATPasas que pueden estar presentes, y así de esta forma conocer el porcentaje de actividad inhibible en cada caso; lo que nos permite conocer el grado de enriquecimiento en VMP. Se espera obtener una mayor inhibición por aquellos inhibidores que sean específicos para la ATPasa de membrana plasmática.

Los inhibidores que se emplearon fueron los siguientes, se indica la concentración final usada y la actividad de ATPasa a la que inhiben.

<i>Inhibidor</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Enzima blanco</i>
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.15 mM	ATPasa de
Eritrosina B	0.015 , 0.05 mM	Membrana Plasmática
NaN <sub>3</sub>	1.0 mM	ATPasa de
Oligomicina	0.01 mg/ml	Mitocondria

## 6. Cuantificación de fosfato inorgánico

Para este ensayo se requiere que todo el material empleado se encuentre libre de fosfatos.

Se requiere de las siguientes soluciones:

solución B: Ácido ascórbico 12% en HCl 1 N

solución C: Molibdato de amonio 2% en HCl 1N

solución E: Citrato de sodio 2%, metaarsenito de sodio 2% y ácido acético 2%

Se tomaron 150 µl de la mezcla de reacción enzimática al término del tiempo de incubación y se mezclaron con 150 µl de SDS 24%. Sobre esta solución se añadieron 0.3 ml de una dilución 1:1 en volumen de solución B + C. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 a 10 minutos y se agregó 0.45 ml de solución E. Se dejó desarrollar color a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. Se lee absorbancia a 850 nm.

Curva Estándar.

Se determinó a partir de una dilución de un estándar 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , diluyendo 10, 20, 30, 40 y 50 µl en agua cbp 150 µl. Se agregó 150 µl de solución SDS 24% y se agregaron el resto de reactivos de la manera ya indicada. El intervalo de cuantificación correspondiente es de 10 a 50 nmol de fosfato en el volumen de ensayo.

## 7. Actividad de acidificación por VMP.

La acidificación por VMP se determinó por apagamiento de la fluorescencia de ACMA. El medio de reacción empleado contiene sorbitol 250 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y ACMA 1µM.

La reacción se llevó a cabo en una celda de policarbonato para fluorómetro con un volumen final de reacción de 2 ml, con agitación constante y temperatura controlada de 20°C. Los registros fueron realizados en un fluorómetro Shimadzu RF5000U. La longitud de onda de excitación y emisión fue de 415 y 480 nm, respectivamente.

La reacción se inició por la adición de VMP sobre el volumen final de reacción que contenía ya el resto de componentes, se determinó la pendiente negativa de disminución de la fluorescencia hacia el final del trazo de ocho minutos de reacción continua. Al término de este tiempo, se desacopló el sistema con la adición de 20  $\mu$ l de una solución saturada de KCl a temperatura de baño de hielo, y 20  $\mu$ l de una solución etanólica de gramicidina 1 mg/ml. Después de esta última adición se observa la recuperación de la fluorescencia.

## 8. Curva estandar de apagamiento de fluorescencia.

Con la finalidad de poder equiparar las señales de apagamiento de fluorescencia con la formación de un gradiente transmembranal de pH, se prepararon liposomas de asolectina en medios amortiguados a diferente pH y que fueron suspendidos en un medio a un pH diferente. De esta forma, se puede cuantificar el apagamiento de la fluorescencia en función de la diferencia de pH impuesta.

### a) Preparación de liposomas.

Se requiere de una solución estándar de lípidos de asolectina, la cual es una mezcla de lípidos de soya, en éter. La concentración de este estándar es de 300 mg/ml. Se tomaron 15  $\mu$ l de la solución etérea con micropipeta y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml, evitar en lo posible el goteo de la punta. A continuación se evaporó el éter bajo corriente de nitrógeno y se agregaron 0.9 ml de la solución amortiguadora al pH impuesto en el interior de la vesícula. Se dejó un momento bajo la corriente de nitrógeno.

Los lípidos se resuspendieron en el amortiguador mediante agitación vigorosa en vortex y una vez que la suspensión se observó turbia se tomó el volumen y se transfirió a un tubo de ensayo de 11x100 mm. Esta suspensión fue puesta en baño con sonicación, cuidando de no sumergir demasiado el tubo en el baño sino mas bien solo sumergir el fondo del tubo en la superficie del baño. Se sonicó a intervalos espaciados de tiempo hasta que la suspensión antes turbia tuvo una apariencia birrefringente.

### b) Soluciones amortiguadoras.

Las siguientes soluciones se utilizaron para imponer el pH dentro de los liposomas, y son las que se emplearon para la preparación de liposomas.

Sorbitol 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0, 6.91, 6.83, 6.75 y 6.5

Sorbitol 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MES/BTP 20 mM pH 6.25 y 6.0

(pKa MOPS: 7.2, pKa MES: 6.1, pKa BTP: 6.8 y 9.0)

La solución utilizada para imponer el pH externo es igual a la usada como medio de reacción en los ensayos de acidificación e hidrólisis de ATP (Sorbitol 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0)

c) Medición del apagamiento de la fluorescencia.

Este ensayo se realizó con el mismo procedimiento y condiciones que la actividad de acidificación descrita en el apartado anterior. La única variación es que ahora se añaden al medio de reacción 40  $\mu\text{l}$  de la preparación de liposomas en experimentos independientes para cada uno de los pH's impuesto en el interior de los liposomas.

## 9. Determinación Proteína.

Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (126).

Se requieren las siguientes soluciones:

Desoxicolato de sodio 0.15%

Solución CTC:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%,  $\text{CuSO}_4$  0.1% y  $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  (tartrato doble de potasio) 0.2%.

Solución I: mezclar volúmenes iguales de agua y de las soluciones de NaOH 0.8 M, SDS 10%, y CTC.

Reactivo de Folin: diluir en 5 volúmenes de agua 1 volumen de estándar comercial de Sigma Chemical Company.

Se tomaron 0.9 ml de agua destilada en la que se diluyen de 2 a 5  $\mu\text{l}$  de la muestra a cuantificar. Posteriormente se añadieron 0.1 ml de la solución de desoxicolato, 1.0 ml de la solución I, y 0.5 ml del reactivo de Folin. Agitar y esperar 30 minutos a que se desarrolle color. Leer absorbancia a 750 nm.

Curva Estándar.

A partir de un estándar de BSA (albúmina de suero de bovino) de 1 mg/ml. Se agregaron 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{l}$  de la solución estándar mas agua cbp 0.9 ml. Se desarrolló color de la manera ya indicada. El intervalo de cuantificación es de 10 a 50  $\mu\text{g}$  de proteína en el volumen de ensayo.

## RESULTADOS

Para cumplir con el objetivo planteado, durante el desarrollo de este proyecto se decidió seguir la siguiente ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

- ✓ Establecer el curso temporal del proceso de germinación para el maíz híbrido H-355, precisando de este modo los tiempos de aparición de las sucesivas fases de la germinación y el período en el que se presenta una elongación celular activa; misma que está relacionada con el tiempo de protusión de la radícula. Para ello se determinó el incremento en peso húmedo durante el tiempo de imbibición.
- ✓ De los embriones embebidos por diferentes tiempos, se obtuvieron fracciones de vesículas de membrana plasmática por medio de la técnica de reparto en fases acuosas, una vez que se establecieron las condiciones óptimas de aislamiento.
- ✓ Con estas preparaciones de vesículas de membrana plasmática se determinó la actividad de hidrólisis de ATP por cuantificación espectrofotométrica de fosfato liberado, evaluando la inhibición específica de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática por vanadato y eritrosina. De este modo, se pudo conocer el grado de pureza de las preparaciones obtenidas.
- ✓ Asimismo, con estas vesículas de membrana se cuantificó además del patrón de hidrólisis de ATP, la actividad de bombeo de protones por la ATPasa, mediante la medición del  $\Delta pH$  generado a través de las vesículas de membrana, haciendo uso de aminos fluorescentes.

### 1. Determinación del porcentaje de germinación y curva de imbibición de embriones de maíz de la línea H-355.

Paralelamente a la purificación de las membranas, se realizaron los experimentos para conocer el porcentaje de germinación y la curva de imbibición para los embriones del maíz híbrido H-355, con el cual pudieron obtenerse vesículas de membrana plasmática con un rendimiento e inhibición por vanadato aceptables, de acuerdo a los resultados que se presentan en la sección dos de este capítulo. En cuanto a los resultados sobre el porcentaje de germinación y la curva de toma de agua, estos se muestran en la Figura 7, donde puede observarse que a las 18 horas de imbibición, la población ha alcanzado casi el 90% de germinación, y es en este tiempo cuando se dio la transición entre la segunda y tercera fase de imbibición. Es en esta transición en la que se ha documentado que se produce la protusión de la radícula y la cual está determinada por la elongación celular del tejido embrionario. Esto último se confirmó por los resultados presentados en la Figura 8, en la que se muestra que alrededor de las 18 horas se produjo la mayor pendiente, misma que correspondió a una mayor velocidad en la elongación de la radícula.

Comparando los resultados de ambas figuras, fue clara la correlación entre los tres parámetros: protusión, elongación radicular, y porcentaje de germinación.

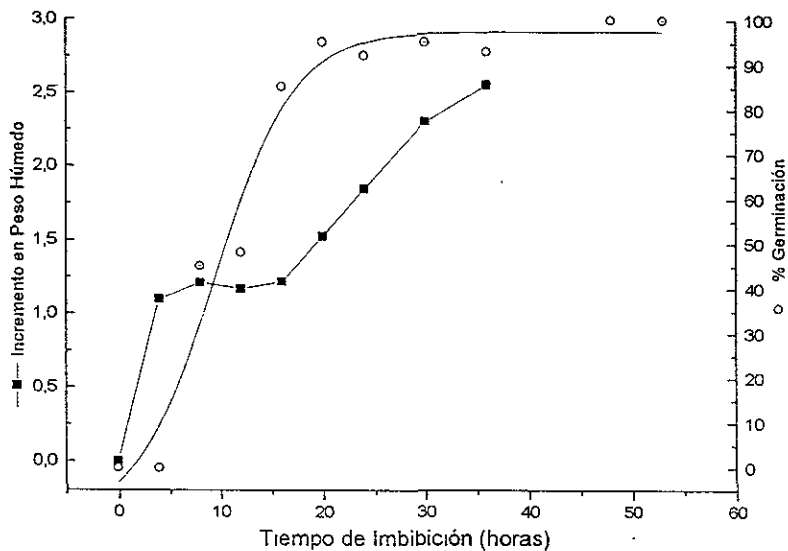


Figura 7. Determinación del porcentaje de germinación y curso temporal de la germinación en embriones de maíz H-355. Se utilizó una población de 20 embriones para cada uno de los tiempos señalados. Fuerin embe

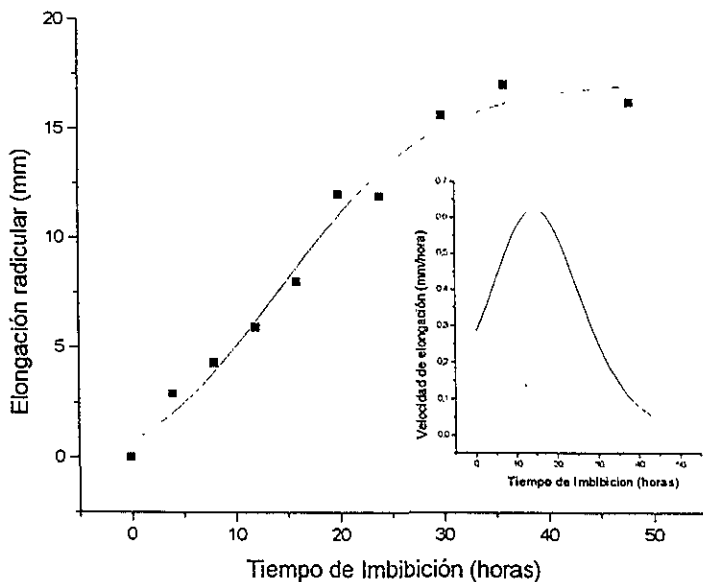


Figura 8. Elongación radicular en embrones de maíz H-355. En el recuadro se muestra la velocidad de elongación vs horas de imbibición, este recuadro se obtuvo a partir de la derivación del ajuste de la gráfica de elongación radicular vs horas de imbibición. Se utilizó una población de 40 embriones, promediando la elongación de ellos a cada uno de los tiempos marcados.



## 2. Obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP) mediante reparto en fases acuosas.

De los primeros puntos a desarrollar experimentalmente, fue la obtención de una fracción enriquecida en vesículas de membrana plasmática por medio de la técnica de reparto en dos fases acuosas (Polietilenglicol/Dextrán). Esta técnica tiene como fundamento de la separación, la distribución diferencial de las membranas en las fases debido a la carga superficial específica que presentan los diversos tipos de membrana (ver apéndice A). Las vesículas de membrana plasmática se localizan preferentemente en la fase de Polietilenglicol.

Primeramente se ensayó el reparto de fases con dos líneas de maíz. A continuación, en la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en la purificación de vesículas de membrana plasmática con los dos híbridos de maíz H-355 y H-220.

Tabla 1. Purificación de vesículas de membrana plasmática por el método de reparto de fases, en dos diferentes híbridos de maíz.

	<i>Línea de maíz</i>			
	<i>H-355</i>		<i>H-220</i>	
prot. en H-N (mg/ml)	10.57		9.64	
prot. en reparto (mg)	95.2		67.4	
Concentración polímeros (%)	6.4	6.8	6.4	6.8
VMP de U <sub>1</sub> (mg)	0.1604	0.053	0.1904	0.083
Rendimiento x10 <sup>3</sup>	1.68	0.56	2.82	1.23
inhibición por vanadato (%)	67.2	72	38.5	59.7
Act. Total nmol/(mg·h)	1543.1	2346.9	2081	2387.4

Se utilizaron 4 g de embrones de cada línea, que fueron embebidos por 24 horas a 30°C y en la oscuridad. La fracción H-N fue aplicada a dos sistemas de fases con las concentraciones de polímeros indicadas, cada uno de ellos con la cantidad en mg de proteína señalada.

Como se muestra en la Tabla 1, el primer intento para la obtención de las VMP fue probar el reparto con las fracciones H-N de estos embriones, con 6.4% y 6.8% de ambos polímeros en un reparto de fases (U<sub>1</sub>). Los resultados del experimento están especificados en la misma tabla, en la que se observa que la mejor condición de reparto en cuanto a la recuperación de proteína es la de 6.4%, que en ambas líneas fue mayor que en la condición de 6.8%; y es el híbrido H-355 en esta condición de 6.4% el que presentó un mayor porcentaje de inhibición

de la actividad de ATPasa por vanadato respecto a la línea H-220 en la misma condición de purificación (67.% vs 38.5% respectivamente).

Puesto que con la línea H-355 se obtuvieron mejores resultados en términos de la inhibición por vanadato y recuperación de proteína, se decidió entonces continuar probando con las condiciones de reparto con este material. El siguiente punto fue observar el efecto de la cantidad de proteína de la fracción H-N que era sometida a reparto en el sistema de fases. Como puede observarse en la Tabla 2, un aumento del doble en la cantidad de proteína cargada al sistema, disminuyó el rendimiento de recuperación de proteína en la condición de 6.4% de polímeros. Esto podría interpretarse como una saturación del sistema y una fuga de las vesículas de membrana plasmática hacia la fase inferior debido a un aumento en la cantidad de proteína.

Tabla 2. Efecto de la cantidad de proteína en el reparto de fases con el híbrido de maíz H-355

	<i>mg. de proteína en reparto</i>	
	<i>100 mg</i>	<i>200 mg</i>
Concentración polímeros (%)	6.4%	6.4%
VMP de U <sub>1</sub> (mg)	0.227	0.334
Rendimiento x10 <sup>3</sup>	2.27	1.70
inhibición por vanadato (%)	77	80
Act. Total nmol/(mg·h)	1573.3	1346.6

Se utilizaron 9 g de embriones en idénticas condiciones de imbibición a la mencionadas en la tabla 1. Se obtuvo la fracción H-N, a partir de la cual se aplicó la cantidad de proteína indicada a un reparto de fases acuosas con la concentración de polímeros señalada.

La siguiente variación que se probó en el reparto fue el efecto del KCl en cuanto a la recuperación de proteína, ya que de experimentos anteriores se había observado que la disminución y la ausencia de KCl en el sistema de fases aumentaba la cantidad de proteína recuperada. Entonces se comparó el reparto en condiciones de 6.4 % de concentración de polímeros más KCl 5 mM, que había sido la condición habitual, con un reparto en igual porcentaje de polímeros pero sin KCl. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3.

Puede observarse que la eliminación de KCl efectivamente aumentó el rendimiento; y que la inhibición por vanadato en ausencia de KCl fue semejante a la que se había observado en las preparaciones anteriores. La actividad de hidrólisis de ATP en esta condición, también fue semejante a las anteriores.

Tabla 3. Efecto del KCl en un reparto de fases con 6.4% de polímeros con embriones del híbrido H-355.

	<b>Condición del reparto</b>	
	<b>6.4% (+ KCl 5 mM)</b>	<b>6.4% (- KCl 5 mM)</b>
<b>VMP de U<sub>1</sub> (mg)</b>	192.42	273.2
<b>Rendimiento x10<sup>3</sup></b>	1.9	2.7
<b>% inhibición por vanadato</b>	76	78

Se utilizaron 5 g de embriones que fueron embebidos en las condiciones mencionadas. De la fracción H-N obtenida, se aplicaron 100 mg a cada uno de los sistemas de fases indicados.

En cuanto a la actividad de hidrólisis de ATP y a su inhibición por vanadato en las VMP obtenidas, las determinaciones realizadas, indican (Tabla 4) que las VMP aisladas de los embriones del híbrido H-355 en una condición de 6.4% de polímeros tuvieron una actividad de ATPasa sensible a vanadato en cerca de un 75%. Esta inhibición sugiere que las preparaciones de vesículas de membrana obtenidas bajo las condiciones mencionadas, se encuentran enriquecidas en membrana plasmática.

Con estos resultados, puede decirse que quedaron establecidas las condiciones para la obtención de vesículas de membrana plasmática a partir de embriones de la línea H-355 embebidos por 24 horas, mismas que incluyeron una concentración de ambos polímeros de 6.4%, un único reparto sin KCl y aplicando 100 mg de proteína al sistema.

### 3. Actividad de Hidrólisis de ATP.

Se tomó la hidrólisis de ATP como uno de los dos parámetros funcionales de la enzima en las vesículas de membrana plasmática y la inhibición de esta actividad por vanadato como un parámetro del grado de pureza de las preparaciones obtenidas. Entonces, tomando en cuenta ambos factores podíamos conocer la magnitud de la hidrólisis total de ATP por las vesículas obtenidas a diferentes tiempos de imbibición y saber cual era la proporción de esta actividad debida a la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. Puesto que en nuestras preparaciones existía una contribución minoritaria de la ATPasa mitocondrial a la hidrólisis total de ATP, usamos azida como un inhibidor específico de esta enzima. De este manera, por el uso de inhibidores específicos podíamos conocer cual era la contribución de cada una de las ATPasas presentes en la preparación, la de membrana plasmática y la mitocondrial, de acuerdo a la inhibición por vanadato y azida, respectivamente.

Esta actividad enzimática se determinó mediante la cuantificación espectrofotométrica de la cantidad de fosfato liberado de la hidrólisis de ATP, en

presencia o ausencia de inhibidores específicos de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática (ion vanadato) y de la mitocondrial (ion azida).

Los resultados de la Tabla 4 corresponden a la determinación de la actividad enzimática de ATPasa, con diferentes preparaciones de vesículas de membrana obtenidas a partir de embriones embebidos por 24 horas y bajo las condiciones de reparto de fases ya descritas en la sección anterior.

Tabla 4. Actividad de Hidrólisis de ATP en VMP aisladas de embriones embebidos por 24 horas

	<i>Actividad</i> ( $nmol\ Pi \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$ )	<i>% de Inhibición</i>
<b>Control</b>	1427.06 $\pm$ 155.46	0
<b>+ Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub></b> <b>(0.15 mM)</b>	354.77 $\pm$ 4.97	75.14
<b>+ NaN<sub>3</sub></b> <b>(2.0 mM)</b>	1187 $\pm$ 1.44	16.78

Los embriones fueron embebidos por 24 horas a 30° C y en la oscuridad. Se utilizaron 30  $\mu g/ml$  de proteína membranaral en el medio de reacción que contenía independientemente los inhibidores señalados.  $n=5$ , ensayos independientes y cada uno de ellos por triplicado.

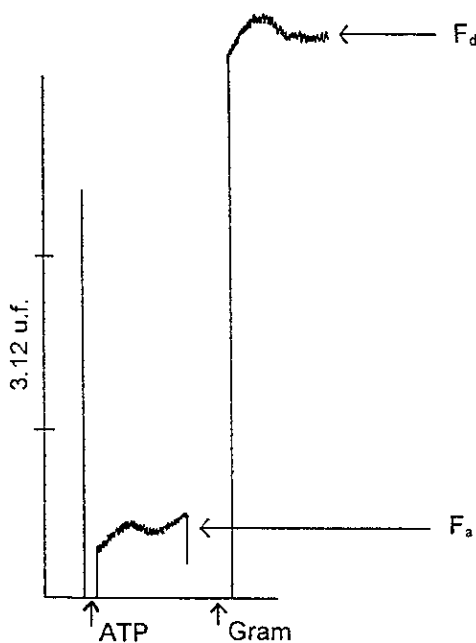
De acuerdo a estos resultados, las preparaciones de vesículas de membrana que se obtuvieron bajo las condiciones de reparto de fases descrito, fueron capaces de hidrolizar ATP en magnitudes aceptables a nuestro sistema de detección de Pi. Esta actividad enzimática podía adjudicarse a la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática según el mayor porcentaje de inhibición (75%) debido a vanadato, confirmando los resultados obtenidos durante la purificación de las vesículas de membrana, existiendo además un porcentaje menor de hidrólisis de ATP asociado a la ATPasa mitocondrial.

Una vez que se estableció que estas preparaciones presentaban una actividad mayoritaria de ATPasa del plasmalema, se procedió al establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para monitorear la formación de un gradiente transmembranaral de protones ( $\Delta pH$ ) con las vesículas obtenidas, el cual pudiera ser debido a la actividad de bombeo de  $H^+$  por la ATPasa de la membrana plasmática. Esta actividad de acidificación constituyó el segundo parámetro funcional estudiado de la enzima.

#### 4. Actividad de acidificación en VMP por bombeo de $H^+$

Esta se determinó por la cuantificación del apagamiento de la fluorescencia de ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina), debida a la formación de  $\Delta pH$  transmembranaral. Los fundamentos de esta técnica son descritos brevemente en el apéndice B. Las condiciones experimentales iniciales para la medición del  $\Delta pH$  transmembranaral fueron: a) Medio de reacción: Sacarosa 250 mM, MOPS/BTP 20 mM, pH 7.0, KCl 50 mM, KNO<sub>3</sub> 50 mM, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, b) Temperatura: 20°C, c) Volumen total: 1 ml, d) Cantidad de proteína membranaral: 100  $\mu g$ . La

reacción se inició con la adición de ATP al medio, mismo que ya contenía el resto de los componentes. El sistema se desacopló por la adición de de Gramicidina a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Con estas condiciones se obtuvo el tipo de trazos que se muestra en la Figura 9.



**Figura 9.** Apagamiento de la fluorescencia de ACMA, por inicio de la reacción de acidificación con ATP en VMP aisladas de embriones embebidos por 24 horas.

A partir de estos trazos de fluorescencia se calculó el porcentaje de apagamiento (%Q) de la siguiente forma:  $\%Q = 100(F_d - F_a)/F_d$  donde  $F_d$  corresponde a la fluorescencia observada por efecto de la adición del desacoplante sobre la suspensión de vesículas y  $F_a$  es la fluorescencia que se obtiene en estado estacionario (sin cambio en el tiempo) después de iniciar la reacción (Figura 9).

Durante la realización de estos experimentos se notó que los trazos resultantes presentaban un aumento en la fluorescencia a partir de la adición del ATP (Figura 9), contrario a los gráficos reportados usualmente en la literatura para experimentos del mismo tipo, en los que se presenta una disminución de la fluorescencia a partir del inicio de la reacción (vease el análisis de resultados, pp. 60). Bajo estas condiciones y con este tipo de trazos, se determinó que en presencia de vanadato ó azida en el medio de reacción, la recuperación de la fluorescencia posterior a la adición del desacoplante ( $F_d$ ) fue menor en presencia de los inhibidores  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (0.3 mM) y  $\text{NaN}_3$  (4 mM), siendo estos valores de 35 y 15% respecto al control, respectivamente. La magnitud de la inhibición por azida

de sodio correlacionaba con la inhibición determinada en la actividad de hidrólisis de ATP (cerca al 20 a 25%), sin embargo, la inhibición por vanadato en la señal de fluorescencia estaba por debajo de la observada en la actividad de hidrólisis.

Como posibles explicaciones a esto estaba que: aunque la concentración de vanadato es del doble respecto a la usada en el ensayo de hidrólisis, la concentración de proteína en este ensayo era mayor (0.1 mg/ml) que en el de hidrólisis (0.03 mg/ml). Por ello se decidió aumentar la concentración de vanadato a 1.0 mM; con esta variación el porcentaje de inhibición también aumentó (hasta un 47%). Sin embargo, aunque la concentración de vanadato se aumentó hasta casi siete veces respecto a la usada en el ensayo de hidrólisis, el porcentaje de inhibición en el ensayo de acidificación aún era menor que el obtenido en el de hidrólisis de ATP. Como segunda opción se consideró preincubar la enzima en presencia de vanadato a la concentración de 1.0 mM, y al igual que en los experimentos anteriores, iniciar la reacción con la adición de ATP. En este caso, la preincubación de las membranas por 40 minutos a temperatura de baño de hielo en presencia del inhibidor de la ATPasa de membrana plasmática aumentó el porcentaje de inhibición hasta un 77%, valor que ya era cercano al que se obtenía habitualmente en el ensayo de hidrólisis de ATP. Los trazos de estos resultados se presentan en la Figura 10.

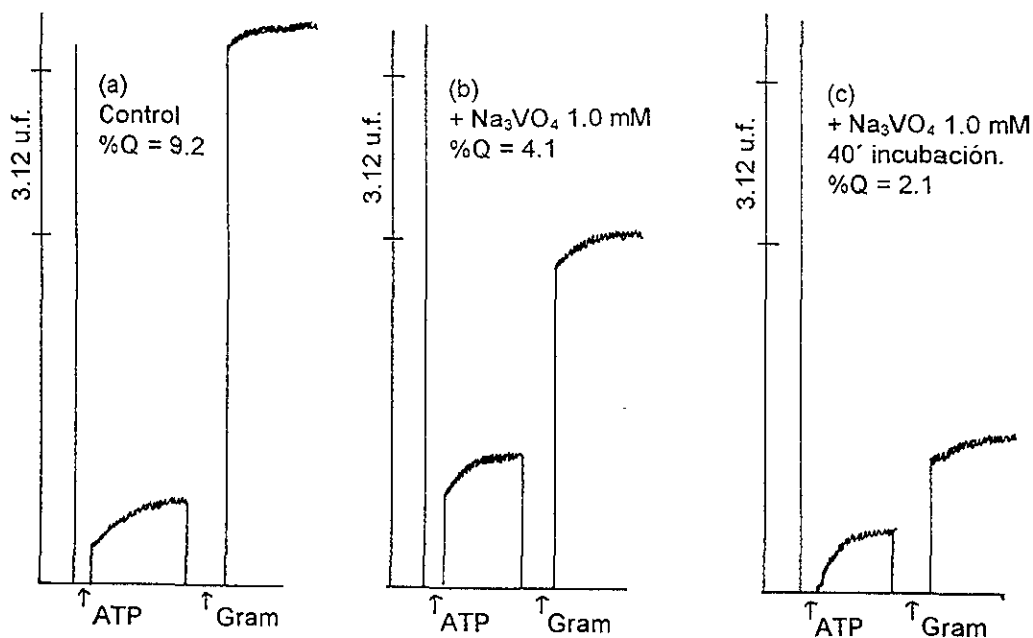


Figura 10. Inhibición de la señal de fluorescencia por vanadato sin preincubar (b) y preincubando la enzima por 40 minutos (c). El trazo control (a), presenta igual comportamiento tanto para la enzima sin preincubar como para la enzima preincubada. La disminución de la señal de fluorescencia después de la adición de gramicidina, es indicativa de un menor  $\Delta\text{pH}$  formado.

Lo siguiente que se ensayó fue el desacoplamiento de las membranas con cantidades crecientes de Gramicidina en un caso y con Nigericina en otro, con la finalidad de poder establecer que el apagamiento de fluorescencia era debido a la formación de un  $\Delta$ pH transmembranal producido por la ATPasa y que podría ser colapsado gradualmente por la adición de cantidades crecientes de desacoplante, reflejándose esto en la recuperación creciente de la fluorescencia.

Los resultados del porcentaje de apagamiento para estos experimentos se reportan en la Tabla 5.

Tabla 5. Desacoplamiento de las vesículas de membrana plasmática

<i>Gramicidina</i>		<i>Nigericina</i>	
<i>(<math>\mu</math>g/ml) final</i>	<i>% de Apagamiento</i>	<i>(<math>\mu</math>g/ml) final</i>	<i>% de Apagamiento</i>
3	2.4	20	0.92
6	4.0	40	4.45
10	5.6	60	8.52
15	5.8	80	13.44
20	7.5		
25	8.1		

Las vesículas fueron desacopladas por adiciones sucesivas de Gramicidina ó Nigericina. Se añadieron 50  $\mu$ g de proteína membranar por ml de medio de reacción, en ambas series.

De los datos sobre la acidificación e hidrólisis de ATP en las vesículas de membrana hasta aquí presentados se puede establecer que:

- Las preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas eran capaces de formar un  $\Delta$ pH, puesto que se observaba una recuperación de la fluorescencia por adición de desacoplantes como gramicidina y nigericina.
- Estas preparaciones se encontraban enriquecidas en membrana plasmática, de acuerdo a la inhibición específica de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática por vanadato (75-77%).
- Así mismo, se observó un componente menor de ATPasa de  $H^+$  mitocondrial, según su inhibición específica por azida (15-17%).
- Por otro lado, el porcentaje de inhibición por cada uno de estos inhibidores fue semejante para las dos expresiones catalíticas de la enzima, ya sea que la actividad de la enzima se midiera por hidrólisis de ATP o por el bombeo de  $H^+$ .

Tratando de encontrar las condiciones en las que se pudiera observar un apagamiento inicial de la fluorescencia, asociado a una velocidad de formación del  $\Delta$ pH, se probó cambiar la composición del medio de reacción.

El medio ahora contenía: sorbitol 250 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 7.0, ATP 5 mM,  $MgCl_2$  5 mM. Se sustituyó la sacarosa por sorbitol, porque se pensó en la posibilidad de que en las vesículas obtenidas se encontrara un transportador de sacarosa que utilizara el gradiente de pH para el transporte de este soluto [26], colapsando el gradiente de pH formado, y que esto fuera la razón de que no se observara la pendiente negativa inicial en los trazos de fluorescencia contra tiempo. Además se eliminaron el cloruro y el nitrato de potasio, debido a que en

experimentos anteriores se observaba que estos iones disminuían la señal de fluorescencia. Las condiciones de temperatura y volumen se mantuvieron.

Con este nuevo medio de reacción se obtuvieron trazos como el de la Figura 11a, en la cual tampoco se observó el apagamiento inicial, por tanto las razones propuestas no eran las correctas. La siguiente opción fue cambiar el orden de adición de los reactivos, es decir, iniciar la reacción con la adición de ATP (Figura 11a), o con magnesio (Figura 11b), o con las vesículas de membrana plasmática (Figura 11c) en otro. Fue en esta tercera variación que pudo observarse el apagamiento inicial de la fluorescencia, semejante al patrón clásico. De forma que este apagamiento podía ser asociado a una acidificación en las vesículas de membrana.

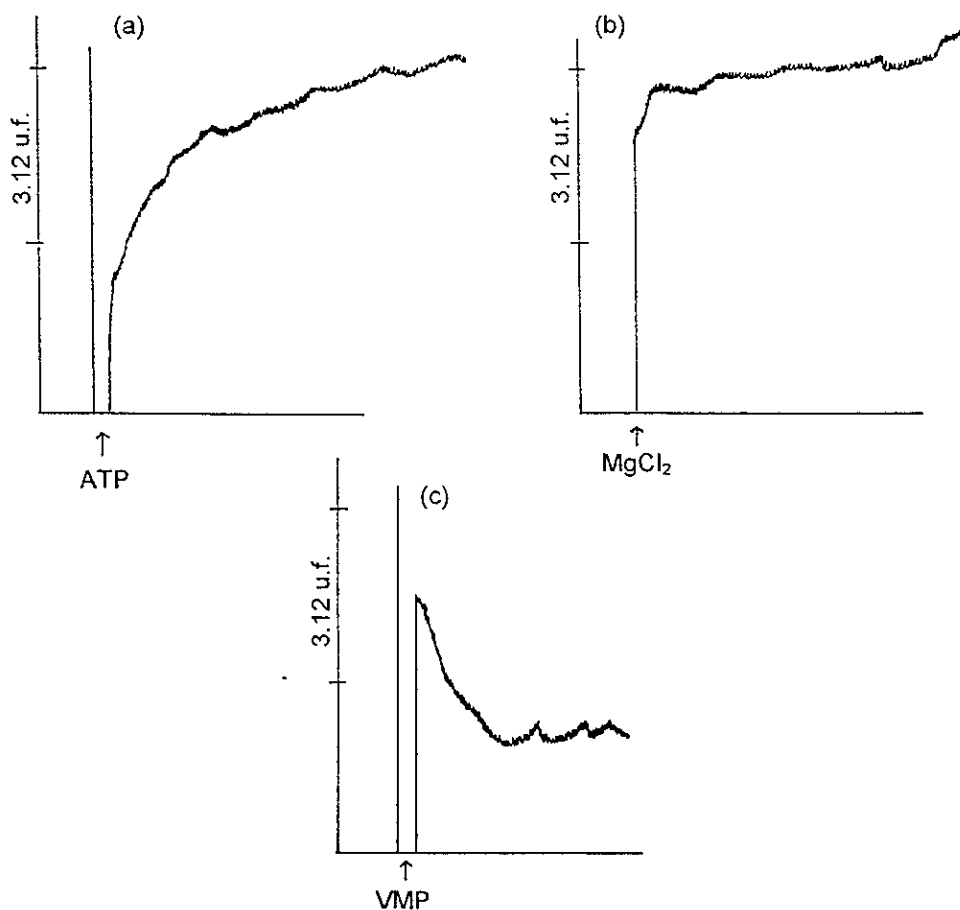


Figura 11. Modificaciones en el orden de adición de reactivos al inicio de la acidificación. Se inició con ATP (a), con MgCl<sub>2</sub> (b) y con las VMP (c)



A partir de los siguientes experimentos se monitoreó la formación del  $\Delta\text{pH}$  por el apagamiento de la fluorescencia, al añadir a la mezcla de reacción las vesículas de membrana. Como en los casos anteriores, el sistema se desacopló por la adición de KCl y Gramicidina, y el cálculo de %Q se hizo de igual forma a la descrita anteriormente.

Una vez que se logró observar una velocidad de apagamiento de la fluorescencia adjudicable a un bombeo de  $\text{H}^+$  asociado a las vesículas de membrana, lo siguiente que se exploró fue el efecto de la cantidad de proteína sobre la velocidad de formación del  $\Delta\text{pH}$ . Los trazos correspondientes a la velocidad de apagamiento se presentan en la Figura 12a. En la Tabla 6 se presentan los resultados del cálculo de la velocidad y del porcentaje de apagamiento en función de cantidades crecientes de proteína membranal.

Tabla 6. Efecto de la cantidad de proteína y de la temperatura sobre la velocidad de bombeo de  $\text{H}^+$

Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ )	Temperatura			
	20 °C		15 °C	
	Velocidad (u.f./seg)	% de Apagamiento	Velocidad (u.f./seg)	% de Apagamiento
50	0.016	3.5	0.016	8.5
100	0.042	4.5	0.018	4.7
200	0.070	5.3	0.028	5.4
300	0.126	5.4	0.039	6.7

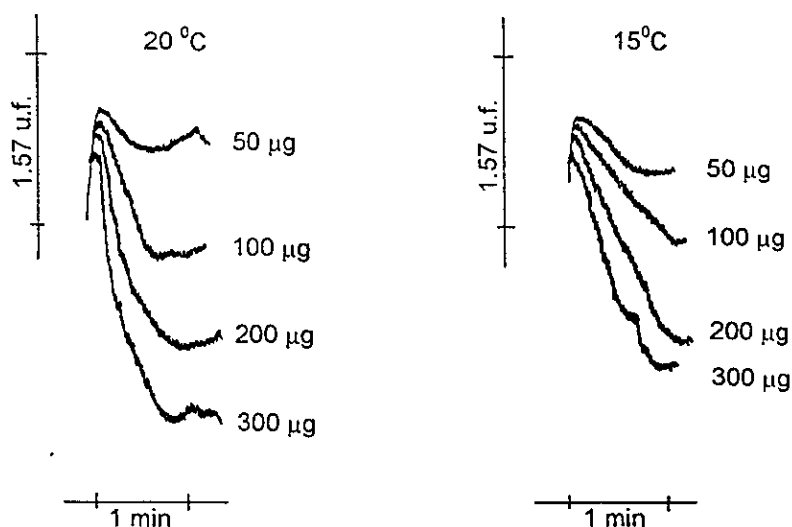


Figura 12. Efecto de la cantidad de proteína y de la temperatura sobre la velocidad de bombeo de  $\text{H}^+$

Para corroborar los efectos observados en la Tabla 6, se decidió realizar el mismo tipo de experimentos pero bajando la temperatura a 15 °C (Figura 12b), esperando tener igual comportamiento que el observado a 20 °C, pero con una disminución en la velocidad de bombeo. Los resultados para este experimento también se ilustran en la Tabla 6.

De los resultados presentados en la Tabla 6 y en la Figura 12 se puede decir que efectivamente la velocidad de acidificación disminuyó con la temperatura y que era directamente proporcional a la cantidad de proteína. Igualmente el porcentaje de apagamiento también aumentó con la cantidad de proteína, pero no cambió significativamente respecto a la temperatura. De esta manera se establecieron las condiciones para monitorear la velocidad de bombeo de protones, pudiendo estimar así una relación entre esta velocidad y la cantidad de proteína membranal.

Como una estrategia para corroborar que la actividad que se está observando está asociada a una ATPasa de membrana plasmática, se ha establecido el uso de inhibidores específicos. En el caso de esta enzima, se utiliza como inhibidor más socorrido el  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , que es un inhibidor común para las ATPasas tipo P y el cual hemos utilizado en nuestros anteriores experimentos con resultados congruentes entre su efecto en la hidrólisis de ATP y en la acidificación por bombeo de protones. Sin embargo, cuando cambiamos la forma de medición del sistema, iniciando la reacción con la adición de las vesículas de membrana, encontramos difícil poder inhibir la actividad de la enzima.

En el primer intento, se hicieron dos variaciones (Figura 13), una en la que el vanadato (20  $\mu\text{l}$ , 50 mM) fue añadido en el medio de reacción a una concentración final de 1.0 mM, previamente a la adición de las vesículas de membrana; y otra en la que igual volumen de vanadato fue añadido al volumen de la suspensión membranal con la cantidad de proteína deseada, y el volumen total de esta mezcla era añadido al medio de reacción. Se observó que la adición del vanadato a las vesículas de membrana no producía la disminución en la fluorescencia al inicio de la reacción y en cambio, este apagamiento si se presentaba en el caso en el que las vesículas se añadían al medio que contenía al inhibidor. Desafortunadamente en este caso, se descartó el hecho de que la inhibición fuera específica del vanadato, ya que la solución estándar de vanadato tenía un pH de alrededor de 12 unidades, con lo cual el carácter básico de la solución podía tener efecto sobre la proteína al ser añadida sobre la suspensión de vesículas en una relación de volúmenes casi iguales. Esto se verificó por el hecho de que una solución de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  50 mM pH 12.0 tuvo el mismo efecto. Los trazos para estos experimentos también se muestran en la Figura 13.

Se probó también agregar la solución de vanadato a un volumen mayor de la suspensión de vesículas, de modo que el amortiguador pudiera soportar mejor los cambios de pH provocados por la solución de vanadato. Tampoco fue posible tener una inhibición del apagamiento de la fluorescencia (no se muestran los resultados).

La preincubación a temperatura ambiente de las vesículas de membrana, tratadas como se describe en el párrafo inmediato anterior, resultó en una

ocasional inhibición de la velocidad de apagamiento de la fluorescencia; sin embargo, este resultado no fue reproducible.

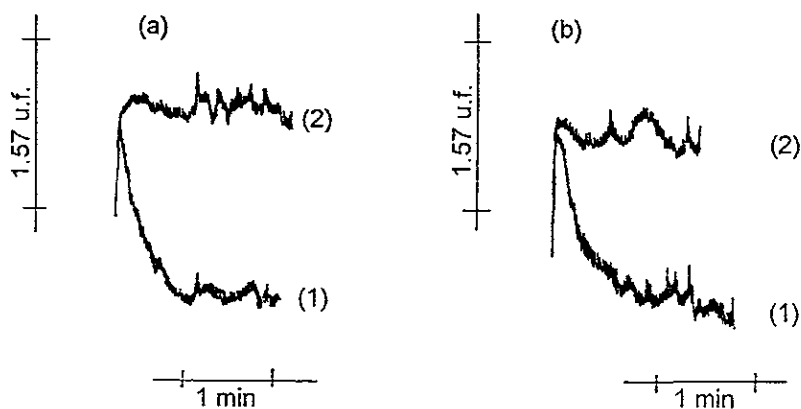


Figura 13. Efecto de la presencia de vanadato (1 mM, concentración final) en la señal de apagamiento de fluorescencia. (a.1). Trazo control, 200  $\mu\text{g/ml}$ . (a.2). El inhibidor agregado sobre la suspensión de VMP previamente al inicio de la reacción. (b.1). El inhibidor agregado en el medio de reacción. (b.2). Efecto de la adición fosfato pH=12 sobre la suspensión de VMP previamente al inicio de la reacción. En todos los casos, la reacción fue iniciada por la adición de las VMP; ya sea sin o con vanadato o fosfato.

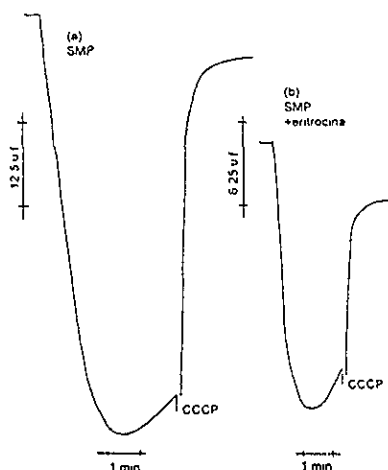
Se ha reportado que la eritrosina-B puede utilizarse como un inhibidor específico de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática. Así que tomamos este compuesto como opción para inhibir a la enzima. Lo primero que se ensayó para el uso de la eritrosina fue la inhibición en la hidrólisis de ATP. Comparando la inhibición por vanadato y por eritrosina-B, se encontró que este último es un inhibidor más efectivo, puesto que se obtuvieron porcentajes de inhibición semejantes a los que se obtienen por vanadato a concentraciones menores, 0.015 mM de eritrosina-B y 0.15 mM de vanadato (vease Tabla 7).

Usamos también oligomicina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) como otro inhibidor de la ATPasa mitocondrial, con lo cual podemos corroborar la inhibición debida a azida (2 mM). Con ello era posible identificar los dos componentes generadores del apagamiento de la fluorescencia dependiente de ATP y que estaban presentes en las preparaciones de vesículas de membrana y que correspondían a la ATPasa de membrana plasmática y a la ATPasa mitocondrial, por la inhibición independiente con dos compuestos: vanadato y eritrosina-B para la ATPasa de membrana plasmática y azida y oligomicina para la ATPasa mitocondrial. La semejanza en los porcentajes de inhibición por cada uno de los inhibidores para la enzima blanco (del 20 al 25% para la ATPasa mitocondrial y del 70 al 75% para la ATPasa de membrana plasmática) confirmó nuestros anteriores resultados.

Es necesario señalar que fue necesario demostrar que la eritrosina no interfería en la cuantificación colorimétrica del fosfato, ya que este es un compuesto colorido. Para ello se realizó la curva estándar de fosfatos en presencia de eritrosina-B 15 y 50  $\mu\text{M}$ ; ambas presentaron los mismos parámetros de regresión lineal que la curva estándar sin eritrosina. Así mismo, el espectro del complejo colorido fosfomolibdato sin y con eritrosina-B tuvo el mismo patrón en la región de máxima absorbancia a los 800 nm, y solo se presentó un pequeño hombro en la región de los 400 nm para el caso con eritrosina-B.

Tomando en cuenta estos controles podemos aseverar que la inhibición observada por eritrosina-B en la hidrólisis de ATP es específica para la actividad de ATPasa de membrana plasmática. Esto está apoyado por la similitud de los porcentajes de inhibición con vanadato y con eritrosina-B.

En cambio, cuando se probó este compuesto en el ensayo fluorométrico de acidificación, se observó que los trazos realizados en presencia de eritrosina-B tenían una intensidad basal de la fluorescencia disminuida, y que posterior a la adición de las vesículas de membrana plasmática, el apagamiento de fluorescencia era menor que en el trazo control. Para poder corroborar que este menor apagamiento de la fluorescencia se debía a un efecto inhibitorio de la eritrosina-B sobre la ATPasa y no a una interferencia experimental, se decidió realizar el siguiente experimento control. (Figura 14).



**Figura 14.** Efecto de eritrosina sobre el apagamiento de fluorescencia en partículas submitocondriales (SMP) obtenidas de hígado de rata (proporcionadas por el Dr. R. Moreno en el Inst. Nal. de Cardiología). Se utilizaron a una concentración final de proteína de 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en medio de KCl 120 mM, MOPS 20 mM pH=7.2, EGTA 1mM, ATP 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM. El sistema se desacopló por la adición de CCCP a una concentración final de 1,25  $\mu\text{M}$ . Temperatura de 20°C. La reacción fue iniciada en ambos casos por la adición de las SMP al medio. (a) SMP, control. (b) SMP mas eritrosina 0.015 mM.

Se utilizaron partículas submitocondriales, con las cuales se determinó la actividad de acidificación bajo idénticas condiciones experimentales. El trazo control, sin eritrosina-B, se presentó con el patrón habitual: un apagamiento de la fluorescencia posterior al inicio de reacción por adición de las partículas submitocondriales, una región de mínima fluorescencia seguida de una pendiente positiva de recuperación de fluorescencia, correspondiente a un escape de protones del interior hacia el exterior de la vesícula, y una recuperación rápida de la fluorescencia por adición de desacoplante. En cuanto al trazo en presencia de eritrosina 15  $\mu\text{M}$ , este también mostró una disminución en la intensidad de la fluorescencia y el apagamiento también fué menor.

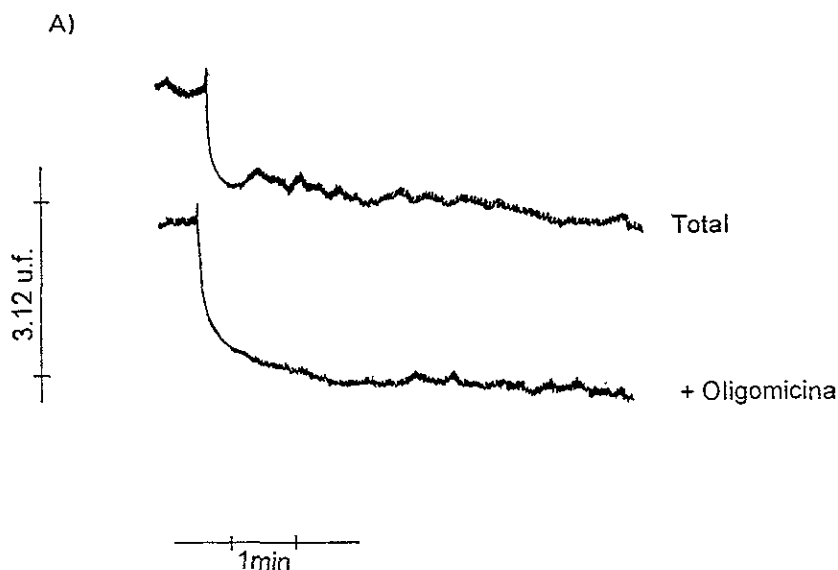
Con base en esto, la eritrosina-B resultó no ser una opción para usarse como inhibidor de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática en este ensayo, puesto que es un compuesto que interfería en la señal de fluorescencia. Si no fuera así, la señal observada con las partículas submitocondriales en presencia de inhibidor no debería haber experimentado cambio alguno puesto que el inhibidor es específico para la ATPasa de membrana plasmática.

Considerando los datos obtenidos a partir de la hidrólisis de ATP, quedó claro que las preparaciones membranales obtenidas se encontraban enriquecidas con vesículas de membrana plasmática y que también estaba presente un componente minoritario correspondiente a la ATPasa mitocondrial. Igualmente, tomando en cuenta que fue posible observar la inhibición del apagamiento por vanadato en los primeros experimentos de acidificación (Figura 10) y que además esta inhibición correlacionaba con aquella observada en la hidrólisis de ATP, podíamos esperar que si el ensayo de acidificación se realizaba en presencia de oligomicina, la señal observada sería solo la debida a la acidificación promovida por la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática.

Para apoyar esta aseveración, en la Figura 15 se presenta un trazo representativo de acidificación en presencia y ausencia de oligomicina; así como la comparación de la velocidad de acidificación y la actividad de hidrólisis de ATP y sus respectivos porcentajes de inhibición por oligomicina.

Como puede observarse, la inhibición parcial con oligomicina en el ensayo de acidificación, correlaciona correctamente con la magnitud de la inhibición encontrada en el ensayo de hidrólisis de ATP, por lo cual podemos asumir que la actividad observada se debe a la acidificación promovida por la ATPasa de la membrana plasmática, que no está inhibida en las condiciones experimentales de ambos ensayos.

Considerando este postulado, podíamos monitorear la actividad de acidificación por las vesículas de membrana obtenidas a partir de los embriones de maíz a los diferentes tiempos de imbibición, y así observar los cambios que se presentan en la actividad de la enzima, evaluada tanto por la hidrólisis de ATP como por la acidificación, a lo largo del proceso de germinación.



B)

	<i>Acidificación u.f./min</i>	<i>Hidrólisis de ATP nmol Pi·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup></i>
Total	0.126	1157.8
+ Oligomicina	0.104	898.0
(% inhibición)	(17%)	(22%)

Figura 15. Comparación de la acidificación en VMP en presencia y ausencia de oligomicina 10 $\mu$ g/ml. Correlación de la inhibición en hidrólisis y acidificación. A) Trazos de fluorescencia, la superposición de los trazos se hizo a partir del inicio de reacción por la adición de las VMP. B) Valores de acidificación e hidrólisis de ATP en las VMP. En ambos ensayos el medio de reacción fue: Sorbitol 250 mM, MOPS/BTP 20 mM pH=7, ATP 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y se usaron 100  $\mu$ g/ml de proteína.

## 5. Actividad de ATPasa en vesículas de membrana plasmática aislada de embriones de maíz embebidos a diferentes tiempos.

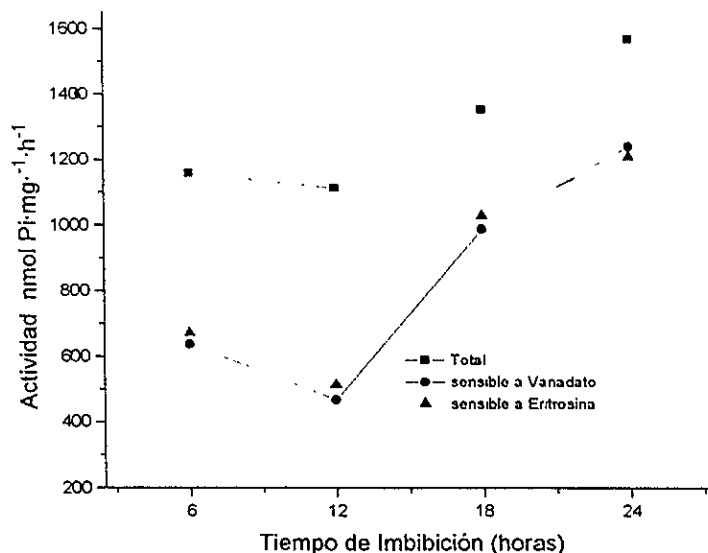
Habíamos escogido 6, 12, 18 y 24 horas como los tiempos de imbibición para medir la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, ya que estos tiempos cubren las diferentes fases observadas en la curva de germinación para el maíz H-355 presentados en la Figura 7. La actividad de la enzima se siguió en el curso temporal señalado, midiendo tanto la hidrólisis de ATP como la acidificación en las vesículas de membrana. Los siguientes resultados corresponden a la actividad de hidrólisis de ATP expresada como nmol de Pi por mg de proteína por hora. La actividad de hidrólisis asociada a cada uno de los componentes enzimáticos presentes en la preparación fue estimada por la inhibición específica a los compuestos que se mencionan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Actividad de Hidrólisis de ATP en VMP aisladas de embriones embebidos a diferentes tiempos de imbibición.

Fuente	Sensible a	Tiempo de Imbibición (horas)			
		6	12	18	24
ATPasa de membrana plasmática	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (0.15 mM)	636.8	467.4	987.0	1239.7
	Eritrosina (0.015 mM)	671.5	511.9	1027.6	1208.3
ATPasa mitocondrial	NaN <sub>3</sub> (2mM)	267.3	223.4	337.8	394.4
	Oligomicina (10µg/ml)	197.6	163.7	239.3	88.3

La actividad se expresa como: nmol Pi·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Los valores de actividad total a cada uno de los tiempos son: 1157.8, 1112.8, 1352 y 1569.2 nmol Pi·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> para 6, 12, 18 y 24 horas respectivamente.

Los datos que corresponden a la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato y eritrosina se presentan gráficamente en la Figura 16. En la cual puede observarse que: a) ambos inhibidores tuvieron el mismo efecto inhibitorio en las VMP obtenidas de los embriones embebidos a cualquier tiempo y b) que la actividad asociada a la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática presentó un máximo a las 18 horas, tiempo que coincide con el de protusión de la radícula. (Figuras 7 y 8).



**Figura 16.** Actividad de hidrólisis de ATP en VMP aisladas de embriones embebidos a diferentes tiempos. Las actividades sensibles a vanadato y eritrosina se estiman a partir de la diferencia de la actividad inhibida por estos y la actividad total.

En cuanto a la actividad de acidificación, una vez que fundamentamos la consideración señalada en el apartado anterior, se procedió a medir la acidificación de las vesículas de membrana aisladas de los embriones a diferentes tiempos de imbibición en presencia de oligomicina como inhibidor de la ATPasa mitocondrial, esperando encontrar un patrón paralelo al observado en la hidrólisis de ATP. Estos resultados se muestran en la Figura 17, en la cual puede observarse que la velocidad de apagamiento de fluorescencia asociada a la acidificación en la vesículas de membrana presentó un patrón similar al de la actividad de hidrólisis, con valores máximos en aquellos tiempos cercanos a la protusión de la radícula.

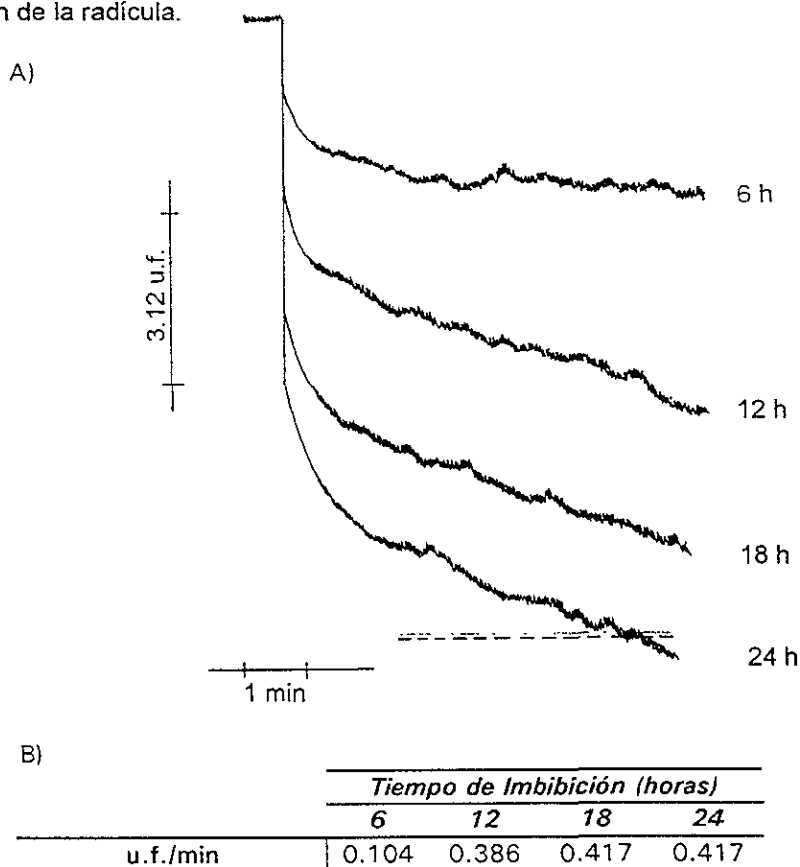
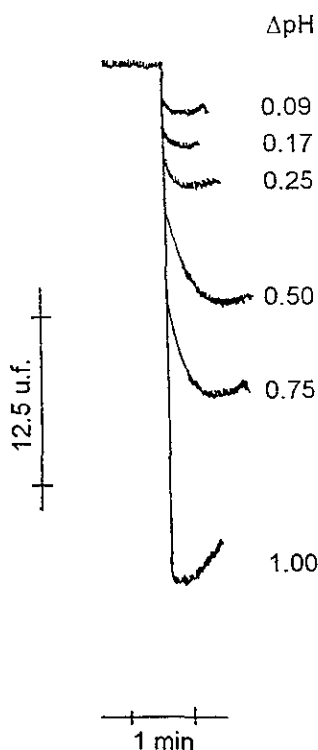


Figura 17. Actividad de acidificación en VMP aisladas de embriones embebidos a diferentes tiempos. A) Trazos de fluorescencia. La superposición de los trazos se hizo a partir del inicio de reacción por la adición de las VMP a una concentración final de  $100\mu\text{g/ml}$ . La reacción se hizo en presencia de oligomicina  $10\mu\text{g/ml}$ . B) Valores de velocidad de acidificación expresado como unidades de fluorescencia por minuto (u.f./min), estos datos se estimaron a partir de la pendiente hacia el final del trazo en cada uno de ellos. Se señala con la línea segmentada, el intervalo de tiempo usado para estimar la pendiente.



Con la finalidad de calibrar las señales de apagamiento de fluorescencia como un  $\Delta\text{pH}$  en la vesículas, se prepararon liposomas de azolectina a los que se les impuso una diferencia de pH transmembranal en el intervalo de una unidad. Siguiendo el mismo protocolo para determinar la acidificación en las vesículas de membrana se obtuvieron los trazos de la Figura 16 en los que pudo observarse que al aumentar la diferencia de pH en los liposomas, las señales de apagamiento fueron mayores. En la misma Figura se muestra la gráfica de linealización del porcentaje de apagamiento en función del  $\Delta\text{pH}$  impuesto en los liposomas.

A)



B)

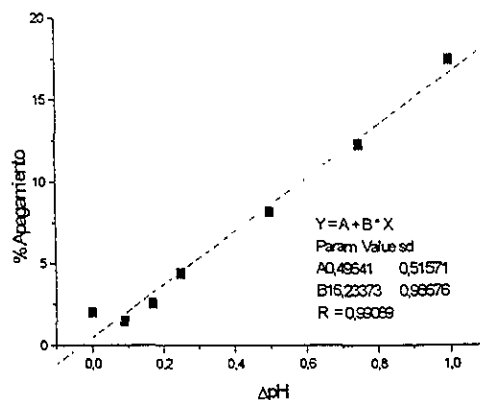


Figura 18. Curva de Calibración con liposomas (% de Apagamiento vs  $\Delta\text{pH}$ ). A) Trazos de fluorescencia obtenidos en cada una de las diferencias de pH impuestos en los liposomas. B) Linealización de los datos de % de apagamiento en función del  $\Delta\text{pH}$ .

Una vez que se tuvo esta calibración, fue posible estimar los datos de apagamiento de fluorescencia como un  $\Delta\text{pH}$  producido en la vesículas de membrana.

Los resultados de la estimación de la formación de este  $\Delta\text{pH}$  se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Calibración del apagamiento de fluorescencia en las VMP aisladas de embriones de maíz embebidos a diferentes tiempos.

	<i>Tiempo de Imbibición (horas)</i>			
	<i>6</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
u.f./min	0.104	0.386	0.417	0.417
% Q/min	0.063	0.234	0.256	0.256
$\Delta\text{pH}/\text{min}$	0.004	0.015	0.016	0.016
% $Q_{\text{max}}$	2.1	2.6	3.0	3.1
$\Delta\text{pH}_{\text{max}}$	0.14	0.17	0.19	0.20

El % $Q_{\text{max}}$  se calculó a partir del desacoplamiento con KCl/Gramicidina después de 8 minutos de reacción para cada trazo correspondiente a los diferentes tiempos de imbibición. El  $\Delta\text{pH}_{\text{max}}$  se calculó a partir de la curva de calibración por interpolación del % $Q_{\text{max}}$ .

Una posibilidad que pudiera pensarse por la cual los  $\Delta\text{pH}$  formados sean pequeños, es que existiera algún transporte secundario que utilizara y disminuyera el gradiente de protones. Dada la composición del medio de reacción, hemos eliminado esta posibilidad puesto que para ninguno de los componentes presentes se ha reportado algún mecanismo de transporte secundario. Se sustituyó la sacarosa por sorbitol y se eliminaron las sales de cloruro y nitrato de potasio. Por otro lado, se puede esperar que estos valores de acidificación sean mayores, ya que la contribución a la actividad de las vesículas con orientación correcta no fue considerada (vease el análisis de resultados).

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática es una enzima que lleva a cabo la translocación de protones desde el interior celular hacia el espacio apoplástico. La enzima puede realizar este transporte endergónico gracias a que lo acopla en su mecanismo a la hidrólisis de ATP; convirtiéndose así en un transductor de energía química en energía potencial conservada en el gradiente electroquímico transmembranal generado por el bombeo de protones.

Esta enzima está involucrada en varios procesos de importancia fisiológica para la célula vegetal, ya que el gradiente electroquímico de protones que genera puede utilizarse en varios procesos como son: el transporte secundario de solutos, la regulación del pH celular, la apertura de estomas, el crecimiento y la elongación celular.

La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática puede asociarse al proceso de germinación. La participación fundamental de esta biomolécula en este proceso se basa en que la acidificación del espacio apoplástico producido por el bombeo de protones facilita la relajación de los polímeros de la pared celular, lo cual resulta indispensable para la célula vegetal en elongación. Esto a su vez es un factor determinante para lograr la protusión de la radícula en las semillas en germinación. Asimismo, el gradiente electroquímico representa la fuerza motriz para el transporte secundario de solutos. Estos solutos mantienen el potencial osmótico de la célula y representan una fuente de metabolitos utilizables por las células en crecimiento en las semillas germinadas.

En el presente proyecto hemos buscado detectar posibles cambios en la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática a diferentes tiempos durante la germinación de embriones de maíz, especialmente en los tiempos en que existe una actividad de elongación celular.

De acuerdo al protocolo establecido, primeramente hemos determinado para la línea de maíz híbrido H-355 la curva trifásica de germinación según el incremento en peso fresco debido a la toma de agua. A partir de esta curva, se observó que la transición entre la segunda y la tercera fase ocurría alrededor de las 18 horas. Es en este momento, que se observó la protusión de la radícula y en el que casi se había llegado al 90% de germinación en la población de embriones, según puede notarse en la Figura 7. Asimismo, puede señalarse que en la medición de la elongación de la radícula (Figura 8), también se presentó un cambio de pendiente alrededor de las 18 horas, como puede notarse mas claramente en el regráfico de la Figura 8, el cual corresponde a la velocidad de elongación y en el que se observa que la máxima velocidad ocurre en el periodo de protusión de la radícula.

Conjuntando estos resultados, se hizo evidente que existía una correlación entre estos parámetros medidos. Esto estaba apoyado por el hecho de que durante el momento en se presenta la protusión de la radícula, existe una elongación de las células [14,43,124]. En este trabajo se asumió que en base a su actividad de acidificación, la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática contribuía

a facilitar la elongación celular y asimismo promover la protusión de la radícula en los embriones en germinación.

Con la finalidad de monitorear los cambios en la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática antes y durante el periodo de elongación radicular, se aislaron las vesículas de membrana plasmática a partir de los embriones de maíz embebidos a diferentes tiempos. La técnica empleada para el aislamiento fue la partición en fases acuosas de polietilenglicol/dextrán.

Sobre esta técnica de reparto, es necesario mencionar que la separación bajo iguales condiciones, varía dependiendo del tejido y de la especie en estudio. Por lo cual se recomienda determinar las condiciones óptimas para el reparto, como son la concentración de polímeros, la concentración y tipo de sales presentes en el sistema de fases, el pH, número de particiones en serie [2,93].

Para el caso particular de los embriones de la línea de maíz H-355, hemos encontrado que se obtienen vesículas de membrana plasmática en una condición de 6.4% de polímeros, en un único reparto y partiendo de un homogenado sin núcleos. Se eliminó el cloruro de potasio, puesto que se obtuvieron mejores resultados en el rendimiento en esta condición. Esto puede deberse a que la concentración de sales dadas por el  $KH_2PO_4$  en el sistema de fases y el Tris-HCl en el amortiguador de homogenización, resultan suficientes para producir una separación de cargas en las fases que promueva la partición de las membranas. Una vez que se agrega el KCl, este puede disminuir la diferencia de potencial eléctrico en las fases; lo cual resulta en una menor partición de las membranas.

Respecto a las diferencias observadas para el aislamiento de las vesículas en las líneas de maíz H-355 y H-220, el hecho de que con esta última no se tengan resultados aceptables puede explicarse por que diferentes materiales biológicos requieren de diferentes condiciones experimentales para lograr la purificación [111]; y que por tanto, las condiciones exploradas no fueron las adecuadas para este tipo particular de semillas. Estas diferencias puedan deberse a variaciones en la composición de las membranas.

Utilizando los embriones de la líneas H-355 para la purificación, los datos de hidrólisis de las vesículas aisladas bajo estas condiciones a partir de embriones embebidos por 24 horas, muestran que se obtiene una fracción de vesículas enriquecida en membrana plasmática, ya que esta actividad fue sensible a vanadato en un 75%. Además, esta preparación contenía un segundo componente minoritario de ATPasa mitocondrial, el cual es responsable del 25% restante de la actividad de hidrólisis total y es sensible a azida.

Una vez que se tenían las condiciones para el aislamiento de las vesículas de membrana, y se sabía que estas preparaciones presentaban una actividad de hidrólisis de ATP asociada a la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática y por tanto inhibible por vanadato, se procedió a establecer las condiciones para monitorear la actividad de bombeo de protones en las vesículas aisladas. Se decidió usar ACMA como sonda fluorescente, porque esta es sensible a diferencias pequeñas de pH transmembranal [135].

Durante el desarrollo de los experimentos de acidificación, se observó que si la reacción se inicia por la adición de ATP y/o  $Mg^{2+}$  (Figuras 9 y 11), se

presentaba una disminución rápida y significativa de la fluorescencia basal. Es poco probable que estos cambios se deban a una actividad de acidificación en las vesículas, puesto que en un sistema en el que se eliminaron las membranas, se presentó el mismo cambio en la fluorescencia; por ello pensamos que esto pueda deberse a una interacción entre el ACMA y el complejo ATP-Mg<sup>2+</sup>, que producía una disminución en la fluorescencia de la sonda. Comportamiento como el descrito se ha reportado anteriormente para otros colorantes como la 9-aminoacridina [11]. Tal vez se trate de algún mecanismo de transferencia de energía, puesto que la molécula de ATP permite la formación de estructuras resonantes en el anillo de adenina.

Sin embargo, la recuperación de la fluorescencia debida a la adición de gramicidina como desacoplante, sí es una señal que puede asociarse a la disipación de un gradiente de protones formado en las vesículas, puesto que este cambio no se observó en ausencia de las membranas o del sustrato para la enzima. Otra forma en la que esto podría corroborarse es mediante la disminución de la concentración de ATP en el medio de reacción por adición de hexoquinasa y glucosa; de esta forma se esperaría una recuperación lenta de la fluorescencia debida un mayor eflujo pasivo de protones [11].

Entonces se puede especular diciendo que al iniciar la reacción por la adición del sustrato, ocurren dos eventos que son simultáneos y que resultan en el apagamiento de la fluorescencia; uno que es dependiente de la acidificación y otro que no lo es. El desacoplamiento con gramicidina permite evaluar solo el apagamiento que resultó de la actividad de acidificación, al poder cuantificar la recuperación de la fluorescencia.

De esta forma se pudo evaluar la actividad de bombeo de protones en las vesículas aisladas y se pudo observar que esta actividad también era sensible a vanadato en un porcentaje de inhibición cercano al que se obtiene en la actividad de hidrólisis de ATP (Figura 10). El hecho de que en el ensayo de acidificación se requiera de preincubar la enzima en presencia del inhibidor a mayores concentraciones puede explicarse por que la cantidad de proteína usada en el ensayo de hidrólisis es menor y a que los tiempos de incubación son de al menos una hora en el ensayo de hidrólisis.

Por tanto, las preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas son capaces de formar un  $\Delta\text{pH}$ , ya que presentan una recuperación de la fluorescencia por efecto de la adición de gramicidina o nigericina como agentes desacoplantes. Tanto la actividad de hidrólisis de ATP como la de acidificación son sensibles a vanadato, por lo que pueden ser asociados a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. Existe un componente minoritario de ATPasa mitocondrial, el cual es responsable de aproximadamente el 25% de la hidrólisis total y que es sensible a azida.

En experimentos posteriores se mostró que la disminución de la fluorescencia podía observarse al inicio de la reacción, si esta era arrancada por la adición de las vesículas de membrana al medio (Figura 11). Consecuentemente se optó por iniciar la reacción con la adición de las vesículas de membrana, a partir de lo cual se puede observar la pendiente negativa en la disminución de la

fluorescencia y una posterior recuperación de la fluorescencia provocada por la adición de agentes desacoplantes como KCl/Gramicidina.

A diferencia de los primeros trazos, el hecho de iniciar la reacción por la adición de las vesículas al medio con el resto de componentes, permite eliminar los cambios en la fluorescencia asociados a la interacción entre el colorante y el sustrato enzimático, como ya se ha mencionado. Por tanto, los cambios observados al iniciar la reacción serían debidos a la interacción entre el colorante y las vesículas. A partir de esto, es necesario hacer notar que en los trazos obtenidos de esta manera (Figura 17), el apagamiento inicial no puede adjudicarse a una acidificación, puesto que esta se presenta también sin el sustrato, lo que nos hace pensar en una posible interacción a nivel superficial del colorante con algunos componentes membranales. Sin embargo, en ausencia del sustrato la pendiente negativa hacia el final del trazo no existe; por ello esta disminución de la fluorescencia puede asociarse a la actividad de acidificación por la ATPasa de  $H^+$ . Son estos datos los que se han considerado para reportar la velocidad de acidificación en las vesículas aisladas de los embriones embebidos a diferentes tiempos (Tabla 8). A semejanza de las mediciones anteriores, se observó una recuperación de la fluorescencia por adición de KCl/Gramicidina, solo en los casos en los que había sustrato.

Se ha mencionado ya que en los experimentos que se han realizado, se ha hecho uso de inhibidores específicos de la actividad de ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática y de la ATPasa mitocondrial; vanadato y eritrosina en el primer caso, y azida y oligomicina en el segundo. En el caso de la inhibición por vanadato y eritrosina hemos encontrado que este último es un inhibidor más efectivo, puesto que a concentraciones menores de eritrosina se obtienen porcentajes de inhibición en la hidrólisis de ATP semejantes a los que se obtienen con vanadato, (0.015 mM de eritrosina y 0.15 mM de vanadato), lo cual concuerda con el comportamiento inhibitorio conocido de la eritrosina [9,36]. En cambio, cuando se ha probado la inhibición por vanadato en el ensayo de acidificación no se encontraron resultados satisfactorios y reproducibles pudiendo esto deberse a su carácter iónico.

Existen algunos reportes [9 y referencias incluídas] en los que se menciona la impropiedad de usar al vanadato como inhibidor de la actividad de ATPasa en tejidos intactos, puesto que penetra lentamente las células y se requieren de altas concentraciones para lograr la inhibición, pudiendo en estos casos ser otros factores los que produzcan el efecto inhibitorio. Por otro lado, se ha reportado que cuando el vanadato se aplica a células de *Nitellopsis* perfundidas internamente, el transporte electrogénico resulta semi-inhibido a concentraciones de 5  $\mu M$  [151]. Ambos resultados ponen en claro que el vanadato es poco permeable.

El mecanismo propuesto para la inhibición por vanadato es una inhibición incompetitiva [116], la cual ocurre cuando el inhibidor se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato resultando en un complejo inactivo enzima-inhibidor-sustrato. El inhibidor no se une a la enzima libre. Estos estudios, sumados a la caracterización del intermediario fosforilado [24], muestran que al poner en contacto a la enzima con el inhibidor previamente al sustrato, se disminuyen los

niveles detectados del intermediario fosforilado; sugiriendo que la unión del vanadato previene la actividad cinasa de la enzima. Mecanismos semejantes han sido propuestos para la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  [28] y otras ATPasa tipo P [68], en los que el vanadato se une solo después de que la enzima ha sido fosforilada y la enzima queda "suspendida" en el estado  $\text{E}_2$ .

El hecho de que el vanadato interfiera en la formación del intermediario fosforilado es compatible con un mecanismo inhibitorio incompetitivo, para el cual se espera que el vanadato tenga un sitio de unión diferente al de ATP y que su interacción produzca algún cambio conformacional que evite los pasos siguientes en el mecanismo catalítico [144]

Poco se sabe sobre la localización topológica del posible sitio de unión del vanadato. Sin embargo, puesto que el vanadato inhibe la actividad cinasa de la enzima, puede asumirse que actúa en el sitio de fosforilación de la enzima; posiblemente bloqueando el residuo de aspártico. Teniendo esto en mente y recordando el modelo estructural propuesto para la enzima [149], en el que se propone que el sitio de acoplamiento entre el transporte iónico y la hidrólisis de ATP se encuentra localizado cerca de la apertura citoplásmica del canal, puede especularse que si el vanadato actúa en algún sitio de la enzima localizado hacia el interior de una vesícula con orientación invertida, entonces se esperaría que solo cuando el vanadato ha permeado hacia el interior de la vesícula después de algún tiempo, puede entonces ejercer su efecto.

Esto podría explicarnos porque sólo cuando preincubamos a la enzima con vanadato, se puede inhibir la formación del  $\Delta\text{pH}$  (Figura 10) y estaría de acuerdo con los varios reportes en los que la enzima y el inhibidor son puestos en contacto previamente al inicio de la reacción por ATP y/o  $\text{Mg}^{2+}$ .

Por otro lado, la eritrosina tampoco resultó ser una opción para usarse como inhibidor en el ensayo de acidificación, puesto que al ser un compuesto colorido y tener su máximo de absorción cerca de los 440 nm, en una región próxima a las longitudes de onda empleadas en esta técnica fluorométrica, este compuesto interfiere fuertemente en la señal observada. Esto no sucede así en la cuantificación espectrofotométrica del  $\text{P}_i$ , puesto que la longitud de absorción (850 nm) dista bastante de la de eritrosina y no hay interferencia; además de que el carácter ácido del medio para desarrollar color disminuye grandemente la absorción de la eritrosina.

En el caso de la inhibición por azida y oligomicina, hemos encontrado que ambos inhibidores producen porcentajes de inhibición semejantes en la hidrólisis, y que también la inhibición por oligomicina correlaciona tanto en la hidrólisis como en la acidificación (Figura 13). Esto nos permitió asumir que si el ensayo de acidificación se realizaba en presencia de oligomicina, la señal observada sería solo debida a la actividad asociada a la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática.

Considerando este postulado, medimos la actividad de acidificación por las vesículas de membrana aisladas de los embriones embebidos a los diferentes tiempos de imbibición y entonces observar los cambios que se presentaban en la actividad de la enzima.

Hemos evaluado la actividad de la enzima, tanto por la hidrólisis de ATP como por la de bombeo de protones, a partir de las vesículas de membrana aisladas de los embriones embebidos por 6, 12, 18 y 24 horas. Se escogieron estos tiempos por que son representativos de las diferentes fases que se observan durante la germinación (Figura 7). A partir de los datos de hidrólisis, hemos evaluado la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática como aquella que es sensible a vanadato y eritrosina independientemente. Con ambos inhibidores los porcentajes de inhibición son semejantes, y se observa que la máxima actividad se presenta a las 18 horas; tiempo que coincide con el tiempo de protusión de la radícula y durante el cual se observó la elongación de la radícula (Figuras 7 y 8).

Asimismo, los datos que se obtuvieron de la acidificación mostraron un patrón similar al anterior; con valores máximos cercanos al tiempo de protusión de la radícula. Una vez que se calibraron las señales de apagamiento de fluorescencia como valores de  $\Delta pH$  transmembranal, podemos decir que las diferencias de pH establecidas a través de las vesículas son pequeñas; sin embargo se tienen diferencias consistentes y reproducibles entre los valores de los tiempos de imbibición.

Tomando en cuenta estos resultados podemos sugerir la participación de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática durante el proceso de germinación en aquellas fases en las que existe elongación celular.

Anteriores trabajos en este laboratorio han demostrado la actividad de ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática en los tiempos iniciales de la germinación. El patrón de actividad observado en ese caso fue el de un máximo a las dos horas, seguido de una disminución de la actividad. Estos cambios de actividad en el tiempo han sido interpretados como el resultado de un ajuste de la enzima a su entorno membranal al pasar de un estado seco a un estado hidratado [139]. En el presente trabajo se ha seguido la actividad de la enzima en tiempos posteriores. Los cambios comprendidos entre las 6 y 24 horas de imbibición, que involucran un máximo de actividad a las 18 horas, pueden interpretarse con un sentido fisiológico, como ya se ha mencionado, en el cual se asume la participación de la enzima en el fenómeno de elongación celular que conlleva a la protusión de la radícula en los embriones en germinación.

Los trabajos realizados sobre el estudio de la elongación celular y la teoría del crecimiento ácido se han llevado a cabo teniendo a coleoptilos como sistema biológico [33,69,130] puesto que este es un tejido que se encuentra en franca elongación. En estos casos se ha observado que el ajuste del pH de la pared celular, por medio de la aplicación de soluciones amortiguadoras externas, a valores de  $pH < 6.0$ , inducen el crecimiento en los segmentos de coleoptilos [69] y que la velocidad de elongación en  $pH 5.0$  es tres veces mayor que a  $pH 6.0$  y es comparable a la inducida por auxina.

Sin embargo, aún queda por establecer qué tanto es la magnitud de la acidificación, es decir, ¿cuál es el pH inicial a partir del cual se induce la acidificación?. Este punto ya ha sido abordado [152] y se estima que la



acidificación promovida por ácido indolacético es de solo 0.3 unidades de pH, aunque algunos trabajos sugieren diferencias mayores.

Ha sido cuestionado si esta disminución de pH es responsable del crecimiento inducido por auxina. Como se ha señalado por unos y otros autores (en pro y en contra), los coleoptilos utilizados tienen una cutícula externa, la cual representa una barrera física para la medición de los cambios de pH interno del tejido. Por tanto, se hace necesario perturbar al sistema y probablemente algunos de los contrapuntos se deban a las diferencias en la metodología empleada para remover esta cutícula. Por esto, aún no se puede afirmar en concreto sobre la magnitud de estos cambios de pH, hasta que se disponga de alguna aproximación experimental que afecte en lo mínimo al sistema biológico; pero lo que es claro es que el efecto de acidificación es la promoción de la elongación.

En referencia a estos resultados, pensamos que estas pequeñas acidificaciones observadas no deben ser menospreciadas, puesto que lo que se ha medido da cuenta de un comportamiento promedio y que *in vivo* la acidificación puede estar magnificada debido a la compartimentalización de los espacios celulares y sobre todo a la localización específica del fenómeno.

Nuestros resultados muestran que las vesículas aisladas de los embriones embebidos por 18 horas son capaces de formar un  $\Delta\text{pH}$  de aproximadamente 0.2 unidades. Aunque este valor está por debajo del valor de acidificación inducido por auxinas en coleptilos de maíz y avena reportados por Shopfer [152], debemos mencionar que los datos obtenidos de actividad de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática han sido subestimados, ya que cuando la actividad de hidrólisis de ATP se ensaya en presencia de Brij 58 ( polioxietilen-20-cetil éter) se muestra un aumento de la actividad sensible a vanadato de aproximadamente dos veces ( $884.9 \pm 165$  y  $1719.1 \pm 378$  nmol Pi  $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$  respectivamente). Esto nos sugiere que las preparaciones de vesículas obtenidas se encuentran distribuidas en dos poblaciones de igual proporción; vesículas con una orientación correcta y vesículas con una orientación invertida. Solamente las vesículas con la orientación invertida y en las que la ATPasa tiene el sitio de hidrólisis expuesto al medio externo son capaces de hidrolizar el ATP y bombear protones hacia el interior de la vesícula. Son sólo estas vesículas las responsables del apagamiento de la fluorescencia de ACMA. En cambio, en las vesículas con la orientación correcta el sitio de hidrólisis se encuentra en el interior de la vesícula y el ATP no puede permear a través de la membrana; entonces se requieren de agentes permeabilizantes que hagan accesible el sustrato a la enzima [58,140]. Puesto que los ensayos de acidificación se hicieron en ausencia de Brig 58, la contribución latente de la población de vesículas con la orientación correcta no fue evaluada. Podemos asumir entonces que la acidificación en las vesículas sea mayor.

En lo que respecta al papel fisiológico que tiene la regulación del pH, existe evidencia en la que se ha reportado que los cambios en el pH celular pueden tener una papel de segundos mensajeros en la transducción de señales [88,98]. Estudios realizados en células guarda de *Vicia faba* han mostrado que la adición de 20  $\mu\text{M}$  de ABA, produce un incremento del pH celular de cerca de 0.3

unidades, y aunado a estos cambios se produjo un eflujo en la corriente de  $K^+$ . Esto sugiere que la alcalinización del citoplasma ocurre como un evento integrado en la vía de transducción de ABA conducente a un eflujo de potasio y el cierre de los estomas [16]. Trabajos más recientes del mismo grupo [17,64] han propuesto un esquema de la posible vía de señalización de ABA en las células guarda, en el que se han añadido eventos como cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  y la participación de cinasas y fosfatasa de proteína. De este modo, es claro que los mecanismos moleculares que median la respuesta fisiológica observada son complejos e involucran la participación de varios factores, incluidos entre ellos los cambios en el pH celular.

Sobre este aspecto, las investigaciones realizadas en coleoptilos como modelo de tejido en elongación han vislumbrado la participación de los eventos mencionados. Sin embargo, estos han sido considerados de manera aislada, dejando aún por elucidar una posible vía de señalización. Se ha reportado el decremento de 0.1 unidades en el pH celular medido con microelectrodos en células de coleoptilo de maíz tratada con 0.1  $\mu M$  o 10  $\mu M$  de ácido indolacético [25,51]. También se ha observado que la auxina y el ácido abscísico tienen efecto sobre los niveles de calcio al igual que en el pH intracelulares [62]. Por otro lado, reportes anteriores [47,91] mencionan que inhibidores del complejo  $Ca^{2+}$ -Calmodulina tienen efectos sobre la respuesta observada de varias hormonas en sus sistemas blancos, incluyendo auxinas en coleoptilos de avena.

Estos resultados junto con las evidencias observadas en otros sistemas (células guarda), en los que se sugiere que una cinasa de proteínas dependiente de calmodulina puede regular a la ATPasa de  $H^+$  [150] y que la actividad de la enzima se encuentra inhibida por  $Ca^{2+}$  a concentraciones fisiológicas [84], agregan nuevos elementos, posiblemente integrados en la vía de señalización de auxinas en tejidos en elongación. Pero aún hace falta trabajo tendiente a esclarecer este mecanismo de acción para la respuesta a auxinas.

Aunque nuestros resultados no evidencian el posible mecanismo al cual se deban los cambios en la actividad de la enzima, de ellos es posible inferir la participación de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz. En el trabajo de este laboratorio se ha buscado medir los niveles del mRNA para la proteína. Otra estrategia que se ha seguido es la detección *in situ* de la enzima por técnicas de inmunofluorescencia, los resultados preliminares indican que la enzima se encuentra localizada en las regiones de elongación del embrión y del escutelo. Estos resultados concuerdan con la participación de la enzima tanto en los procesos de transporte secundario como de elongación celular.

Los resultados obtenidos con estas últimas técnicas mencionadas están fuera de los propósitos específicos de este trabajo, sin embargo, junto con los presentes resultados forman parte de un proyecto en el cual se busca definir la manera por la cual la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática puede participar en la germinación de las semillas de maíz.

El conjunto de estos resultados permite definir algunas hipótesis, a partir de las cuales se plantean nuevas *perspectivas de trabajo*.

Puede asumirse que los cambios en la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática estén correlacionados con los diferentes eventos que ocurren en las diferentes fases de germinación. Estos cambios pueden explicarse ya sea por cambios en la cantidad de enzima, o bien por la activación de la misma. Se ha mencionado ya que durante las primeras horas de germinación los cambios en la actividad de la enzima se atribuyen a un ajuste de la actividad de la enzima a su entorno membranal al pasar del estado seco al hidratado [139]. Durante las primeras horas de la segunda fase de la germinación, durante la cual ocurre la reactivación del metabolismo celular [14,99,124] esto conduzca a una acidificación en el citoplasma [88] que produzca una activación de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática. Este incremento de la actividad sería responsable de la regulación del pH interno, así como de facilitar el transporte secundario de metabolitos. Esto apoyaría la localización preferente de la enzima en la región del escutelo. Asimismo, puede hipotetizarse que la acidificación provocada puede promover la liberación química y/o enzimática de las formas unidas de auxina, que se sabe se localizan en el endospermo [37,158].

En las siguientes horas de la fase dos, durante las cuales se pudieran alcanzar niveles de auxina libre suficiente para inducir un efecto de elongación se produciría la protusión de la radícula. Esto sería apoyado por observaciones anteriores en las que se midió los niveles de auxina libre en semillas de maíz, encontrando los valores máximos en el momento de germinación [48]. Este momento sería coincidente con la máxima actividad de la enzima y por tanto podría deberse a un efecto estimulador (directo o indirecto) mediado por auxina.

Durante los siguientes momentos de la germinación, después de la protusión de la radícula, los efectos de la auxina podrían ejercerse a nivel de expresión génica [108], que promueva la síntesis de proteínas que establezcan a los coleóptilos como un sistema en elongación celular y sensible a auxinas. Particularmente, la transcripción de una de las isoformas de ATPasa de  $H^+$  (MHA2) que es sensible a auxina y se encuentra localizada en las secciones no vasculares del coleóptilo [53].

Al inicio de este trabajo se plantearon varios puntos a desarrollar como parte de la estrategia experimental propuesta. A manera de conclusiones particulares, el *alcance experimental* de este trabajo nos permite afirmar que:

- ❖ Se han obtenido preparaciones de vesículas enriquecidas en membrana plasmática, por medio de la técnica de reparto en fases acuosas, polietilenglicol/dextrán.
- ❖ Se ha montado la metodología y las condiciones experimentales para evaluar la acidificación en las vesículas de membrana obtenidas. Esta actividad es complementaria a la de hidrólisis de ATP y su medición permite monitorear otros procesos de transporte asociados al movimiento de protones.
- ❖ Estas preparaciones presentan una actividad de ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, que es inhibida por vanadato en cerca del 75%; ya sea que la actividad enzimática se estime por la hidrólisis de ATP ó por la acidificación en las vesículas de membrana. Además, la actividad de hidrólisis también es sensible a eritrosina en un porcentaje semejante.
- ❖ Existe una contribución menor de ATPasa mitocondrial, la cual es sensible a azida y oligomicina. Esta actividad puede ser eliminada en el ensayo de acidificación por el uso de oligomicina; lo cual permite evaluar la actividad debida a la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática. Esto es con base en la correlación que existe entre la inhibición por oligomicina en la hidrólisis y en la acidificación, y en que solo existen estos dos componentes enzimáticos con actividad de ATPasa en las preparaciones de vesículas.

Estos alcances experimentales nos han permitido el estudio del sistema de interés: evaluar la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática en embriones de maíz durante la germinación.

Con base en los resultados obtenidos, de este trabajo se desprenden las siguientes

## CONCLUSIONES

- ❖ El perfil de acidificación dependiente de la hidrólisis de ATP por la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática muestra un incremento en la actividad en el tiempo de imbibición en el cual se observa la protusión de la radícula y la germinación de los embriones de maíz. Este patrón temporal es semejante para la actividad de hidrólisis de ATP.
- ❖ Los anteriores resultados sugieren una participación activa de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática durante la germinación de embriones de maíz, en aquellas fases en las que ocurre la elongación celular.

... 

## APÉNDICE A

### ***Aislamiento de membrana plasmática por partición en fases acuosas.***

La partición en sistemas de fases acuosas como un método para la purificación de membrana plasmática en plantas fue introducido en 1981 [170], y desde entonces ha sido aplicado con buenos resultados en varias especies y tejidos.

El sistema de fases empleado está dado por la inmiscibilidad de soluciones acuosas de los polímeros de polietilenglicol (Peg) y de dextrán (Dex) en ciertas concentraciones de los mismos. El método separa los diferentes tipos de vesículas de membrana de acuerdo a las propiedades de superficie y no de acuerdo al tamaño o la densidad como se hace en los métodos por centrifugación [93].

En condiciones óptimas del sistema de fases, cerca del 90% de las membranas plasmáticas son obtenidas en la fase superior de polietilenglicol; mientras que cerca del 90% de las varias membranas intercelulares se localizan en la fase inferior de dextrán o en la interfase.

Existen varios factores a considerar en la partición de membranas [2], algunos de los más importantes son los siguientes:

a) Concentración de polímeros.

Un incremento en la concentración de polímeros favorece la separación de las partículas intracelulares en la fase inferior o en la interfase. En general, se recomienda realizar una serie de experimentos en los que se varía la concentración de polímeros para así establecer la condición óptima [93].

b) Influencia de sales.

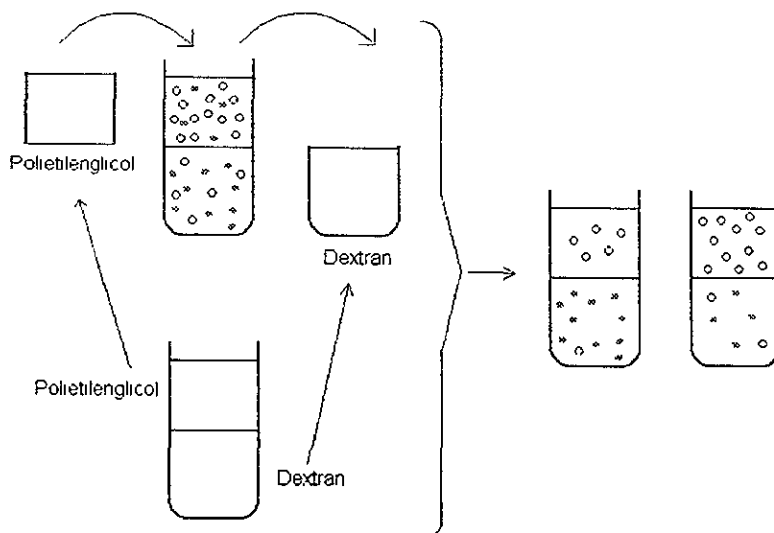
Los diferentes iones tienen diferente afinidad química por las dos fases y como resultado, se crea un gradiente de potencial eléctrico entre las dos fases cuando se incluyen sales en el sistema. Por tanto, una sal con dos iones con muy diferente afinidad por las dos fases generará una mayor diferencia de potencial que una sal en la que sus iones presenten igual afinidad por las fases [2].

c) Hidrofobicidad.

En este aspecto se ha explorado la modificación química de los polímeros por la unión de grupos hidrofóbicos a uno de ellos y observando el efecto sobre la partición. En el caso en el que no exista un efecto iónico en el reparto, serán las propiedades hidrofóbicas de las membranas las que determinen la localización en las fases.

Con la finalidad de mejorar la separación, la partición puede realizarse en varias etapas de una manera sistemática. Tal procedimiento de particiones múltiples en contracorriente, fue desarrollado originalmente por Craig [39]. De esta forma se logra la separación de las sustancias de acuerdo a su coeficiente de partición entre una fase estacionaria y una fase móvil; de hecho el proceso Craig es el fundamento de los procesos de separación cromatográficos.

En la aplicación de esta modalidad a la partición de membranas como fue propuesto por Larsson [93,94] se tiene que una vez que se han separado las fases en el sistema que contiene la muestra, se separa la fase superior de polietilenglicol y se pone en contacto con una fase de dextrán limpia; y a su vez, sobre la fase inferior primera de dextrán, se agrega una fase de polietilenglicol limpia. Tanto la fase de polietilenglicol y de dextrán limpias son obtenidas de la separación de un sistema de fases con igual composición que la de aquella en que se hizo el reparto de membranas, con la excepción de que este no contiene muestra biológica. De esta forma se conservan los volúmenes de las fases y se facilita la transferencia de los mismos. El esquema a continuación muestra el proceso descrito. Este proceso puede repetirse cuantas veces sea necesario para obtener la pureza deseada.



Las fases recuperadas y separadas al final del proceso, se caracterizan por el hecho de que la fase superior de polietilenglicol se encuentra enriquecida en vesículas de membrana plasmática y la fracción de dextrán en membranas intracelulares [94]. Así, las preparaciones de membrana plasmática obtenidas son de una alta pureza y consisten principalmente en vesículas con la orientación correcta ("right-side-out", con el lado apoplástico hacia el exterior de la vesícula).

#### Marcadores de Membrana.

Para poder identificar las membranas plasmáticas y evaluar la contaminación por algún otro tipo de membranas durante el proceso de aislamiento, se requieren marcadores específicos. Idealmente estos marcadores

deben representar ya sea una única actividad enzimática, ó bien alguna propiedad intrínseca asociada a algún componente de la membrana. Sin embargo, en la práctica esto es poco común, puesto que la mayoría de los marcadores tienen una localización principal en algún organelo y una secundaria en otro. En el caso de las actividades enzimáticas usadas como marcadores, esto puede resolverse por el uso de inhibidores específicos ó modificando las condiciones de reacción enzimática [21].

#### Marcadores de Membrana Plasmática en Plantas.

Son dos los principales marcadores asociados a las membranas plasmáticas de plantas [111], la actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{2+}$ , estimulada por  $K^+$  y sensible a vanadato; y la actividad de glucan sintetasa que presenta una alta  $K_m$  por UDP-glucosa, la llamada actividad de glucan sintetasa II (esta enzima puede encontrarse también en el aparato de Golgi).

Adicionalmente, una fracción de las membranas plasmáticas de plantas une específicamente al antagonista de transporte polar de auxina, el ácido N-1-naftiltalámico (NPA) [21]. Un criterio importante, especialmente para la identificación de membranas superficiales (membranas plasmáticas y de tonoplasto), es el grueso de la membrana medida por micrografías electrónicas [111]. El tonoplasto y la membrana plasmática tienen un grueso entre 7 y 10 nm, estas dos clases de membrana pueden diferenciarse en base a la reactividad con el ácido fosfotúngstico (PTA) en pH bajos. Las membranas plasmáticas son reactivas, mientras que las de tonoplasto no reaccionan en este método de contraste. Además, el resto de las membranas son un tanto más delgadas y ambas son inertes al PTA a bajos pH.

## APÉNDICE B

### *Cuantificación del $\Delta\text{pH}$ transmembranal*

Las preparaciones de vesículas aisladas de membrana representan un sistema ideal para el estudio de procesos de transporte asociados con las membranas nativas. Puesto que las vesículas no están asociadas a la maquinaria metabólica de la célula, el transporte de solutos puede estudiarse en la ausencia de transformaciones metabólicas o compartimentalización, y los sustratos que proveen energía al sistema (v.g. ATP) pueden ser añadidos exógenamente. Por lo tanto, se hace posible ejercer un control sobre los sistemas de transporte que no solo incluye la capacidad de determinar las condiciones tanto en el lado *cis* y *trans* de la membrana, sino también la magnitud y naturaleza de la fuerza directriz del transporte [22].

La habilidad de las células vegetales de acidificar activamente el espacio exterior y establecer una diferencia de pH entre el citoplasma y el espacio de la pared celular, es conocida desde hace algún tiempo. A partir de la teoría quimiosmótica de Mitchell, se hizo aparente que este proceso representa parte del esquema asociado al acoplamiento energético para el transporte de solutos hacia las células vegetales. La generación de este gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) ha sido asociado a la actividad de una ATPasa de  $\text{H}^+$  en la membrana plasmática, la enzima acopla la reacción exergónica de la hidrólisis de ATP al movimiento vectorial de  $\text{H}^+$  al espacio extracelular [6].

Es evidente que el acoplamiento energético para el transporte en las membranas plasmáticas representa un proceso vectorial donde la especificidad en la orientación de los sistemas de transporte con respecto a la fuerza directriz es una consideración importante. Sin embargo, el uso de vesículas membranales requiere de la homogenización del tejido vegetal, lo cual provoca que las vesículas que se formen tengan tanto una orientación correcta como invertida; resultando en una heterogeneidad en la preparación. En aquellos estudios en los que el sistema sea energizado vía la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática, sólo aquellas vesículas con la orientación inside-out, que contienen el sitio hidrolítico en el exterior, serán activas en la generación del gradiente electroquímico de protones.

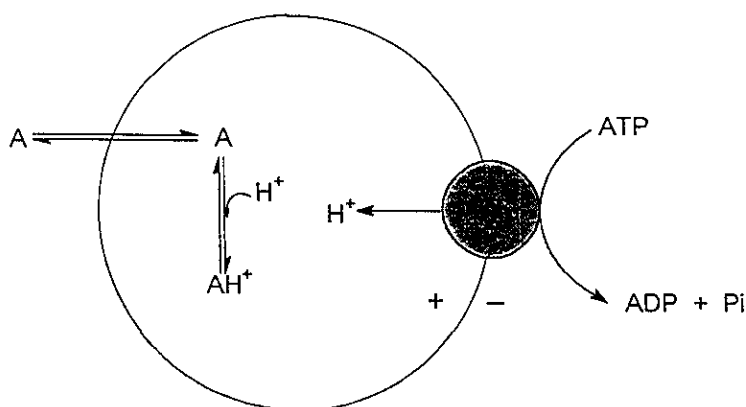
Medición de los gradientes electroquímicos de protones.

Debido al pequeño tamaño de las vesículas de membrana (cerca de  $0.2 \mu\text{m}$  de diámetro), se hace más conveniente para el monitoreo de gradientes de pH el uso de sondas moleculares. En varios estudios con vesículas de plantas superiores, se han empleado bases débiles permeables como sondas para la medición del gradiente de pH establecido a través de la vesícula de membrana. Estas sondas pueden estar marcadas radiactivamente, ser fluorescentes, coloridas, o bien tener un grupo que produzca una señal en resonancia paramagnética nuclear (EPR). Si bien, estas sondas difieren en el modo por el cual monitorean el gradiente de pH, el principio que gobierna su respuesta al  $\Delta\text{pH}$  es básicamente el mismo.



En general todas las sondas usadas en la medición del  $\Delta\text{pH}$  (cuando  $\text{pH}_{\text{int}} < \text{pH}_{\text{ext}}$ ) tienen la característica de ser relativamente hidrofóbicas y poseer un grupo amino como base débil. En la forma no protonada, se asume que la molécula tiene la capacidad de libre movimiento a través de la membrana; mientras que en su forma protonada del grupo básico de la amina, se previene el libre paso por la membrana. Bajo estas condiciones, la sonda se distribuye a través de la membrana de acuerdo a la diferencia de pH entre el exterior y el interior de la vesícula [42]. Cuando el pH interior de la vesícula disminuya en relación al exterior, como sucede en el transporte de  $\text{H}^+$  mediado por ATP en vesículas de membrana con orientación inside-out, la sonda se acumulará en el interior. La eliminación o decremento de gradiente de pH causaría un flujo de la sonda desde el interior de la vesícula hacia la solución externa.

El mecanismo descrito en el párrafo anterior, queda esquematizado en la siguiente figura para el caso de vesículas con una orientación invertida y empleando una sonda básica señalada como la especie A.



Las consideraciones tomadas en este modelo [134] se desarrollan en las siguientes líneas, se ha tomado el caso en el que se emplea una base débil, con las características mencionadas en el párrafo anterior.

Tomando en cuenta la disociación ácido-base de la amina a ambos lados de la membrana y asumiendo que su constante de acidez no cambia, se puede establecer entonces que

$$K_a = \frac{[\text{H}^+]_{\text{int}} [\text{A}]_{\text{int}}}{[\text{HA}^+]_{\text{int}}} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{ext}} [\text{A}]_{\text{ext}}}{[\text{HA}^+]_{\text{ext}}}$$

Cuando la especie permeable alcance la condición de equilibrio en la distribución a través de la membrana, entonces  $[\text{A}]_{\text{int}} = [\text{A}]_{\text{ext}}$  de lo que sigue que

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{int}} - \text{pH}_{\text{ext}} = \log \frac{[\text{HA}^+]_{\text{ext}}}{[\text{HA}^+]_{\text{int}}}$$

Cuando se usan sondas fluorescentes para la medición del  $\Delta\text{pH}$ , el reparto de la sonda entre el interior de la vesícula y la solución exterior puede ser monitoreado por los cambios de fluorescencia de la sonda. A pesar de que no se conoce el mecanismo preciso por el cual se producen los cambios de fluorescencia, se acepta comúnmente que el apilamiento de las moléculas planas durante su acumulación en el interior de las vesículas resulta en la disminución de su fluorescencia (apagamiento).

El grado de apagamiento es usado para calcular la cantidad de incorporación de la sonda dentro de la vesícula, y por tanto de su concentración interna. La fluorescencia residual es proporcional a la concentración externa. Asumiendo que toda la amina internalizada está libre pero completamente apagada, se deriva de la ecuación anterior que:

$$\Delta\text{pH} = \log \frac{Q}{1 - Q} \frac{V_{\text{int}}}{V_{\text{ext}}}$$

donde  $Q$  es la fracción de la fluorescencia de la amina total que ha sido apagada, y  $V_{\text{int}}/V_{\text{ext}}$  es la relación entre el volumen interno y el volumen de la suspensión.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aitken A, Ellis C.A., Harris A., Sellar L.A. & Toker A. (1990). Kinase and neurotransmitter. *Nature*, 344: 594.
2. Albertsson P-A., Andersson B., Larsson Ch. & Akertund H-E. (1982). Phase partition: A method for purification and analysis of cell organelles and membranes vesicles. *Methods Biochem. Anal.* 28: 115-150.
3. Anderson J.E. & Beardal J (1991) *Molecular Activities in Plant Cell*. Blackwell Scientific Publication. Oxford. U.K..
4. Anderson J.A., Huprikar S.S., Kochran L.V., Lucas W.J., & Gaber R.F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 3736-3740
5. Arteca R.N. (1996). *Plant Growth Substances. Principles and Applications*. Chapman & Hall, USA.
6. Assman S.M. & Haubnck (1996) *Transport proteins of the Plant Plasma Membrane*. *Curr. Op in Cell Biology*. 8: 458-467.
7. Baker D.A & Hall T.L. (1988). *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. Baker D.A. and Hall T.L. ed's. Longman Scientific and Technique. U K
8. Balke NH & Hodges T.K. (1975). Plasma membrane adenosine triphosphatase of oat roots Activation and inhibition by Mg and ATP. *Plant. Physiol.* 55: 83-86.
9. Ball J.H., William L. & Hall J.L. (1987). Effect of SW26 and Erythrosin B on ATPase activity and related process in *Ricinus*, cotyledons and cucumber hypocotyls. *Plant Sci.* 52: 1-5
10. Becker D., Zellinger C., Lohse G., Depta H. & Hedrich R. (1993). Identification and biochemical characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta*. 190: 44-50.
11. Bennet A.B. & Spanswick R.M. (1983). Optical measurements of ΔpH and ΔΨ in corn root membrane vesicles: kinetic analysis of Cl<sup>-</sup> effect on a proton-translocating ATPase. *J. Membrane Biol.* 71: 95-107
12. Bennet P.B., O'Neill S.D., Eilman M., & Spanswick R.M. (1985). H<sup>+</sup>-ATPase from storage tissue of *Beta vulgaris* III. Modulation of ATPase activity by reaction substrates and products *Plant Physiol.* 78: 495-499.
13. Bewley, J.D. & Black, M. (1978). *Physiology and Biochemistry of Seeds*. Vol 1 Springer - Verlag. Berlin Heidelberg New York.
14. Bewley, J.D. & Black, M. (1994). *Seeds. Physiology and Development of Germination*. 2nd. edition. Plenum Press. N.Y. USA.
15. Bidwell, R.G.S. (1993) *Fisiología Vegetal*. 1a edición en español. RGT editor. México.
16. Blatt M.R & Armstrong F (1993). K<sup>+</sup> channel of stomatal guard cells: abscisic acid evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasm pH. *Planta*. 191: 330-341
17. Blatt M.R. & Grabov A. (1997). Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cells ion channels. *Physiol. Plant* 100: 481-490.
18. Bouché-Pillon S., Fleurat-Lessard P, Fromont J-C., Serrano R. & Bonnemain J.L. (1994). Immunolocalization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in minor veins of *Vicia faba* L in relation to phloem loading. *Plant Physiol.* 105. 691-697.
19. Boutry M., Michelet B. & Goffeau (1989). Molecular cloning of a family of genes encoding a protein homologous to plasma membrane H<sup>+</sup>-translocating ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 567-574.
20. Briskin D.P. (1994). *Membrane Transport Systems in Plants: An Overview*. *Weed Sci.* 24: 255-262.
21. Briskin D.P. Leonard, R.T. & Huges T.K (1987). Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles *Meth. Enzymol.* 148. 542-558.
22. Brnskin D.P. (1990). *Transport in Plasma Membrane Vesicles. Approaches and Perspectives*. In: *The Plant Plasma Membrane*. Ch. Larsson & J.M. Møller ed's. Springer-Verlag. Berlin.
23. Briskin D.P. (1990). The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of higher plants cells: biochemistry and transport function. *Biochem. Biophys. Acta.* 1019: 95-109.
24. Brnskin D.P. & Leonard R.T. (1982). Partial characterization of a phosphorylated intermediate associated with the plasma membrane ATPase of corn roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6922-6926.
25. Brummer B., Felle H. & Parish R.W (1984). Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump *FEBS. Letts* 174: 8992-8995.

26. Bush D.R. (1992). The protein sucrose symport. *Photosyn. Res* 32: 155-165.
27. Bush D.R. (1993). Proton-coupled sugar and aminoacid transporters in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 513-542.
28. Cantley L.C., Cantley L.G. & Josephson L. (1978). A characterization of vanadate interaction with the  $(Na^+,K^+)$ -ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.* 253: 7361-7368.
29. Cho H-T. & Kende H. (1997). Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol.* 113: 1137-1143.
30. Cho H-T. & Kende H. (1997). Expansins and internodal growth of deepwater rice. *Plant Physiol.* 113: 1145-1151.
31. Chrispeels M. & Maurel C. (1994). Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiol.* 105: 9-13.
32. Cleland R.E. (1971). Cell Wall extension. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22: 197-222
33. Cleland R.E., Buckley G., Nowbar S., Lew N.M., Stinemet Ch., Evans M.L. & Rayle D.L. (1991). The pH profile for acid-induced elongation of coleoptile and epicotile sections is consistent with the acid-growth theory. *Planta.* 186: 70-74.
34. Cocucci M.C. & Marré E. (1984). Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate-inhibited, Mg-ATPase from radish microsomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 771: 42-52.
35. Cocucci M.C. (1986). Inhibition of plasma membrane and tonoplast ATPase by erythrosin B. *Plant Sci.* 47: 21-27.
36. Cocucci M.C. & Marré E. (1986). Erythrosin B as an effective inhibitor of electrogenic  $H^+$  extrusion. *Plant Cell Environ.* 9: 677-679.
37. Cohen J.D. & Bandurski R.S. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 403-430.
38. Cosgrove D.J. (1993). How Do Plant Cell Walls Extend?. *Plant Physiol.* 102: 1-6.
39. Craig L.C. & Craig D. (1956). *Techniques of Organic Chemistry*. Vol. III. 2nd. ed Part I. A. Weissberger ed Interscience. New York and London.
40. Curti G., Massardi F. & Lado P. (1993). Synergistic activation of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in *Arabidopsis thaliana* cells by turgor decrease and fusicoccin. *Physiol. Plant.* 87: 592-600.
41. Daddema H., Hofstra J.J. & Feenstra W.J. (1978). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. *Physiol. Plant.* 43: 343-350
42. Deamer D.W., Prince R.C. & Crofa A.R. (1972). The response of fluorescent amine to pH gradient across liposome membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 274: 323-335.
43. Devlin, R.M. & Witham F.H. (1983). *Plant Physiology*. 4th edition. Wadsworth Publishing Company, USA.
44. Dewitt N.D., Harper J.F. & Sussman M.R. (1991). Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant J.* 1: 121-128.
45. Dewitt N.D. & Sussman M.R. (1995). Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump ( $H^+$ -ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell.* 7: 2053-2067.
46. Dore L.S. (1985). *En. Oxford Survey of Plant Molecular Biology*. Vol. 2 pp. 179. B.J. M. Flin, ed. Oxford University Press. U.K.
47. Elliot D.C., Batcheler S.M., Cassar R.A. & Marinos N.G. (1983). Calmodulin-binding drugs affect responses to cytokinin, auxin and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 72: 219-224.
48. Epstein E., Cohen J.D. & Bandurski R.S. (1980). Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of *Zea mays L.* *Plant Physiol.* 65: 415-421
49. Erwing N.N., Wimmers L.E., Meyer D.J., Cherdat R.T. & Bennett A. (1990). Molecular cloning of a tomato plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Plant Physiol.* 94: 1874-1881.
50. Erwing N.N. & Bennett A.B. (1994). Assessment of the number and expression of P-type  $H^+$ -ATPase genes in tomato. *Plant Physiol.* 106: 547-557.
51. Felle H., Brummer B., Bert A. & Parish R.W. (1986). Indole-3-acetic acid and fusicoccin cause cytosolic acidification of corn coleoptile cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8992-8995.
52. Fisher W.N., Kwart M., Hummel S. & Frommer W.B. (1995). Substrate specificity and expression profile of aminoacid transports (AAP) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 270: 16315-16320.
53. Frías Y., Caldeira M.T., Pérez-Castiñera J.R., Navarro-Aviño J.P., Culiañez-Macia F.A., Kuppinger O., Stransky H., Pagés M., Hager A. & Serrano R. (1996). A major isoform of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase. Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell.* 8: 1533-1544.
54. Frommer W. B., Kwart M. Himer, Fisher W.N., Hummel S. & Nineman O. (1994). Transporters for nitrogenous compounds in plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1651-1670.

55. Frommer W.B., Hummel S. & Riesmeier J.W. (1993). Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 5944-5948.
56. Gahrt M., Stolz J. & Sauer N. (1994). A phloem specific sucrose-H<sup>+</sup> symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. Plant J. 6: 697-706.
57. Gallager S.R. & Leonard R.T. (1982). Effect of vanadate, molybdate and azide, on membrane associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. Plant Physiol. 70: 1335-1340.
58. Gattier N., Belver A., Gibrat R., Grouzis J.P., Rigaud J. & Grignon C. (1988). Preparation of corn root plasmalemma with low Mg-ATPase latency and high electrogenic H<sup>+</sup> pumping activity after phase partitioning. Plant Physiol. 87: 491-497.
59. Gavilanes-Ruiz M., Sánchez-Nieto S., Enríquez-Arredondo M.C. & García-Rubio O.R. (1995). Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales. Ciencia. 46: 251-262.
60. Gavilanes-Ruiz M. & García-Rubio O.R. (1995). Bombas iónicas impulsadas por ATP en las membranas plasmáticas de animales y plantas. En: Mensaje Bioquímico. Fac de Medicina UNAM. 19: 193-210.
61. Gaymard F., Cerriti M., Horeau C., Lemaillet G., Urbach S., Ravallec M., Devauchelle G., Sentenac H. & Thibaud J.B. (1996). The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocyte. J. Biol. Chem. 271: 22863-22870.
62. Gehring C.A., Irving H.R. & Pansh R.W. (1990). Effect of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 9645-9649.
63. González-Romo P., Sánchez-Nieto S. & Gavilanes-Ruiz M. (1992). A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of a high ATP concentration. Anal. Biochem. 200: 235-238.
64. Grabov A. & Blatt M.R. (1997). Parallel control of the inward-rectifier K<sup>+</sup> channel by cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and pH in *Vicia* guard cells. Planta. 201: 84-95.
65. Groot S.P.C. & Karssen C.M. (1987). Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutant. Planta. 171: 525-531.
66. Groot S.P.C. & Karssen C.M. (1992). Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the sitiens mutant. Plant Physiol. 99: 952-958.
67. Groot S.P.C., Kieliszewaska-Rochika B., Vermeer E. & Karssen C.M. (1988). Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell wall in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. Planta. 174: 500-504.
68. Guena-Sánchez M.G., Uribe-Carvajal S. & Pardo-Vásquez J.P. (1995). Las ATPasas de protones de los hongos. Ciencia. 46: 483-503.
69. Hager A., Debus G., Edel H.G., Stransky H. & Serrano R. (1991). Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turn-over pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Planta 185: 527-537.
70. Hall P.J. & Bandursky R.S. (1979). Isolation and Characterization of Indole-3-acetyl-myoinositol from *Oryza sativa*. Plant Physiol. 63, suplemento. pp 50. Abstracts 278
71. Harms K., Wöhner R.B., Schulz B. & Frommer W.B. (1994). Isolation and characterization of a P-type H<sup>+</sup>-ATPases genes from potato. Plant Mol. Biol. 26: 979-988.
72. Harper J.F., Surowy T.K. & Sussman M.R. (1989). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 1234-1238.
73. Harper J.F., Manney L. & Sussman M.R. (1994). The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in Arabidopsis. Genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. Mol. Gen. Genet 244: 572-587.
74. Hedrich R. & Schroeder J.I. (1989). The physiology of ion channel and electrogenic pumps in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol 40: 539-569.
75. Hedrick R., Moran O., Conti F., Bush H., Becker D., Gambale F., Dreyer Y., Küch A., Neuwinger K. & Plame K. (1995). Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. Eur. Biophys. J. 24: 107-115.
76. Hentzen A.E., Smart L.B., Wimmers L.E., Fang H.H., Schroeder J.I. & Bennett A.B. (1996). Two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes expressed in guard cells of *Vicia faba* are also expressed throughout the plant. Plant Cell Physiol. 37: 650-659.
77. Higgins C.F. & Payne J.W. (1978). Peptide transport by germinating barley embryos: Uptake of physiological di- and oligopeptides. Planta. 138: 211-216.

78. Holh M., Hong Y.N. & Shopter P. (1991). Acid and enzyme mediated solubilization of cell wall ~1-3,β-1,4-D-glucan in Maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 95: 1012-1018.
79. Hoshi T. (1995). Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *J. Gen. Physiol.* 105. 309-328.
80. Inohe M. & Nevis J.D. (1991). Auxin enhanced glucan autohydrolysis in maize coleoptiles cell wall. *Plant Physiol.* 96: 285-290.
81. Jin Y.K., & Bennetzen J.L. (1994). Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the BSI retroelement of maize. *Plant Cell* 6: 1177-1186.
82. Johanson F, Sommarin M & Larsson C. (1993) Fusicoccin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5: 321-327.
83. Karssen C.M., Brnkhorst-Vander Swan D.L.C., Breekland A.E., & Koomeef M (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 157: 158-165
84. Kinoshita T., Nishimura M & Shimazaki K-I (1995). Cytosolic concentration of Ca<sup>2+</sup> regulates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 7: 1333-1342
85. Koorneef M., Reullig G. & Karssen C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 61: 377-383
86. Korthout HAAJ. & De Boer AH. (1994). A fusicoccin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *Plant Cell*. 6: 1681-1692
87. Kramer R. (1994). Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochem. Biophys. Acta.* 1185: 1-34
88. Kurkdjian A & Guem J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40: 271-303
89. Kwart M., Himer B., Hummel S. & Frommer W.B. (1993). Differential expression of two related amino acid transporter with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4: 993-1002.
90. Labarca C.C., Nicholls P.B., & Bandursky R.S. (1965) A partial characterization of indoleacetyl inositol from *Zea mays* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20 641-646
91. Lado P., Ceana R, Bonnetti A., Marré M.T & Marré E. (1981). Effects of calmodulin inhibitors in plants I. Synergism with fusicoccin in the stimulation of growth and H<sup>+</sup> secretion and in the hiperpolarization of the transmembrane electric potential. *Plant Sci. Letts.* 23 253-262.
92. Laggarde D., Basseti M., Lepetit M., Conejero G., Gaymard F., Astruc S. & Grignon C (1996). Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *Plant J.* 9: 195-203.
93. Larsson Ch., Widell S. & Kjellbom (1987) Preparation of a high purity plasma membrane. *Meth. Enzymol.* 148: 558-569.
94. Larsson Ch., Sommarin M. & Widell S. (1994) Isolation of highly purified plant plasma membrane and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Meth. Enzymol.* 228. 451-469.
95. Lutter F.R., Ninneman O., Bucher M., Riesmeier J.W. & Frommer W.B. (1996). Preferential expression of an ammonium transporter and two putative nitrate transporter in roots hairs of tomato. *Proc Natl. Acad. Sci USA.* 93: 8139-8144
96. Logan H., Basset M., Very A.A. & Sentenac H (1997), Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology *Physiol. Plant.* 100: 1-15.
97. Marra M., Fullone M.R., Fogliano V., Pen J., Matter M., Masi S & Aducci P. (1994). The 30-kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparation is a 14-3-3 like protein. *Plant Physiol.* 106: 1497-1501
98. Mathieu Y., Lapous D., Thomine S., Laurière Ch. & Guem J. (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cell to elicitors. *Planta.* 199: 416-424.
99. Mayer A.M. & Poljakoff-Mayber (1989). The germination of seeds. 4th ed. Pergamon Press. London
100. McQueen-Mason S., Durachko D.M. & Cosgrove D.J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell.* 4: 1425-1433
101. McQueen-Mason S. & Cosgrove J.D. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6574-6578.
102. McQueen-Mason S. & Cosgrove J.D. (1995) Expansin mode of action on cell wall. *Plant Physiol.* 107: 87-100.
103. Michelet B. & Boutry M. (1995). The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. A highly regulated

- enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108: 1-6
104. Michelet B. & Boutry M. (1995). The plasma membrane  $H^+$ -ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108: 1-6.
105. Michelet B., Lukaswicz M., Dupriez V. & Boutry M. (1994). A plant plasma membrane proton ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of a translation regulation. *Plant Cell.* 6: 1375-1389.
106. Mistrik Y. & Ulrich C. (1996). Mechanism of anion uptake in plant roots. Quantitative evaluation of  $H^+/NO_3^-$  and  $H^+/H_2PO_4^-$  stoichiometry. *Plant Physiol. Biochem.* 5: 629-636
107. Moore T.C. (1979). *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones.* Springer-Verlag. New York.
108. Moore Th. (1989). *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones.* 2nd ed. Springer-Verlag. New York.
109. Moriau L., Bogaert P., Jomiaux J.B. & Boutry M. (1993). Identification and characterization of a second plasma membrane  $H^+$ -ATPase gene subfamily in *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* 21: 955-963.
110. Morphy D.J. (1993). Plant lipids: Their metabolism, function and utilization. In: *Plant Biochemistry and Molecular Biology* Lea P.J. and Leegood R.C. ed's. John Wiley and Sons. U.K.
111. Morré D.J., Brightman A.O. & Snedelius A.S. (1990). Membrane fractions from plant cells. In: *Biological Membranes. A Practical Approach.* Findlay J.B.C. & Evans W.H. ed's. IRL Press. Oxford University. U.K., New York, Tokio.
112. Müller-Rüber B., Ellenberg J., Provart N., Willmitzer L., Bush H., Becker D., Deitrich P., Huth S. & Hedrich R. (1995). Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying  $K^+$  channel expressed in potato guard cell. *EMBO J.* 14: 2409-2416.
113. Nakamura R.L., McKendree W.L. Jr., Hirsh R.E., Sedbrock J.C., Gaber R.F. & Sussman M.R. (1995). Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cell. *Plant Physiol.* 105: 371-374.
114. Ninneman O., Jauniaux J.C. & Frommer W.B. (1994). Identification of a high affinity  $NH_4^+$  transporter from plants. *EMBO J.* 13: 3464-3471.
115. Nowack J. & Bandursky R.S. (1980). Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursor of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 65: 422-427
116. O'Neill S.A. & Spanswick R.M. (1984). Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol.* 75: 586-591.
117. O'Neill S.A. & Spanswick R.M. (1984). Solubilization and reconstitution of a vanadate-sensitive  $H^+$ -ATPase from the plasma membrane of *Beta vulgaris*. *J. Membr. Biol.* 79: 231-243.
118. Ookura T., Wada M., Sakakiba Y., Joong K.H., Maruta Y., Kawamura Y. & Kasamo K. (1994). Identification and characterization of a family of genes for the plasma membrane  $H^+$ -ATPase of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol.* 35: 1251-1256.
119. Palgrem M. G., Sommarin M., Serrano R. & Larsson Ch. (1991). Identification of an autoinhibitory domain located in the C-terminal region of the plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 20470-20475.
120. Pardo J.M., & Serrano R. (1989). Structure of plasma membrane  $H^+$ -ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 264: 8557-8562.
121. Parets-Soler A., Pardo J.M. & Serrano R. (1990). Immunocytolocalization of plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Plant Physiol.* 93: 1654-1658.
122. Pedersen P.L. & Carafoli E. (1987) Ion motive ATPases I. Ubiquity and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146-150.
123. Pérez Ch., Michelet B., Ferrant V., Bogarts P. & Boutry M. (1992). Differential expression within a three gene subfamily encoding a plasma membrane  $H^+$ -ATPase in *Nicotiana glauca*. *J. Biol. Chem.* 267: 1204-1211.
124. Pérez García F. & Martínez Laborde J.B. (1994). *Introducción a la Fisiología Vegetal.* Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España.
125. Pérez-C., Michelet B., Ferrant V., Bogaerts P. & Boutry M. (1992). Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane  $H^+$ -ATPase in *Nicotiana glauca*. *J. Biol. Chem.* 267: 1204-1211.
126. Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.
127. Piskornik Z. & Bandursky R.S. (1972) Purification and partial characterization of a glucan containing indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 50: 176-186
128. Quantrana R.S. (1987). In: *Plant Hormones and their role in Plant Growth and*

- Development. pp 494. P.J. Davies ed. Nyhoff, Dordrecht.
129. Rasi-Caldogno F., DeMichelis M.L., Plugliarello M.C. & Marré E. (1986). H<sup>+</sup>-pumping driven by the plasma membrane ATPase in membrane vesicles from radish: stimulation by fusicoccin. *Plant Physiol.* 82: 121-125.
130. Rayle D.L. & Cleland R.E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
131. Reinhold I. & Kaplan A. (1984). Membrane transport of sugars and aminoacids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 45-83.
132. Riesmeier J.W., Willmitzer L. & Frommer W.B. (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11: 4705-4713.
133. Riesmeier J.W., Himer B. & Frommer W.B. (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell.* 5: 1591-1598.
134. Rottenberg H. (1979). The measurement of membrane potential and  $\Delta$ pH in cell, organelles and vesicles. *Meth. Enzymol.* 55: 547-569.
135. Rottenberg H. & Moreno-Sánchez J. (1993). The proton pumping activity of H<sup>+</sup>-ATPase: an improved fluorescence assay. *Biochem. Biophys. Acta.* 1183: 161-170.
136. Rubio F., Gassman W., & Schroeder J.I. (1995). Uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutation conferring salt tolerance. *Science.* 270: 1160-1663.
137. Ruiz-Cristin J.L. & Briskin D.P. (1991). Characterization of a H<sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> symporter associated with the plasma membrane vesicles of maize roots using <sup>36</sup>ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> as a radiotracer analog. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 74-85.
138. Salisbury E.B. & Ross C.W. (1994). *Fisiología Vegetal.* 4a. ed. Grupo Editorial Iberoamericana. México.
139. Sánchez-Nieto S. (1998). Tesis de Doctorado. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (Especialidad Bioquímica). Facultad de Química. UNAM. México.
140. Sandstrom R.P., DeBoer A.H., Lomax T.L. & Cleland R. E. (1987). Latency of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning. Increased substrate accessibility or enzyme activation *Plant Physiol.* 85: 693-698.
141. Schachtman D.P., Schroeder J.I. Lucas W.J., Anderson J.A., & Gaber R.F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science.* 258: 1654-1658.
142. Schachtman D.P. & Schroeder J.I. (1994). Structure and transport mechanism of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655-658.
143. Schroeder J.I., Wasrd J.M. & Gassman W. (1994). Perspectives in the physiology and structure of inward rectifying K<sup>+</sup> channels in higher plants: biophysical implications for K<sup>+</sup> uptake. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 441-471.
144. Segel I.H. (1993). *Enzyme Kinetics.* John Wiley & Sons. USA.
145. Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J.M., Gaymard F., & Gignou C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256: 371-374.
146. Serrano R. & Villalba J.M. (1993). Bomba de protones de la membrana vegetal. *Investigación y Ciencia.* Enero: 62-69.
147. Serrano R. (1990). Plasma Membrane ATPase In: *The Plant Plasma Membrane. Structure, Function and Molecular Biology.* C. Larsson & I.M. Møller, ed's. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
148. Serrano R., Montesino C. & Sánchez J. (1988). Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Sci.* 56: 117-122.
149. Serrano R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
150. Shimazaki K., Kinoshita T. & Nishimura M. (1992). Involvement of calmodulin and calmodulin-dependent myosin light chain kinase in blue light-dependent H<sup>+</sup>-pumping by guard cell protoplast from *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 99: 1416-1421.
151. Shimnun T.M. & Tazawa (1982). Effects of intracellular vanadate on electrogenesis excitability and cytoplasmic streaming in *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* 23: 669-677.
152. Shopfer P. (1993). Determination of auxin-dependent pH changes in coleptile cell walls by a null-point method. *Plant Physiol.* 103: 350-357.
153. Singer S.J. & Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-731.
154. Song W., Steiner H.Y., Zhang L., Naider F., Stacey G. & Becker J.M. (1996). Cloning a second *Arabidopsis* peptide transport gene. *Plant Physiol.* 110: 171-178.
155. Steiner H.Y., Song W., Zhang L., Naider F., Becker J.M. & Stacey G. (1994). *An Arabidopsis*



- peptide transporter is a member of a new class of membrane proteins. *Plant Cell*. 6: 1289-1299.
156. Surowy T.K. & Sussman M.R. (1986). Immunological cross-reactivity and inhibitor sensitivities of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from plants and fungi. *Biochem. Biophys Acta*. 848: 24-34.
157. Sussman M.R. (1994). Molecular analysis of protein in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234.
158. Tillberg E. (1977). Indolacetic acid levels in *Phaseolus*, *Zea* and *Pinus* during seed germination. *Plant Physiol.* 60: 317-319
159. Truernil E. & Sauer N. (1995). The promoter of *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene direct expression of  $\beta$ -glucouridase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*. 196: 564-570.
160. Tsay Y-F., Schoroeder J.I., Feldman K.R. & Crawford N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*. 72: 705-713.
161. Tubbe A. & Buckhout T.J. (1992). In vitro analysis of the H<sup>+</sup>-hexose symporter on the plasma membrane of sugar beets (*Beta vulgaris*). *Plant Physiol.* 99: 945-951.
162. Ueda M., Ehman A. & Bandursky R.S. (1970). Gas-liquid chromatographic analysis of indole-3-acetic acid myoinositol esters in maize kernels. *Plant Physiol.* 46: 715-719
163. Vara F. & Serrano R. (1983). Phosphorylated intermediate of the ATPase of plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 258: 5335-5336.
164. Vara F. & Serrano R. (1982). Partial purification and properties of the proton-translocating ATPase of plant plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 257: 12826-12830.
165. Very A-A., Gaynard F., Bosseaux G., Sentenac H., & Thibaud J-B. (1995). Expression of a cloned plant K<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J.* 7: 321-332.
166. Villalba J.M., Lützelshwab M. & Serrano R. (1991). Immunocytolocalization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves. *Planta*: 185: 458-461.
167. Voet D. & Voet J. (1995). *Biochemistry*. 2nd ed John Wiley and Sons.
168. Wach A., Schlessler A. & Goffeau A. (1992). An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi, and protozoa H<sup>+</sup>-ATPase genes. *J. Bioenerg Biomembr.* 24: 309-317.
169. Wada M., Takano M. & Kasamo K. (1992). Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase for rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 99: 794-795.
170. Widell S. & Larsson Ch. (1981). Separation of preservative plasma membranes from mitochondria by partition in an aqueous polymer two-phase system. *Physiol. Plant*. 51: 368-374.
171. Willsky G.R., White D.A. & McCabe B.C. (1984) Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 259: 13273-13281.
172. Zhen-Chang L., Durachko D.M. & Cosgrove D.J. (1993). An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta*. 191: 349-356.
173. Zhen-Chang L. & Bush D.R. (1990).  $\Delta$ pH dependent aminoacid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves I. Evidence for a carrier mediated, electrogenic flux through multiple transport systems. *Plant Physiol.* 94: 268-277.