

00551

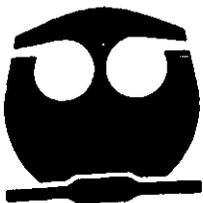


Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

14

IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN LAS MEMBRANAS
DE CAPA DE ALEURONA DE CEBADA INDUCIDOS
POR EL ÁCIDO GIBERÉLICO

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
B I O Q U Í M I C A S
P R E S E N T A:
VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA



México D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/025/2000

Q. REBECA VANESSA MAYA AMPUDIA
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

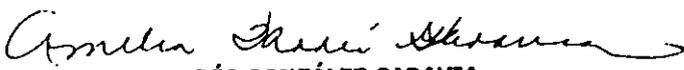
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 14 de enero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Identificación de cambios en membranas de capa de aleurona de cebada inducidos por ácido giberélico" dirigida por la Dra. Irma Bernal Lugo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
VOCAL	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
SECRETARIO	Dra. Gladys Cassab
SUPLENTE	Dr. Mario Rocha Sosa
SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Villanueva

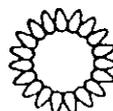
Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de enero de 2000.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*igg.



Dedicatoria

A Chepe

Agradecimientos

A mi Papá y Ade, por estar conmigo.

A Claudia, por decirme maestra desde antes y por todo lo que aunque no dicho, se sabe y se siente.

A Mau, por todo lo que compartimos.

A Pame, por su cariño y por todo lo que me ha enseñado.

A la Dra. Bernal, sin quien este trabajo no hubiese podido ser. Por su apoyo, paciencia, confianza y preocupación por formarnos no sólo en el aspecto académico.

A los miembros del comité tutorial Dra. Marina Gavilanes, Dra. Irma Bernal y Dr. Mauricio Díaz por sus invaluable observaciones y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Victoria Chagoya, Dra. Marina Gavilanes, Dra. Gladis Cassab, Dr. Mario Rocha y Dr. Marco Antonio Villanueva, por el tiempo dedicado y sus valiosos comentarios realizados durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Gloria Benítez, por su invaluable apoyo en tiempos difíciles.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A La Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades y apoyo que me ha dado para mi formación profesional.

A Maru y Gerardo por su ayuda y hospitalidad.

A Adriana y Laurel, con quienes he compartido todo este camino.

A Mauricio y Adriana, por su grandísima ayuda en esto de la tecnología moderna incomprensible para mí, pero sobre todo por su amistad.

A Chepe, para quien las palabras no son suficientes. Gracias por todo.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	15
LA CAPA DE ALEURONA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	15
PERCEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN	17
PERCEPCIÓN.....	17
TRANSDUCCIÓN MEMBRANAL.....	18
TRANSDUCCIÓN CITOPLÁSMICA.....	20
RESPUESTA FISIOLÓGICA	22
CAMBIOS DE ÓXIDO REDUCCIÓN EN MEMBRANA PLASMÁTICA	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28

MATERIALES Y MÉTODOS	29
MATERIAL BIOLÓGICO	29
PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS	29
OBTENCIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA	30
AISLAMIENTO DE MEMBRANAS	30
PREPARACIÓN DEL TEJIDO	30
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL	30
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	33
ENSAYOS ENZIMÁTICOS	34
ATPASAS	34
GLUCÁN SINTETASA II (GSII) COMO MARCADOR DE MEMBRANA PLASMÁTICA	35
NADH OXIDASA	36
FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i>	37
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS	38
DETERMINACIÓN DE INCORPORACIÓN DE ³² P EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA	39
RESULTADOS	40
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS DE ALEURONA	40
ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA	48
FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i>	51
DISCUSIÓN	70
ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA	70
FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i>	74
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXO I	95

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Efecto del AG ₃ y ABA sobre la expresión génica en la capa de aleurona	23
Tabla 2.	Efecto del año de cosecha de la semilla en el aislamiento y purificación de membrana plasmática de aleurona	41
Tabla 3.	Proteína recuperada de la homogenización de 200 aleuronas por diferentes métodos.	42
Tabla 4.	Distribución de la actividad marcadora de membrana plasmática en las fracciones de la centrifugación diferencial	44
Tabla 5.	Efecto de la concentración de polímeros en el sistema de fases sobre la recuperación de proteína y de actividad de GSII en la fase superior del sistema	45
Tabla 6.	Actividad de GSII en la FS de sistemas de 6.2% con uno y tres pasos de enriquecimiento	45
Tabla 7.	Enzimas marcadoras utilizadas para la detección de los diferentes tipos de membranas presentes en las fracciones del reparto de fases.	46
Tabla 8.	Determinación del tipo de membranas y su abundancia en las diferentes fracciones del reparto	48
Tabla 9.	Actividad de la NADH oxidasa en diferentes fracciones membranales obtenidas de aleuronas incubadas o no en medio líquido	49
Tabla 10.	Efecto del ácido giberélico en la actividad de la NADH oxidasa presente en vesículas de membrana plasmática	50

Tabla 11.	Efecto de ambiente oxidante y DTT en la actividad de la NADH oxidasa membranal	51
Figura 1.	Diagrama del reparto de fases en tres pasos	32
Figura 2.	Actividad de fosforilación en membrana plasmática y endomembranas de aleuronas incubadas en ausencia de fitorreguladores	54
Figura 3.	Efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad de fosforilación en membrana plasmática y endomembranas control	56
Figura 4.	Actividad y patrón electroforético de fosforilación de membrana plasmática y endomembranas control e incubadas con AG ₃	59
Figura 5.	Actividad y patrón electroforético de fosforilación de membrana plasmática y endomembranas control y de aleuronas incubadas con ABA	61
Figura 6.	Actividad y patrón electroforético de fosforilación de membrana plasmática y endomembranas control y de aleuronas incubadas con AG ₃ y ABA	64
Figura 7.	Efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad de fosforilación en membrana plasmática de aleuronas incubadas en presencia de AG ₃ , ABA y AG ₃ /ABA	66
Figura 8.	Efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad de fosforilación en endomembranas de aleuronas incubadas en presencia de AG ₃ , ABA y AG ₃ /ABA	69
Diagrama 1.	Elementos de fosforilación en membrana plasmática	82

ABREVIATURAS

³² P: fósforo radiactivo	MAPKK: cinasa de MAPK
ABA: Ácido abscísico	Nox: NADH oxidasa
ABRC: complejo de respuesta a ABA	P ^{**} : membrana plasmática de aleuronas incubadas con ABA y AG ₃
ABRE: elemento de respuesta a ABA	P [*] : membrana plasmática de aleuronas incubadas con AG ₃
AG ₃ : Ácido giberélico	P ^o : membrana plasmática control
AMPC: adenosín monofosfato cíclico	P [^] : membrana plasmática de aleuronas incubadas con ABA
AO: ácido okadaico	Pcinasas: cinasas de proteína
C: cinasa	PEG: polietilenglicol 3350
Ca: cinasa de proteína activa	Pfosfatasa: fosfatasa de proteína
Ca ^o : cinasa de proteína poco activa	PPa: fosfatasa de proteína activa
C-P: cinasa fosforilada	PPa ^o : fosfatasa de proteína poco activa
DAG: diacilglicerol	Pi: fósforo inorgánico
DTT: ditioneitol	pl: punto isoeléctrico
E ^{**} : endomembranas de aleuronas incubadas con ABA y AG ₃	PKC: cinasa C de proteína
E [*] : endomembranas de aleuronas incubadas con AG ₃	PLC: fosfolipasa C

E ^c : endomembranas control	PPst: fosfatasa de proteína de serina-treonina
E ^A : endomembranas de aleuronas incubadas con ABA	PPt: fosfatasa de proteína de tirosina
EDTA: ácido etilendiamino N,N'-tetraacético)	Psta: fosfatasa de serina-treonina activa
EGTA: ácido etilenglicol-bis-(β-amino-etiléter) N,N'-tetraacético	Psta: fosfatasa de serina-treonina poco activa
FI: fracción enriquecida en endomembranas	Pta: fosfatasa de tirosina activa
FM: fracción microsomal	Pta: fosfatasa de tirosina poco activa
FS: fracción enriquecida en membrana plasmática	PT: pastilla del homogenado total
GARC: Complejo de respuesta a AG ₃	R: receptor
GARE: Elemento de respuesta a AG ₃	RTK: receptores cinasa de tirosina
GMPc: guanilil monofosfato cíclico	SDS: dodecil sulfato de sodio
GSH: glutatión reducido	S: sustrato
GSII: glucán sintetasa II	tPKC: actividad tipo PKC
GSSG: glutatión oxidado	VO ₄ ³⁻ : vanadato
GTP: guanilil trifosfato	
HC: homogenado crudo	
HT: homogenado total	
IP ₃ : inositol(1,4,5)trifosfato	
MAPK: cinasa de proteína activada por mitógeno	

RESUMEN

La capa de aleurona es el tejido responsable de la movilización de reservas del endospermo almidonoso de cereales durante la germinación. Durante este proceso, el embrión inicia la síntesis de ácido giberélico (AG_3), que difunde hacia la aleurona. Aquí, el fitorregulador desata una serie de respuestas fisiológicas que permiten la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas hacia el endospermo almidonoso donde se ocupan para la digestión de las reservas.

La percepción del AG_3 en la aleurona se lleva a cabo a nivel de membrana plasmática. Dada la información que se tiene sobre los mecanismos de transducción, es de esperarse que ante la percepción del estímulo se lleven a cabo cambios importantes en los componentes de la membrana plasmática, que hagan posible la transmisión de la señal hacia el interior de la célula. Sin embargo, hasta el momento sólo ha sido posible

describir algunos eventos relacionados con la transducción que se presentan río abajo de la membrana después de que se ha percibido el estímulo.

Como una primera aproximación para la identificación de los cambios inducidos por fitorreguladores en la membrana plasmática, en este trabajo se estudiaron los cambios inducidos por el ácido giberélico en: a) la actividad de la NADH oxidasa, enzima integral de membrana plasmática; y b) en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática y endomembranas de aleurona. La primera se estudió dada su capacidad de ser modulada por su estado redox, por lo que puede servir como monitor de los posibles cambios de óxido-reducción inducidos por el AG₃. Además de que ésta ha sido propuesta como posible participante en procesos de transporte de iones y de formación de vesículas, por lo que reviste gran importancia en la regulación de la función secretora de la aleurona.

Por otra parte, existe evidencia que indica que durante la percepción de mensajeros químicos en las membranas se encienden procesos de fosforilación de diversas proteínas, como canales iónicos, enzimas involucradas en la generación de segundos mensajeros e incluso los mismos receptores activados por el agonista. Por ello, se estudió la fosforilación de las proteínas membranales. Ésta se evaluó por medio de ensayos de fosforilación *in vitro* para la detección de la actividad de cinasas membranales, de la obtención de los patrones electroforéticos de proteínas fosforiladas y de la determinación cuantitativa de ³²Pi incorporado en proteínas.

Los resultados señalan que en la aleurona existe la actividad de NADH oxidasa de tipo I. Esta óxidorreductasa inhibe su actividad por efecto del AG₃. Al parecer, el fitorregulador induce un cambio en el estado redox circundante de la enzima hacia una forma más oxidada, ya que la enzima logra recuperar su actividad basal al establecerse un ambiente reductor.

Adicionalmente, se lograron identificar tres elementos que participan en los procesos de fosforilación-desfosforilación: la tPKC, fosfatasas de serina-treonina y fosfatasas de tirosina. El comportamiento de estos elementos es modificado por el AG_3 y el ABA, tanto en membrana plasmática como en endomembranas.

INTRODUCCIÓN

Una de las características más notorias y sorprendentes de las células es su capacidad de *percibir* todo lo que sucede en su entorno y responder a los cambios en su medio ambiente y/o a circunstancias específicas en las que deben desempeñar una función particular. Para ello, las células cuentan con diversos mecanismos que les permiten percibir señales químicas, interpretarlas y traducirlas en una respuesta fisiológica específica.

La membrana plasmática de las células separa el interior de las mismas de su entorno. Durante mucho tiempo se pensó en esta membrana tan solo como una barrera que las delimitaba. Sin embargo, si es un hecho que existe comunicación entre el exterior e interior de la célula; entonces, ésta debe ser mediada por la membrana plasmática.

El proceso por el cual los estímulos externos a la célula pueden alterar su

comportamiento y hacerla emitir una respuesta se denomina transducción de señales. Estas señales pueden ser hormonas (fitorreguladores en el caso de las plantas) u otras especies moleculares como elicitores (Dixon and Lamb 1990), agua, e incluso señales físicas como la luz (Dangl *et al.* 1995) o la gravedad (Garril *et al.* 1997) que llegan a la membrana plasmática desde el exterior o de otras partes del organismo. Una vez ahí, el estímulo es internalizado o percibido *in situ* a través de un receptor.

Los receptores de membrana plasmática son proteínas transmembranales que contienen dominios extracelulares de unión específica al mensajero químico (Petty 1993). En general, la ocupación de estos sitios por un agonista específico promueve un cambio conformacional en la proteína receptora que se propaga hasta su porción intracelular. Una vez en la cara citoplásmica de la membrana, se llevan a cabo interacciones entre el receptor y otras proteínas que llevan a las etapas subsecuentes del proceso de transducción. Las primeras enzimas que participan en la transducción deben estar fuertemente asociadas a la membrana; o bien, ser reclutadas hacia ella en cuanto se percibe la señal.

El estudio de la transducción en diferentes sistemas ha llevado a la identificación de varios tipos de receptores. Varios de estos receptores funcionan por la activación de dominios intrínsecos de cinasa. Estos se conocen en general como receptores cinasa de proteína y pueden autofosforilarse en residuos de tirosina, o de serina y treonina (Braun and Walker 1996) o de histidina (Wurgler-Murphy and Satio 1997). Por ejemplo, la estimulación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) induce su dimerización y autofosforilación. En esta configuración, el receptor puede reclutar diversas proteínas con dominios SH2 y formar un complejo activado para la señalización por asociación con proteínas tales como proteínas G pequeñas, la cinasa-3 de fosfoinosítido, la cinasa 70 kDa S6, la cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK) y

la PLC γ , entre otras (Marshall 1995). Este tipo de receptores no ha sido aún identificado en plantas; sin embargo, la conservación de sitios regulatorios en algunas cinasas en estos organismos sugiere que la fosforilación en tirosina puede jugar un papel fisiológico importante en plantas superiores (Stone and Walker 1995).

Las cinasas tipo receptor (RLK) han sido identificados en diversas especies vegetales como el maíz, *Arabidopsis* y arroz. Estos receptores se dividen en tres clases: de dominio S, de repeticiones ricas en leucina y de repeticiones tipo factor epidérmico de crecimiento. En general, sus dominios catalíticos sufren autofosforilación en residuos de serina y treonina. Aún no se conoce mucho sobre las proteínas involucradas en la señalización río abajo de estos receptores, aunque se ha logrado identificar una fosfatasa que se une específicamente al dominio de cinasa de los RLK (KAPP) (Braun and Walker 1996). En el caso de *Arabidopsis*, por ejemplo, se ha demostrado que KAPP es un regulador negativo de la actividad de CLV1, un RLK que se requiere para el mantenimiento del tamaño de los meristemos del tallo e inflorescencias (Stone *et al.* 1998).

Otros receptores con actividad de cinasa son los que se encuentran en los sistemas de dos componentes y se caracterizan por el mecanismo de fosfotransferencia de histidina a aspartato (Loomis *et al.* 1997). Éstos han sido identificados en diversas especies eucariotas como plantas, hongos y levaduras. En particular en plantas, se ha identificado el gen ETR1 que codifica para un receptor de etileno que es una cinasa de histidina (Wurgler-Murphy and Satio 1997).

Finalmente, existen receptores que se asocian a proteínas G heterotriméricas y se caracterizan por tener siete dominios transmembranales. Cuando se unen a su agonista, éstos sufren un cambio conformacional que permite la activación del complejo de proteínas G por la unión de GTP a la subunidad G α (Berridge 1993). Este complejo

activado regula la actividad de diversas enzimas como la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (PLC) entre otras (Drayer and van Haastert 1994).

Como ya se mencionó, se ha logrado reconocer algunas de las enzimas con las que los receptores interactúan específicamente para generar los llamados segundos mensajeros, especies químicas que llevan la señal al interior de la célula. Entre estas enzimas se encuentran la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa y la PLC, que generan el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) , el guanilil monofosfato cíclico (GMPc) (Penson *et al.* 1996), el inositol(1,4,5) trisfosfato (IP₃) (Berridge, 1993), respectivamente. El Ca²⁺ también ha sido identificado como un segundo mensajero (Poovaiah *et al.* 1987). Estos compuestos pueden viajar hacia diversos puntos del interior celular y estimular diversas actividades enzimáticas que llevarán eventualmente a la emisión de una respuesta fisiológica específica.

La capa de aleurona ha sido muy utilizada como modelo de estudio de la transducción de señales en plantas. Esto se debe a que es un tejido cuya función específica (iniciar la movilización de reservas del endospermo almidonoso de las semilla de los cereales a través de la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas) es modulada por un fitorregulador, el ácido giberélico (AG₃) (Hill and MacGregor 1986). Además de que es uno de los pocos sistemas con familias de genes bien identificados que son regulados positiva y negativamente por diferentes fitorreguladores, cuyos productos están bioquímicamente identificados y son de fácil seguimiento (Jacobsen and Chandler 1988).

Existen estudios que indican que la percepción de la señal del AG₃ en la aleurona se lleva a cabo a nivel de la membrana plasmática (Gilroy and Jones 1994; Hooley *et al.* 1991), lo que sugiere la existencia de un receptor específico para el fitorregulador. También, se ha demostrado la presencia de proteínas capaces de unir GTP en la membrana plasmática (Wang *et al.* 1993) y de proteínas con similitud a las subunidades

G α y G β heterotriméricas, cuya presencia en membrana plasmática no ha sido comprobada (Jones H.D. *et al.* 1996). No obstante, en experimentos con estimulantes de la actividad de intercambio de GDP/GTP por proteínas G heterotriméricas, Mas7 y GTP- γ -S, se ha observado la inducción de la expresión del gen de α -amilasa y la secreción de la enzima. Mientras que la presencia de GDP- β -S, inhibidor de este intercambio, elimina la expresión del gen reportero α -Amy2/54:GUS. Esta evidencia sugiere que las proteínas G heterotriméricas pueden estar involucradas en la expresión de los genes de α -amilasa en la aleurona (Jones, H.D. *et al.* 1998).

A nivel citoplásmico, se han documentado incrementos en los niveles de Ca²⁺ (Bush 1996) y de IP₃ (Chen *et al.* 1997) en este tejido en respuesta al AG₃. Esta información sugiere que en la aleurona existe un mecanismo de transducción de señales que podría involucrar un receptor membranal capaz de interactuar con la PLC, para generar estos segundos mensajeros. Asimismo se podría especular sobre la posible presencia de la cinasa C de proteína (PKC) en este sistema, ya que ésta se recluta hacia la membrana plasmática y se activa por el diacilglicerol producido a través de la PLC.

Resulta evidente que la percepción inicial del AG₃ en la aleurona se lleva a cabo a nivel de la membrana plasmática. Es ahí donde se integra la señal que se traducirá en eventos bioquímicos intracelulares que resulten en la expresión de los genes de la α -amilasa. Es por esto que el estudio de los componentes del sistema de percepción y su comportamiento ante la presencia del mensajero químico en este modelo permitirá la identificación y caracterización más precisas de los elementos de transducción presentes en él. Así como también, ayudará a determinar inequívocamente su relación con los diferentes eventos de transducción y respuesta ya identificados.

ANTECEDENTES

LA CAPA DE ALEURONA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La capa de aleurona es un tejido vegetativo que constituye parte del endospermo de la semilla de un cereal. Este tejido está formado de una a tres capas de células rodeadas por una pared celular rígida (Jacobsen and Chandler 1988).

La capa de aleurona juega un papel muy importante en el crecimiento del embrión, ya que es la responsable de la movilización de reservas del endospermo almidonoso en las primeras etapas de este proceso. La movilización de reservas por medio de este tejido se estimula a través de un fitorregulador que es el ácido giberélico (AG_3); y se inhibe por el ácido abscísico (ABA) (Jacobsen and Chandler 1988). Esto ha convertido a la capa de

aleurona en un importante sistema de estudio de la acción de fitorreguladores y mecanismos de transducción de señales en plantas.

El mecanismo mediante el cual la capa de aleurona inicia la movilización de reservas se describe a continuación. En primera instancia, al momento de iniciarse la germinación de la semilla, el embrión empieza a sintetizar AG_3 . Este fitorregulador difunde hacia el endospermo almidonoso hasta llegar a la capa de aleurona. Una vez allí, el AG_3 indica a la aleurona iniciar la hidrólisis de sus proteínas de reserva; así como la síntesis *de novo* de una serie de enzimas hidrolíticas (Hill and MacGregor 1986). Entre estas enzimas se encuentran predominantemente la α -amilasa y la β -glucosidasa, aunque también existen algunas proteasas, lipasas y fosfatasas (Jacobsen and Chandler 1988). Estas enzimas son secretadas hacia el endospermo almidonoso donde inician la degradación de las reservas. Los productos de hidrólisis eventualmente viajan al embrión, en donde son aprovechados para su desarrollo (Jacobsen and Chandler 1988).

Desde hace muchos años, la aleurona ha sido estudiada principalmente en lo que se refiere a las respuestas fisiológicas reguladas por el AG_3 . Dentro de éstas se encuentran la regulación génica y síntesis diferencial de α -amilasa (Rogers and Milliman 1984; Lazarus *et al.* 1985), la síntesis y secreción de fosfatasa ácida (Hooley 1984), los cambios intracelulares de calcio (Gilroy and Jones 1992; Bush 1996) y el aumento de calmodulina (Gilroy 1996) entre otros.

Más recientemente, el estudio de la aleurona se ha enfocado a dilucidar los diferentes factores que participan en la transducción de la señal del AG_3 . La estrategia general que se ha utilizado es la de detectar qué eventos o metabolitos comúnmente relacionados con la transducción de señales en otros sistemas se encuentran también en la aleurona. De esta forma ha sido posible ir construyendo un panorama general de lo que podría ser el mecanismo de transducción de la señal del ácido giberélico en este tejido.

PERCEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN

PERCEPCIÓN

Existen estudios que indican que el AG₃ se percibe a través de la membrana plasmática de las células de la aleurona. El fundamento de esos experimentos se basa en determinar la respuesta de protoplastos de aleurona al AG₃, restringiendo su presencia sólo al exterior de la célula, o bien evitando su contacto con la membrana plasmática.

El primer enfoque se realizó con un derivado del AG₄ al que se le unieron perlas de sefrosa, de manera tal que el fitorregulador fuera impermeable al protoplasto. Se observó que los protoplastos tratados con este derivado eran capaces de responder al fitorregulador con la síntesis y secreción de α -amilasa. Asimismo, este derivado se probó en el tejido íntegro, y se encontró que también era capaz de responder con la síntesis y secreción de la enzima aunque en menor grado. Es factible que la respuesta disminuida se deba a que la pared celular de las células impida el contacto directo del AG₄ con la membrana plasmática, ya que la sefrosa representa un gran impedimento estérico (Hooley *et al.* 1991)

Otro de los enfoques utilizados para determinar el sitio de percepción del AG₃, ha sido el de sintetizar reactivos de fotoafinidad de este último. Esto con el fin de identificar las proteínas de membrana que se unen específicamente al derivado. Se han sintetizado una gran variedad de estos compuestos. Sin embargo, en los primeros experimentos sólo se lograron identificar proteínas que se unían con poca especificidad al compuesto. O bien, las proteínas que se enlazaban eran solubles, probablemente enzimas involucradas en el metabolismo del fitorregulador. Hasta muy recientemente, se han podido identificar dos polipéptidos membranales que se unen específicamente a reactivos de fotoafinidad de AG₃ (Walker, *et al.* 1994). Actualmente, estos péptidos están siendo caracterizados,

para determinar su posible función como receptores de membrana.

Por otra parte, se realizaron experimentos de microinyección de AG_3 en protoplastos de avena. Se encontró que los protoplastos microinyectados con el fitorregulador no presentaban ninguna de las respuestas tradicionales evaluadas, como la síntesis y secreción de α -amilasa, vacuolación y la expresión de GUS fusionado a un promotor de α -amilasa. Mientras que esos mismos protoplastos incubados con AG_3 exógeno sí las presentaban. De esta forma se comprobó que, en efecto, si se requiere un primer contacto del AG_3 con la membrana plasmática para ejercer su acción (Gilroy and Jones 1994). Un enfoque similar se utilizó para determinar el sitio de percepción de ABA. Los resultados indicaron que existen dos sitios de percepción de ABA en la célula de la aleurona de cebada: uno en la membrana plasmática y otro en su interior. El primero parece ser el responsable de la inhibición de la respuesta a AG_3 , mientras que el segundo estimula la expresión ABA-específica del gene *Em* (Gilroy and Jones 1994).

TRANSDUCCIÓN MEMBRANAL

Para el estudio de los procesos de transducción de señales en plantas se han utilizado estrategias experimentales que pretenden identificar los homólogos de los factores de transducción descritos en animales. Estas estrategias han permitido encontrar elementos comunes para ambos sistemas.

Uno de los efectos del AG_3 más ampliamente estudiados es el movimiento de Ca^{2+} dentro de la célula. Se ha determinado que la concentración de este catión se incrementa desde 100 nM hasta aproximadamente 500 nM por efecto del AG_3 (Bush 1996). La secreción de α -amilasa requiere que la concentración de calcio sea alrededor de 400 nM (Gilroy *et al.* 1996).

Gilroy (1996) realizó experimentos en los que por medio de la inyección de Ca^{2+} y

de compuestos quelantes en protoplastos de cebada simularon el comportamiento del calcio intracelular ante el estímulo con AG_3 . Con el fin de determinar si esto era suficiente para desatar la respuesta de las células al fitorregulador, se evaluaron diferentes parámetros que indicaran la respuesta del protoplasto. Se encontró que ninguno de los tratamientos lograba iniciar la respuesta normal del protoplasto al AG_3 , excepto en el caso de la secreción de la α -amilasa, para la cual el Ca^{2+} resultó crítico.

De aquí, se concluyó que el cambio en el calcio intracelular no es el único elemento que dirige la respuesta del sistema al ácido giberélico. Entonces, se propuso que más que un incremento neto en la concentración del catión, el sistema requiere de varios elementos que en conjunto generen los cambios sutiles, localizados y temporales de Ca^{2+} en el citoplasma, responsables de dirigir la señal del AG_3 al interior de la célula.

Para generar esta heterogeneidad espacial de concentración de Ca^{2+} , se ha propuesto la participación de canales de Ca^{2+} (Schroeder and Hagiwara 1990) y de una Ca^{2+} -ATPasa (Bush and Wang 1995) de membrana plasmática, cuyas actividades serían moduladas por el fitorregulador.

En otro estudio, se detectó que otro de los genes cuya expresión es regulada por AG_3 corresponde a una Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico. Se demostró que la sobreexpresión del gene de esta Ca^{2+} -ATPasa permite la expresión de α -amilasa correspondiente a la de las células inducidas con AG_3 . De forma tal que, el movimiento de calcio producto de la actividad de esta enzima podría también resultar importante en la transducción de la señal del fitorregulador (Chen *et al.* 1997)

Con base en lo anterior, se realizaron experimentos enfocados a detectar cambios en los niveles de inositol trifosfato (IP_3), ya que este compuesto ha sido identificado como segundo mensajero responsable de la activación de canales de calcio en el retículo endoplásmico. Se encontró que, en efecto, el AG_3 provoca un incremento pronunciado en

la concentración de IP_3 en la célula a los 25 minutos de inducción (Chen *et al.* 1997).

Esto sugiere la participación de los receptores de IP_3 transportadores de Ca^{2+} de retículo endoplásmico. Cabe destacar además, que la presencia e inducibilidad del IP_3 apunta hacia otra actividad de membrana plasmática posiblemente involucrada en el proceso de transducción de señales, la fosfolipasa C (PLC).

Consistente con este tipo de mecanismo, se ha documentado la presencia de proteínas G en membrana plasmática de aleurona de avena (Jones H.D. *et al.* 1998). Sin embargo, su participación en la transducción de señales en plantas aún no ha sido determinada (Wang *et al.* 1993). Asimismo, se han detectado dos proteínas con homología a las subunidades $G\alpha$ y $G\beta$ de las proteínas G heterotriméricas. No obstante, su localización en la membrana plasmática no ha sido comprobada (Jones H.D. *et al.* 1998).

TRANSDUCCIÓN CITOPLÁSMICA

Por otra parte, dado que el GMP cíclico ha sido propuesto como segundo mensajero en plantas (Penson *et al.* 1996), también este compuesto ha sido estudiado para encontrar una posible función en este sistema.

Además del incremento en la concentración de IP_3 citoplásmico, se encontró que los niveles de GMPc se incrementan de manera importante aproximadamente a las dos horas de inducción con AG_3 . Utilizando un inhibidor de la guanilil ciclasa (LY), se demostró que la inhibición del incremento en la concentración del GMPc disminuye por lo menos en un 50% la capacidad del sistema para producir α -amilasa. Mientras que la presencia de un análogo de GMPc, el DB-GMPc, y AG_3 restablecen la producción de la enzima, aún en presencia de LY. De esta forma, se añade otro elemento más que puede ser importante en la transducción de la señal del AG_3 (Penson *et al.* 1996).

Otra estrategia que se ha empleado para estudiar la transducción de señales en la aleurona es el uso de inhibidores o estimulantes de actividades enzimáticas involucradas en la generación de segundos mensajeros y/o reguladores de las vías de transducción.

Por medio de esta estrategia se ha demostrado que los procesos de fosforilación son importantes en la señalización del AG_3 y el ABA en aleurona. Por ejemplo, se ha encontrado que el ácido okadaico (AO), un inhibidor potente de fosfatasa de serina-treonina (PPst), es capaz de suprimir la respuesta de la aleurona al AG_3 . Se comprobó que en la presencia simultánea de este compuesto y AG_3 en la aleurona, los niveles de ARNm de α -amilasa son casi imperceptibles. De la misma manera que los niveles de ARNm del gene PHAV1, regulado por ABA, se ven disminuidos. Esto sugiere la participación de fosfatasa de proteínas, particularmente del tipo 1 y 2A, en la transducción de la señal de ambos fitorreguladores (Kuo *et al.* 1996).

Por otra parte, existe evidencia indicando que, por lo menos en la regulación de la secreción de α -amilasa, las cinasa de serina-treonina no están involucradas (Kuo *et al.* 1996). Sin embargo, esto no descarta su posible participación en la modulación de otros eventos de transducción y/o respuesta.

Con respecto a la inducción de la aleurona con ABA, se ha encontrado que este promueve un incremento en la actividad de la cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK) (Knetsch *et al.* 1996). Esta enzima es una cinasa de serina y treonina que forma parte de una cascada de amplificación de señales por fosforilación secuencial de cinasa de proteína, factores de transcripción y elementos del citoesqueleto entre otros (Johnson and Vaillancourt 1994). La particularidad de estas cinasa es que tan solo se activan cuando están fosforiladas simultáneamente en residuos específicos de tirosina y treonina (Nishida and Gotoh 1993). El uso de un inhibidor específico de fosfatasa de tirosina (PPT), elimina la activación de MAPK, por lo que se ha propuesto que la activación de esta

cinasa se lleva a cabo por una cinasa de MAPK (MAPKK) que se activa por desfosforilación en residuos de tirosina. Entonces, se ha propuesto la participación de una PPT en la transducción de ABA via la MAPK (Knetsch *et al.* 1996). Hasta el momento, no se ha podido comprobar si existe algún efecto de AG_3 sobre la actividad de MAPK, tan solo se ha logrado determinar que el fitorregulador reduce la acumulación del ARNm de un homólogo de esta cinasa en aleurona de avena (Huttly and Phillips 1995).

Ante toda esta información, es claro que el mecanismo de transducción de la señal del AG_3 y del ABA en la aleurona está muy lejos de ser sencillo. De hecho, al parecer existen múltiples factores participando en él, de manera simultánea, o bien secuencial y concertada.

RESPUESTA FISIOLÓGICA

Aún cuando algunos de los eventos que suceden en las células de la aleurona no se pueden delimitar completamente como parte de la transducción y/o de la respuesta (como en el caso de las fluctuaciones en los niveles de Ca^{2+}), una respuesta inequívoca del sistema ante la presencia del AG_3 y el ABA es la expresión específica de algunos genes. En la siguiente tabla se presenta el efecto de los fitorreguladores sobre la expresión de algunos genes (Bethke *et al.* 1997).

Varios de estos genes y sus promotores ya han sido aislados. Los estudios de expresión transitoria de construcciones de los promotores con genes reporteros en capas de aleurona y protoplastos del mismo tejido han ayudado a un mejor entendimiento de la expresión génica modulada por fitorreguladores (Bethke *et al.* 1997).

Tabla 1. Efecto del AG₃ y ABA sobre la expresión génica en la capa de aleurona

FITORREGULADOR	EXPRESIÓN GÉNICA	
	INCREMENTO	DECREMENTO
AG₃	CaM: Calmodulina α-amilasa GAMYB: Factor trans de unión a GARE	MAPK Globulina
	Em: Factor trans de unión a ABRE ASI: Inhibidor amilasa- subtilisina Rab-16 PHAV1 HVA1/HVA22 Dehidrina	α-amilasa GAMYB

El gen más estudiado en este sistema es el de la α-amilasa. Esta enzima es importante para la degradación de la amilosa y la amilopectina del almidón del endospermo. Existen diferentes grupos de isoenzimas que se separan en función de sus puntos isoeléctricos (pI) (Jacobsen and Chandler 1988).

Se ha demostrado que la síntesis de los dos grupos de isoenzimas es dirigida por dos poblaciones separadas de ARNm y se encuentran en diferentes cromosomas (Lazarus *et al.* 1985).

Con base en los resultados de varios estudios, se ha determinado que el AG₃ promueve la acumulación de ARNm de la α-amilasa y el ABA la inhibe (Jacobsen and Chandler 1988). El ARNm de la α-amilasa de bajo pI se incrementa de 10 a 20 veces como respuesta al AG₃ durante las primeras 24 hs y responde a niveles bajos del fitorregulador (aproximadamente 10⁻⁸M). Por otra parte, el mensajero de la enzima de alto pI se incrementa de 50 a 100 veces de las 12 a las 16 hs en presencia del AG₃ y requiere de altas concentraciones del fitorregulador (10⁻⁶ M). Esto sugiere que los genes de los diferentes grupos son regulados diferencialmente (Rogers 1984).

Las evidencias obtenidas de experimentos con diferentes construcciones del promotor de la α -amilasa indican que la regulación de su expresión por AG₃ y ABA se lleva a cabo a nivel transcripcional (Jacobsen and Beach 1985; Zwar and Hooley 1986). También se han descrito regiones conservadas en este promotor que le confiere inducibilidad por AG₃. Estas regiones han sido denominadas como el complejo de respuesta a AG₃ (GARC) (Gubler and Jacobsen 1992) y el elemento de respuesta a AG₃ (GARE) (Skriver *et al.* 1991), los cuales al parecer son secuencias redundantes y de unión a proteínas. No ha sido posible determinar qué nucleótidos en estos dominios son responsables de la inhibición de la expresión por ABA. Estos elementos de respuesta en conjunto con otras secuencias (llamadas elementos acoplantes) como la O2S, la caja de pirimidinas y la caja I permiten el incremento en la transcripción de los genes de la α -amilasa de alto y bajo pI (Sutliff *et al.* 1993). Además, se han identificado proteínas de unión específica a estos elementos de respuesta como GAB1 y GAMYB. La primera es un factor trans capaz de unirse a GARE e inhibir la transcripción de los genes de amilasa en ausencia de AG₃ (Rogers *et al.* 1992). GAMYB, cuya transcripción también es inducible por AG₃, se une al mismo elemento y regula positivamente la expresión de los genes de la enzima (Gubler *et al.* 1995).

La expresión de los genes inducibles por ABA se lleva a cabo a través de la secuencia en el promotor denominada ABRE (elemento de respuesta a ABA) y los elementos acoplantes que forman los complejos de respuesta a ABA (ABRC) (Shen and Ho 1995; Shen *et al.* 1996). Estos elementos son suficientes para la inducción por ABA de la expresión de HAV1 y HAV22 (Shen *et al.* 1996). No obstante, no se ha logrado determinar precisamente la presencia y participación de estos elementos en otros genes inducibles por ABA. Por otra parte, se ha identificado a la proteína EmBP-1 de trigo que codifica para una proteína de alta afinidad por ABRE en el promotor del gene *Em*.

Asimismo, se ha descrito que el producto del gene VP1 puede transactivar los ABRC del gene inducido por ABA HVA1 así como al gen OSEm, homologo de Em en arroz (Bethke *et al.* 1997).

CAMBIOS DE ÓXIDO REDUCCIÓN EN MEMBRANA PLASMÁTICA

Con el descubrimiento de las actividades redox asociadas a las membranas plasmáticas de eucariotes, se inició también el estudio de su capacidad de responder a hormonas. En particular, entre las óxidorreductasas que se han descrito en este tipo de membrana, se ha propuesto la existencia de una NADH oxidasa que podría participar en los procesos de señalización, tal es el caso de la NADH oxidasa de la membrana plasmática de células de hepatoma y la de hipocotilo de frijol soya, cuyas actividades son moduladas por hormonas y fitorreguladores, respectivamente (Morré 1994). También, se ha descrito que la actividad de proteínas membranales, como la K^+ , Mg^{2+} -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasa, la PLC y canales iónicos, es modulada por un sistema de NADH oxidasa de membrana plasmática. En este caso se ha propuesto que el efecto se debe a que la óxidorreductasa mantiene en estado reducido a algunos grupos sulfhidrilo esenciales presentes en estas proteínas (Moller and Crane 1990).

En la capa de aleurona no se ha descrito la existencia de esta oxidasa. Sin embargo, las características de la respuesta hacia el AG_3 de la NADH oxidasa detectada en este trabajo, sugieren la presencia de ciertos elementos susceptibles de ser modificados por cambios de naturaleza redox. Un ejemplo de ello es el incremento de Ca^{2+} intracelular que aparentemente se realiza a través de la activación de canales y de Ca^{2+} -ATPasa. Como ya se mencionó, la actividad de ambos sistemas es capaz de ser modulada por cambios en el estado redox de la membrana plasmática (Moller and Crane 1990).

Por otra parte, en levaduras y sistemas animales se ha demostrado que el estado redox de la célula contribuye a la formación de distintos dominios en la membrana plasmática, lo que contribuye a la fusión de vesículas membranales (Aroeti *et al.* 1998). Esto resulta de gran relevancia para la aleurona, ya que su función principal es la de secretar enzimas hidrolíticas.

Por lo anterior, el estudio de la óxidorreductasa en nuestro sistema podrá servir como una forma de evaluar si el AG₃ promueve algún cambio en el estado redox de la membrana plasmática; y a través de éste modular la actividad de los componentes que participan en la señalización y/o en la respuesta celular.

HIPÓTESIS

Dado que las membranas de las células de la capa de aleurona participan en los eventos tempranos de la transducción y respuesta al ácido giberélico; entonces, en dichas membranas se podrán identificar elementos que se ven modificados por efecto del fitorregulador y que podrían estar asociados a su percepción, transducción y/o respuesta.

OBJETIVOS

- Obtener una fracción de membrana plasmática y otra de endomembranas por medio de un reparto de fases en polímeros acuosos y determinar el enriquecimiento logrado por medio de la medición de actividades enzimáticas marcadoras de membrana.
- Identificar la actividad de la NADH oxidasa en la capa de aleurona de cebada.
- Determinar si el AG₃ tiene efecto sobre la actividad de la NADH oxidasa.
- Identificar elementos de fosforilación-desfosforilación -quinasas y fosfatasas- en las membranas cuya actividad se modifique por la presencia del AG₃ y/o ABA y puedan estar asociados a la percepción y/o transducción de estos fitorreguladores.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas de cebada *Hordeum vulgare*, variedad Himalaya, cosecha 1996, obtenidas del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA.

PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas de cebada se cortaron transversalmente eliminando el embrión. Las medias semillas sin embrión se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 1.2% (v/v), agitándolas en esta disolución durante 20 minutos. Se enjuagaron repetidamente con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de hipoclorito.

OBTENCIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA

Previamente a la obtención de las capas de aleurona, las medias semillas desinfectadas se pusieron a embeber durante 72 hs a $30^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ sobre dos círculos de papel filtro Whatman No. 1 y con 7 ml de agua destilada estéril en cajas de Petri. Al término de este tiempo, se eliminó el endospermo almidonoso con la ayuda de dos espátulas. Todas las manipulaciones con las semillas desinfectadas se realizaron en condiciones estériles.

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS

PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las capas de aleurona aisladas (200) se molieron en un mortero con pistilo en amortiguador de homogeneización [sacarosa 330 mM, ácido etiléndiamino tetraacético (EDTA) 5 mM, β -mercaptoetanol 15 mM, Tris/MES 100 mM pH 5.5, cocktail de inhibidores de proteasas (Boehringer, 1 pastilla/ 50 ml medio)] en una relación de 20 aleuronas por ml de medio. Finalmente, el homogenado crudo se hizo pasar a través de cuatro capas de gasa, eliminando así la mayor parte de los residuos celulares. En todo momento la preparación se mantuvo a 4°C .

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL

El homogenado crudo se centrifugó a 10000 X g durante 10 min a 4°C . La pastilla se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 112000 X g durante 1 h. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla resuspendida en amortiguador de homogeneización, esta fracción se denominó fracción microsomal (FM).

Obtención de fracciones enriquecidas en vesículas de membrana plasmática y de endomembranas por el método de reparto en un sistema de polímeros

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

La mezcla de fases consistió de lo siguiente:

Componente	Cantidad	Concentración final
Dextran T-500 20%	1.674 g	6.2% p/p
Polietilenglicol 3350 40%	0.837 g	6.2% p/v
Sacarosa	0.457 g	330 mM
KH ₂ PO ₄ 0.2 M pH 7.8	0.168 ml	5 mM
KCl 2M	0.006 ml	3 mM
H ₂ O cbp	4.05 g	---

Dado que el procedimiento considera tres etapas de purificación, se prepararon tres sistemas de fases. Cada sistema se preparó pesando 1.674 g de Dextrán T-500 al 20% p/p en agua en un tubo Corex de 15 ml. A ese mismo tubo se añadieron 0.837 g de Poli-etilenglicol 3350 al 40% p/v en agua sin volver a tarar la balanza (es decir que se lleva al peso acumulado de Dextran y poli-etilenglicol). De la misma manera, se agregaron 0.457 g de sacarosa en polvo. Después se añadió la cantidad indicada de KH₂PO₄ 0.2 M pH 7.8 y KCl 2M. Del peso final obtenido, uno de los sistemas se llevó a un peso de 4.05 g con agua para obtener las concentraciones finales especificadas. A este último se le agregó la fracción microsomal para alcanzar un peso de 5.4 g. Los otros dos sistemas se llevaron a 5.4 g con agua.

La mezcla de fases junto con la fracción microsomal se agitó invirtiendo energicamente el tubo 30 veces a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 1800 RPM por 8 min a 4°C para volver a separar las fases. A continuación se realizó el intercambio de fases con sistemas limpios como se muestra en la figura 1.

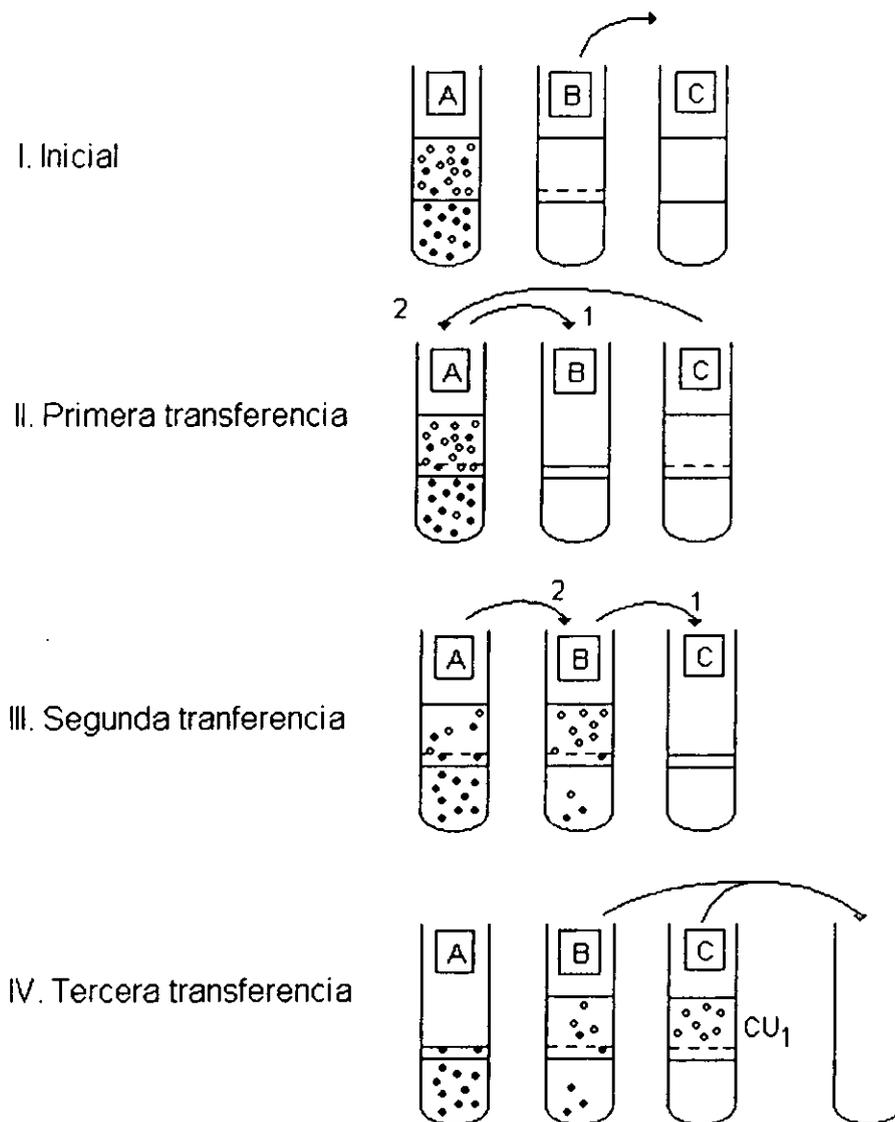


Figura 1. Diagrama del reparto de fases en tres pasos. I. El sistema A (A) se cargó con la fracción microsomal y la fase superior del sistema B (FS_B) fue descartada. II. Una vez separadas las fases de A, se transfirió FS_A sobre la fase inferior de B (FI_B), y la FS_C se transfirió a A. III. Ya separadas las fases, la FS_B se transfirió sobre la FI_C y la FS_A a la FI_B, se separaron las fases y se colectaron las FS y FI.

Al término de este procedimiento, las fases superiores (enriquecidas en membrana plasmática) se mezclaron en un tubo de policarbonato para ultracentrifuga y se diluyeron aproximadamente tres veces con una solución amortiguadora de Tris/HCl 100 mM pH 8.0 con inhibidores de proteasas. Las fases inferiores (enriquecidas en endomembranas) se mezclaron y diluyeron aproximadamente 10 veces con la misma solución. Las fases diluidas fueron centrifugadas a 125000 X g durante 2 h a 4°C en una ultracentrifuga Beckman XL-90.

Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 50-200 µl de medio de resuspensión (sacarosa 330 mM, EDTA 5 mM, Tris/MES 100 mM pH 5.5, cocktail de inhibidores Boehringer). Las fracciones se almacenaron a -70°C.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

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

En 0.9 ml de agua destilada se agregaron de 5 a 10 µl de muestra (FM, FS o FI), 0.1 ml de desoxicolato de sodio al 0.15% (p/v) y 0.1 ml de ácido tricloroacético al 72% (v/v). La proteína precipitada se centrifugó a 3500 RPM durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.0 ml de agua destilada, 0.1 ml de desoxicolato de sodio 0.15% (p/v), 1.0 ml de reactivo A, que contiene en partes iguales: agua destilada, hidróxido de sodio 0.8 M, dodecilsulfato de sodio al 10% (p/v) y CTC (Na_2CO_3 al 10% (p/v), CuSO_4 al 0.1% (p/v) y $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ al 0.2% (p/v)), y 0.5 ml de reactivo B (Reactivo Folin Ciocalteu y agua destilada 1:5). Se dejó desarrollar color durante 30 min, al término de los cuales se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro LKB Ultrospec II a 750 nm.

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

ENSAYOS ENZIMÁTICOS

ATPASAS

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

En este método, se añadieron 10 μ g de proteína de la fracción membranal a un medio que contiene sacarosa 250 mM, Tris/HCl 10 mM pH 7.0, carbonilcianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) 7 μ M, ATP/Tris 10 mM pH 7.0, cloruro de magnesio 10 mM y lisofosfatidilcolina 100 μ M en un volumen total de 150 μ l. Se incubó a 30°C durante 1 h, al término de la cual se detuvo la reacción por la adición de 150 μ l de reactivo A (dodecil sulfato de sodio al 24%). Después se agregaron los reactivos para desarrollar color: 300 μ l de reactivo D que consiste de la mezcla 1:1 del reactivo B (ácido ascórbico 12% en HCl 1N) y reactivo C (molibdato de amonio 2% en HCl 1N) y 450 μ l de reactivo E (citrate de sodio 2% y metaarsenito de sodio 2% en ácido acético al 2% en agua), el cual se adicionó a los 3-7 min de haber añadido el reactivo D. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y se hicieron las lecturas de absorbencia a 850 nm. Habiendo realizado la curva patrón con 10 a 60 nmoles de fosfato, la actividad de las

ATPasas se midió como la liberación de fosfato inorgánico expresado como nmoles de Pi mg^{-1} proteína h^{-1} .

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

Inhibidor	Enzima inhibida	Concentración final
Tris- NO_3	ATPasa de tonoplasto	200 mM
Na_3VO_4	ATPasa de membrana plasmática	200 μM
NaN_3	ATPasa mitocondrial	2 mM
Na_3MoO_4	Fosfatasas ácidas	0.5 mM

GLUCÁN SINTETASA II (GSII) COMO MARCADOR DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La actividad de la glucán sintetasa II fue medida según Kauss *et al.* (1983) con algunas modificaciones. La determinación se basa en la incorporación de UDP- $[\text{H}^3]$ -glucosa a la celobiosa.

La reacción se inició con la adición de 5 μg de proteína de la fracción microsomal (FM), de la fracción enriquecida en membrana plasmática (FS) o fracción enriquecida en endomembranas (FI) en el medio de ensayo que contenía en un volumen total de 100 μl :

Reactivo	Concentración final
TRIS/HCl (pH 7.0)	50 mM
Sacarosa	330 mM
Digitonina	0.006%
Glicerol	16.0%
Ditiotreitol (DTT)	2 mM*
Espermina	2 mM*
Celobiosa	20 mM
Cloruro de calcio	0.2 mM
Cloruro de Magnesio	10 mM
EGTA	4 mM
UDPG	2 mM
UDP- ³ H] glucose	20 GBq/mol

Las muestras se incubaron durante 30 min a 25°C. La reacción se detuvo por la adición de una disolución 2 mM de UDP-glucosa en etanol al 70% a 4°C (Ray 1979). Las muestras se colocaron sobre círculos de papel filtro Whatman 3MM. Estos se dejaron secar completamente. Los filtros fueron lavados dos veces durante una hora con una mezcla al 30% de etanol en acetato de amonio 0.5 M pH 3.6 a temperatura ambiente con agitación constante (Kauss *et al.* 1983). Se dejaron secar y se transfirieron a un vial con 4 ml de líquido de centelleo. Se contó la radiactividad incorporada a la muestra en un Liquid Scintillation Counter Beckman LS6000 IC. La actividad específica se expresó en η mol de glucosa incorporada por minuto por mg de proteína y se calculó a partir de la radiactividad específica contenida en la mezcla de reacción.

NADH OXIDASA

La actividad de la NADH oxidasa se determinó midiendo el decremento en la absorbencia del NADH a 340 nm según la metodología reportada por Morré *et al.* (1995).

La reacción se inició con la adición de 20 μ g de proteína de la fracción enriquecida

en membrana plasmática al medio de ensayo que contenía en un volumen total de 1 ml:

Reactivo	Concentración final
Tris/HCl (pH 7.0)	50 mM
NADH	150 μ M
KCN	1 mM

La reacción se siguió midiendo el decremento de la absorbencia a 340 nm cada 10 s durante 1.5 min en un espectrofotómetro SHIMADZU UV160U. De la pendiente de la curva obtenida se calculó la actividad específica expresada como nmoles de NADH oxidado por minuto por mg de proteína. El coeficiente de extinción del NADH a 340 nm es $6.21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

En los casos indicados, la medición se llevó a cabo en presencia de un amortiguador redox de glutatión oxidado/ glutatión reducido o en presencia de un agente reductor, el ditioneol.

FOSFORILACIÓN *IN VITRO*

Los ensayos de fosforilación *in vitro* (González de la Vara *et al.* 1992) se realizaron con 40 μ g de las diferentes fracciones membranales en un amortiguador que contenía 25 mM MES/Tris pH 7.0, 1 mM DTT, 0.25 mM EGTA y 1 mM MgCl_2 en un volumen final de 50 μ l. La reacción se inició por la adición de 12.0 kBq de γ - ^{32}P ATP (111 TBq/mmol). Las muestras se incubaron durante 20 min a 25 °C. La reacción se detuvo por la adición de 50 μ l de amortiguador de muestra para electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida. Las muestras se calentaron a 92°C durante 3 minutos. Se cargaron en el gel alícuotas de 20 a 25 μ g de proteína. Los geles fueron fijados, secados y expuestos a autorradiografía a -70°C.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

Para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se siguió la técnica descrita por Laemmli (1970). Se prepararon geles de 0.75 mm de grosor con gel separador de acrilamida al 10%, bis-acrilamida 0.27%, SDS 0.1% y Tris-HCl 3 M (pH 8.6). La polimerización fue catalizada por la adición de persulfato de amonio 0.2% y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino (TEMED) 0.2%. El gel concentrador estuvo compuesto de acrilamida al 4%, bis-acrilamida 0.1%, SDS 0.14% y Tris-HCl 0.1M (pH 6.6), adicionados con los agentes polimerizantes persulfato de amonio 0.04% y TEMED 0.24%. La disolución de corrida fue glicina 0.192 M, Trizma base 0.025 M y SDS 0.1%.

Los geles para la resolución de péptidos de bajo peso molecular fueron de Tris-Tricina al 16.5% de acrilamida (BIO-RAD Ready Gels) y la disolución de corrida consistió de Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1%.

Las muestras se tomaron de alícuotas de las reacciones de fosforilación *in vitro* que ya contenían el amortiguador de muestra (SDS 10%, β -mercaptoetanol 5%, Azul de bromofenol 0.01% y Tris-HCl 0.5 M pH 6.6. Estas se aplicaron directamente en los pozos del gel concentrador.

El corrimiento electroforético de los geles se llevó a cabo de 90 a 120 mV por 2 a 3 hs. Al concluir este tiempo se removió el gel del soporte y fue lavado varias veces en una solución de ácido acético 10%, metanol 40% y ATP 1 mM hasta que la la señal en el Geiger fuera de 1000 CPM. Se tiñó con una solución de ácido acético 10% y azul brillante de Coomasie R-250, y se lavó en acético-metanol en la misma concentración hasta obtener la intensidad de coloración deseada. El gel fue secado entre dos hojas de papel celofán.

DETERMINACIÓN DE INCORPORACIÓN DE ^{32}P EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Para la determinación del ^{32}P incorporado en proteínas de membrana se realizó la reacción de fosforilación *in vitro* como se describió anteriormente. La incubación en este caso fue de 5 min a 30°C. Al término de este tiempo, se tomaron alícuotas de 10 μl de la mezcla de reacción (8 μg de proteína) y se colocaron sobre círculos de papel de fosfonitrocelulosa (Baizabal-Aguirre and González de la Vara 1997). Los filtros se dejaron secar y se introdujeron cada uno en un vial seco. Ahí fueron lavados tres veces por 5 min con agitación constante con 5 ml de H_3PO_4 al 1% v/v. Después se lavaron dos veces con 5 ml de agua con agitación constante por 5 min cada vez. Se retiró el agua del último lavado y se añadieron 5 ml de líquido de centelleo. Se contó la radiactividad incorporada a la muestra en un Liquid Scintillation Counter Beckman LS6000 IC. El ^{32}P incorporado en proteína se reportó como cuentas por minuto por μg de proteína.

RESULTADOS

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS DE ALEURONA

Cuando se emplearon las condiciones reportadas por Maya (1997) para preparar membranas utilizando aleuronas aisladas de semillas de cebada de una cosecha de 1996, se encontró que la recuperación de membrana plasmática, evaluada como proteína en la fase superior del reparto, era mucho menor que la reportada por Maya (1997), aunque la actividad de la enzima marcadora (glucán sintatasa II, GSII) mejoraba notablemente (Tabla 2). Una de las razones del resultado anterior podría ser que el lote utilizado en esta tesis fue cosecha 1996, y el empleado por Maya (1997) fue cosecha 1994.

Tabla 2. Efecto del año de cosecha de la semilla en el aislamiento y purificación de membrana plasmática de aleurona

Año de cosecha de la semilla	Proteína (mg)	GSII ¹ (FS)
1994	0.85	0.16
1996	0.08	11.60

¹ nmoles UDPG[³H] min⁻¹(mg de proteína)⁻¹

Diferentes autores han reportado que las condiciones de separación y purificación de membranas por medio de un reparto de fases, depende entre otras cosas del tejido que se utilice (Larsson *et al.* 1987). Por otro lado, la composición de las semillas y por tanto de la aleurona, varía sutilmente de cosecha a cosecha, ya que esta característica presenta una interacción genotipo-ambiente. Por lo anterior, el método de separación y purificación de membranas de aleurona reportado por Maya (1997) tuvo que ser modificado.

Los puntos críticos que influyen en la eficiencia del reparto de fases, de acuerdo a lo reportado por otros autores (Larsson *et al.* 1987) son: la homogeneización, la concentración de los polímeros y las veces que cada una de las fases son re-extraídas con polímero fresco. A continuación se discuten los resultados de los experimentos realizados con el fin de evaluar cada uno de estos puntos.

En el procedimiento de Maya (1997), la homogeneización del tejido se realizaba en dos etapas. En la primera, el tejido se congelaba en nitrógeno líquido y se pulverizaba hasta polvo fino en un mortero de porcelana. En la segunda, este polvo se resuspendía en amortiguador de homogeneización y se homogeneizaba con politrón a alta velocidad. Mediante centrifugación se eliminaban los núcleos y el sobrenadante (H-N) se cargaba en el sistema de reparto. Este proceso de homogeneización es muy drástico y es probable que la baja actividad de la enzima marcadora fuera resultado de alguna de las siguientes

posibilidades actuando por separado o en conjunto: 1) que se estuvieran obteniendo vesículas demasiado pequeñas para su recuperación por sedimentación, 2) que existieran vesículas ricas en proteína que cosedimentaran con las de membrana plasmática, como los cuerpos proteicos que se encuentran de manera abundante en la aleurona; o bien 3) que la preparación tuviera actividad de proteasas.

LA HOMOGENEIZACIÓN SUAVE DE LAS ALEURONAS CON MORTERO EN PRESENCIA DE AMORTIGUADOR RESULTA EN UNA MEJOR RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD DE GSII

Para eliminar la posibilidad de que el método de homogeneización utilizado por Maya (1997) fuera inadecuado para la nueva semilla, se probaron los otros métodos de homogeneización que se detallan en la tabla 3. La eficiencia del método de homogeneización se evaluó por la cantidad de proteína en el homogenado. Los resultados de la tabla 2 muestran que el mejor método de homogeneización es el de moler en mortero con amortiguador a 4°C, ya que se obtuvo la mayor cantidad de proteína y de GSII. Esto indica que el método de homogeneización de las aleuronas empleado por Maya (1997) no era adecuado para el lote de semillas 1996.

Tabla 3. Proteína recuperada de la homogeneización de 200 aleuronas por diferentes métodos.

MÉTODO DE HOMOGENEIZACIÓN	Proteína (mg)	GSII ¹
A) Congelamiento c/ N _{2(l)} / molido en mortero	14.9	0.08
B) Corte con navaja / congelamiento c/N _{2(l)} / molido en mortero	15.0	N.D. ²
C) Infiltración / Corte c/navaja / molido en mortero c/ amortiguador	42.0	1.50
D) Molido en mortero c/ amortiguador	46.9	1.96

¹ nmoles UDPG[³H] min⁻¹(mg de proteína)⁻¹

² N.D. no detectable

LA ELIMINACIÓN DE LOS CUERPOS PROTEICOS DEL HOMOGENADO CRUDO DISMINUYE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA CONTAMINANTE SIN ACTIVIDAD DE GSII

Como ya se mencionó, otra posible razón para la baja recuperación de la actividad específica de la enzima marcadora de la membrana plasmática con respecto al mejoramiento en la recuperación de proteína después del reparto, era la presencia en esta fracción de proteína contenida en vesículas como son los cuerpos proteicos, por lo que el homogenado crudo (HC) se sometió a una centrifugación diferencial y en cada una de las fracciones se determinó la actividad de GSII (tabla 4). Después de la centrifugación diferencial se observó que el 25% de la proteína total se eliminó en la pastilla de 10,000xg, que es la velocidad a la cual sedimentan los cuerpos proteicos (Shimoni *et al.* 1995). La cantidad de actividad enzimática asociada a esta fracción es menos del 0.5% de la actividad presente en el homogenado inicial. Lo que resulta curioso es que la actividad específica de esta enzima en el sobrenadante de 10,000 x g (tabla 4) no se haya incrementado, lo que sugiere la presencia de proteasas en el homogenado, aún cuando el amortiguador de homogeneización contenía inhibidores de este tipo de actividad. (TPCK, TLCK y quimostatina). Por lo que se cambiaron los inhibidores de proteasas por un cocktail comercial (ver Materiales y Métodos). El uso de este cocktail comercial no incrementó la actividad específica de GSII en el sobrenadante de 10,000 x g, pero mantuvo estable su actividad aún después de 5 días del aislamiento. En la tabla 4, también puede observarse que una proporción importante de actividad de GSII queda en el sobrenadante de 112,000 x g. Esto sugiere que aún con el método de homogeneización en mortero, se producen vesículas de membrana plasmática de un tamaño tan pequeño que no alcanzan a sedimentar. Dado que la actividad de la enzima se incrementaba 3.5 veces en los microsomas respecto al homogenado crudo y el tamaño del sistema de reparto de polímeros que se requiere es menor, se decidió

continuar la purificación de las membranas con esta fracción.

Tabla 4. Distribución de la actividad marcadora de membrana plasmática en las fracciones de la centrifugación diferencial

FRACCIÓN	PROTEÍNA (mg)	GSII	
		Actividad total ¹ (%)	Actividad específica ²
HOMOGENADO CRUDO	40.8	61.2 (100)	1.50
H-T (sobrenadante 10000 x g)	30.8	41.3 (67.5)	1.34
P-T (pastilla 10000 x g)	10.2	0.2 (0.3)	0.02
SOBRENADANTE 112000 x g	13.6	22.4 (36.6)	1.65
MICROSOMAS (pastilla 112000 x g)	3.8	20.8 (34.0)	5.49
MICROSOMAS ³			5.28

¹ nmoles UDPG[³H] incorporado min⁻¹

² nmoles UDPG[³H] incorporado min⁻¹ (mg⁻¹ proteína)

³ medida a las 120 hs del aislamiento

EL USO DE SISTEMAS DE FASES AL 6.2% PEG/DEXTRAN Y EL REPARTO EN TRES PASOS PERMITEN LA OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN ALTAMENTE ENRIQUECIDA EN MEMBRANA PLASMÁTICA

La concentración de polímeros (PEG y dextrán) utilizada por Maya (1997) fue de 6.5% y la fracción cargada fue la de un homogenado sin núcleos, mientras que en este trabajo la fracción a cargar en el sistema era la microsomal. Dado que las características de la fracción cargada eran diferentes se requirió modificar la concentración de polímeros en el reparto de fases.

Las membranas plasmáticas de hoja de espinaca, cebada y avena (Larsson *et al.* 1987; Briskin *et al.* 1987), y de aleurona de avena y trigo (Walker *et al.* 1993; Bush and Wang 1995) han sido purificadas utilizando 6.2% de dextran y PEG; por lo que se decidió probar esta concentración para el aislamiento y la purificación de membranas de aleurona.

En la tabla 5 se observa que hay diferencia en cuanto la cantidad de proteína recuperada en la fase superior, siendo menor en el sistema de 6.2%. No obstante, la actividad de la enzima marcador de membrana plasmática fue más alta en este mismo sistema.

Tabla 5. Efecto de la concentración de polímeros en el sistema de fases sobre la recuperación de proteína y de actividad de GSII en la fase enriquecida en membrana plasmática

	Concentración de los polímeros	
	6.5%	6.2%
FS	6.5%	6.2%
Proteína recuperada (mg)	1.06	0.37
GSII ¹	7.50	17.4

¹nmoles UDPG[³H] incorporado min⁻¹ mg⁻¹ proteína

Por esto se decidió utilizar la concentración de 6.2% de cada uno de los polímeros e incrementar el número de pasos de enriquecimiento de la fase superior (tabla 6).

Tabla 6. Actividad de GSII en la fracción enriquecida en membrana plasmática y endomembranas de sistemas de 6.2% con uno y tres pasos de enriquecimiento

EXP.	FRACCIÓN	Un paso		Tres pasos	
		GSII ¹	FS/HT	GSII ¹	FS/HT
1	HT	1.5	11.6	1.34	24
	M. Plasmática	17.4		32.32	
	Endomembranas			3.11	
2	HT			1.01	28
	M. Plasmática			28.48	
	Endomembranas			2.47	

¹nmoles UDPG[³H] incorporado min⁻¹ mg⁻¹ proteína

Se puede observar que el enriquecimiento de la fase superior en membrana plasmática, cuantificado como el número de veces que se incrementa la actividad de GSII, es mucho mayor (24 a 28 veces), que cuando sólo se utilizó un paso de

enriquecimiento (aproximadamente 10 veces).

La metodología final adoptada para el desarrollo de este trabajo integró todas las modificaciones antes discutidas y es la descrita en Materiales y Métodos.

LA ACTIVIDAD DE DIFERENTES TIPOS DE ATPASAS EMPLEADAS COMO MARCADORAS DE MEMBRANA INDICAN UNA BAJA CONTAMINACIÓN DE LAS FRACCIONES DEL REPARTO CON MEMBRANA MITOCONDRIAL Y DE TONOPLASTO

Una vez que el método de aislamiento y purificación de membranas para la cosecha 1996 fue optimizado, se procedió a caracterizar la pureza de las fracciones membranales. Para esto se utilizaron enzimas marcadoras (tabla 7), como las ATPasas específicas de cada tipo de membrana celular. Estas se cuantificaron midiendo la actividad de hidrólisis de ATP (medido como liberación de Pi) cuando se añadía un inhibidor específico para cada una de las ATPasas (tabla 7). La actividad de cada tipo de ATPasa se calculó por la diferencia entre la actividad total (medida en presencia de EGTA, para inhibir la ATPasa de Ca^{2+} presentes en membrana plasmática y retículo endoplásmico (Evans and Williams 1998) y en ausencia del inhibidor específico) y la medida en presencia del mismo. La diferencia expresada como porcentaje de la actividad total representa el porcentaje de ese tipo de membrana en la fracción.

Tabla 7. Enzimas marcadoras utilizadas para la detección de los diferentes tipos de membranas presentes en las fracciones del reparto de fases.

TIPO DE MEMBRANA	ENZIMA MARCADORA
MEMBRANA PLASMÁTICA	Glucán sintetasa II H ⁺ -ATPasa (sensible a vanadato)
MITOCONDRIA	H ⁺ -ATPasa (sensible a azida) Citocromo c oxidasa*
TONOPLASTO	ATPasa (sensible a nitrato)

En la tabla 8 se muestran los resultados de un experimento representativo. La actividad de ATPasa inhibida por azida de sodio es alrededor del 5%, lo que indica que la contaminación por membrana mitocondrial en ambas fases es aproximadamente 5% o menos. En aleurona las fosfatasa ácidas, susceptibles de inhibición por molibdato, son enzimas asociadas principalmente a los cuerpos proteicos (Gabard and Jones 1986), a la pared celular (Hooley 1984; Gabard and Jones 1986) y al tonoplasto. La actividad relativamente baja de estas enzimas, menos del 15% en la fracción de membrana plasmática, podría deberse a que los cuerpos proteicos se eliminaron por centrifugación diferencial. La mayor abundancia de esta actividad en las endomembranas sugiere que los cuerpos proteicos contaminantes se reparten preferentemente hacia la fase inferior del reparto. Lo que resulta sorprendente en la tabla 8, es el hecho de que en ambas fases se encuentre una actividad similar de ATPasas de tonoplasto y de membrana plasmática. Esto supondría que las fases no están enriqueciéndose de manera diferencial en un solo tipo de membrana. Sin embargo, existen reportes que indican que algunos iones utilizados como inhibidores de un tipo de ATPasa particular pueden tener efectos inhibitorios o estimulantes sobre otro tipo de actividad de hidrólisis de ATP o liberación de Pi (Vicente and Vale 1994). En este caso podría ser que en la fase inferior del reparto, el vanadato estuviera inhibiendo otra actividad de hidrólisis de ATP que resultara en la sobreestimación de la actividad de la ATPasa susceptible a inhibición por VO_4^{3-} en esta fracción, sin que necesariamente se tratara de membrana plasmática, tal es el caso de la ATPasa presente en retículo endoplásmico (Bus and Wang 1995). En contraste, cuando se utiliza GSII como enzima marcadora de membrana plasmática, su actividad es al menos 10 veces mayor en la fase superior del reparto con respecto a la inferior o de endomembranas. Por lo anterior, concluimos que la fracción superior estaba contaminada en un 4% con membrana de mitocondria y en 13% con membranas de cuerpos proteicos.

Mientras que la contaminación en las vesículas presentes en la fase inferior era de 5% de membrana mitocondrial y de alrededor del 20% de membrana de cuerpo proteico; y que la fase superior estaba 10 veces enriquecida en membrana plasmática con respecto a la inferior como se muestra en la tabla 6.

Tabla 8. Determinación del tipo de membranas y su abundancia en las diferentes fracciones del reparto

Tipo de ATPasa	Inhibidor	% Actividad	
		FS	FI
Tonoplasto	Tris/NO ₃	17.0	14.5
Plasmática	Na ₃ VO ₄	63.9	77.0
Mitocondrial	NaN ₃	4.1	5.4
Fosfatasa ácida	Na ₃ MoO ₄	13.6	22.1
Sumatoria		98.6	119.0

ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA

Uno de los posibles cambios membranales en un sistema estimulado por un mensajero químico es la modificación de la actividad de enzimas de estas membranas. La NADH oxidasa es una enzima integral de membrana cuya actividad es modulada por factores de crecimiento y fitorreguladores en algunos sistemas animales y vegetales, respectivamente (Morré 1994).

En este trabajo se midió la actividad de esta enzima como parte de los posibles cambios de naturaleza redox en la membrana; así como también por su asociación con fenómenos de formación de vesículas de secreción (Morré 1994) y excreción de protones e iones (Kochion 1985), procesos de gran importancia en la capa de aleurona (Gilroy and Jones 1992; Jones 1973). La actividad de la NADH oxidasa se midió como se describe en Materiales y Métodos.

LA ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA PRESENTE EN DIVERSAS FRACCIONES MEMBRANALES NO SE MODIFICA POR EL EFECTO DE LA INCUBACIÓN DE LAS ALEURONAS EN MEDIO LÍQUIDO

En la tabla 9 se muestra la actividad de la NADH oxidasa en membrana plasmática obtenida de aleuronas recién aisladas y aleuronas incubadas durante tres horas en medio líquido (amortiguador Succínico/CaCl₂, pH 5.0). La incubación de las aleuronas se realizó en un baño de agua a 25°C con agitación constante en presencia de oxígeno. En estos experimentos se evaluó la capacidad del oxígeno ambiental de modificar la actividad de la NADH oxidasa, fungiendo como aceptor electrónico; o bien afectando el ambiente redox aledaño a ella. Podemos observar que la actividad de la NADH oxidasa no se modificó por efecto de la incubación. Por lo que podemos concluir que durante este procedimiento, esta actividad enzimática no se modificó.

Tabla 9. Actividad de la NADH oxidasa en membrana plasmática obtenida de aleuronas incubadas o no en medio líquido

Incubación	NADH OXIDASA ²	
	- ML ¹	+ ML
Membrana Plasmática	70.9 ± 10.4 ^{a3}	85.9 ± 20.3 ^a

¹ ML: medio líquido (amortiguador succínico/CaCl₂, pH 5.0)

² nmol NADH oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína

³ Números seguidos por diferente letra son significativamente diferentes (p≥0.05)

EN ALEURONA, EL AG₃ DISMINUYE LA ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Dado que el ácido giberélico es el fitorregulador natural que estimula a la capa de aleurona, se probó si éste tenía algún efecto sobre la actividad de la NADH oxidasa. En la tabla 10 se puede observar que la incubación de las aleuronas en presencia de AG₃ se refleja en una disminución significativa en la actividad de la enzima.

Tabla 10. Efecto del ácido giberélico en la actividad de la NADH oxidasa presente en vesículas de membrana plasmática

	NADH OXIDASA ¹	
	-AG ₃	+AG ₃ ²
M. Plasmática	90.2 ± 10.2 ^{a3}	64.4 ± 9.5 ^b

¹ nmol NADH oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína

² AG₃ 1 μM

³ Números seguidos de letras distintas son significativamente diferentes (p=0.032)

LA DISMINUCIÓN EN ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA INDUCIDA POR AG₃ EN LAS VESÍCULAS DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS, SE DEBE A UNA DISMINUCIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILLO LIBRES, YA SEA EN LA ENZIMA O EN SU AMBIENTE

Existe evidencia de que la actividad de la NADH oxidasa es modulada por cambios redox en la proteína. Se sabe que en algunos sistemas, la forma más oxidada de la proteína es la más activa. Incluso se propone que la participación de esta enzima en los procesos de formación de vesículas está relacionada con el intercambio de grupos sulfhidrilo y disulfuro intrínsecos de la proteína (Morré 1994).

Para determinar si la actividad que estábamos midiendo era susceptible de modulación por el estado redox, medimos la actividad de la oxidasa en medios con compuestos de diferentes potenciales de óxido-reducción. Estos se fijaron por la adición de amortiguadores redox formados de diferentes proporciones de glutatión reducido y oxidado, conforme a concentraciones reportadas en la literatura. Esto permitió la generación de un ambiente reductor ($[GSH]^2/[GSSG] \geq 1$ mM) y oxidante ($[GSH]^2/[GSSG] = 0.05$ mM). Asimismo, se evaluó el efecto de otro agente reductor, el DTT, en la actividad de la enzima.

En la tabla 11 podemos observar que en la membrana plasmática, el tratamiento con DTT promueve una disminución significativa en la actividad de la oxidasa de aleuronas incubadas en ausencia y presencia del fitoregulator. Esto sugiere que el

tratamiento con este compuesto reductor evita el funcionamiento normal de la enzima, aunque su actividad no desaparece completamente.

Tabla 11. Efecto de ambiente oxidante y DTT en la actividad de la NADH oxidasa membranal

Tipo de membrana	M. Plasmática	
	NADH OXIDASA ¹	
Ambiente	-AG ₃	+AG ₃
Basal	90.2 ± 10.2 ^a	64.4 ± 9.5 ^a
Reductor	78.3 ± 6.3 ^a	87.0 ± 8.8 ^b
Oxidante	75.4 ± 8.7 ^a	67.6 ± 16.7 ^a
DTT	53.7 ± 0.9 ^b	47.5 ± 7.7 ^c

¹ nmol NADH oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína

² Números en una columna seguidos de letras distintas son significativamente diferentes (p≤0.05)

En la membrana plasmática, los tratamientos redox no tienen influencia en la actividad en aleuronas incubadas en ausencia del fitorregulador (excepto en el caso del DTT). Sin embargo en aleuronas tratadas con AG₃, se observó un incremento significativo de la actividad cuando se estableció un ambiente altamente reductor. Esto sugiere que a diferencia con la NADH oxidasa reportada en hipocotilo de soya, cuyo estado más activo es el más oxidado, la oxidasa en aleurona tiene mayor actividad cuando se encuentra altamente reducida.

FOSFORILACIÓN IN VITRO

Los procesos de fosforilación-defosforilación han sido descritos como de gran importancia en distintos mecanismos de regulación metabólica y transducción de señales (Sussman 1994). Dentro de este último, se han descrito diversas cinasas cuyas actividades participan en la transmisión de señales al interior de las células. Asimismo, muchas enzimas -participantes en la cascada de transducción o bien involucradas en la respuesta

celular- son susceptibles de ser activadas o desactivadas por medio de este proceso. Durante los últimos años se ha prestado mucha atención a la fosforilación de proteínas unidas a membranas internas y externas de plantas. La fosforilación de estas proteínas puede ser crucial en la regulación de la estructura y función de los componentes membranales, y consecuentemente a la función de la membrana misma. Este tipo de modificación postraduccionaI podría jugar un papel importante en la percepción y/o transducción de diferentes estímulos. Resulta claro entonces que uno de los cambios que pueden sufrir los componentes de las membranas son la fosforilación y defosforilación. Esto apunta directamente a la presencia de cinasas y fosfatasas membranales; o bien, a su reclutamiento ante diferentes estímulos (Ranjeva and Boudet, 1987). En un sistema de la naturaleza de la aleurona, que responde a un mensajero químico para realizar su función, es factible pensar que estos procesos de fosforilación-defosforilación formaran parte importante de la percepción general de señal.

EXISTEN PROTEÍNAS EN LAS MEMBRANAS DE LA ALEURONA, QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE FOSFORILAR Y DE SER FOSFORILADAS *IN VITRO*

Como primera aproximación para dilucidar si las membranas de la aleurona sufren cambios en cuanto a su estado de fosforilación, fue necesario demostrar la existencia de una actividad de fosforilación en las fracciones membranales. Por esta razón, evaluamos la capacidad de las proteínas de diferentes fracciones membranales de fosforilar y ser fosforiladas. Para ello realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* con las diferentes fracciones membranales obtenidas en este trabajo (membrana plasmática y endomembranas). También se determinó cuantitativamente la incorporación de $^{32}\text{P}_i$ en

proteínas de membrana, según la metodología reportada en Materiales y Métodos. Por otra parte, se analizó el patrón de proteínas fosforiladas en membrana por electroforesis en geles de acrilamida seguidos por autorradiografía.

Se encontró que, en efecto, tanto la membrana plasmática como las endomembranas tienen la capacidad de fosforilar proteínas o péptidos inmersos en la misma membrana (Figura 2B y C). Esto sugiere la presencia de cinasas en estas fracciones. Al parecer esta actividad es un tanto más pronunciada en la membrana plasmática (Figura 2A).

En la figura 2B se muestra el patrón electroforético de proteínas fosforiladas (gel de acrilamida al 10%) presentado por la membrana plasmática (P⁻) y las endomembranas (E⁻) control. En ambos tipos de membranas se observaron distintos polipéptidos fosforilados y acumulación de polipéptidos de bajo peso molecular que no se resolvieron.

Para separarlos adecuadamente se utilizaron geles de Tris/Tricina al 16.5% cuya resolución es mejor para bajos pesos moleculares (Fig. 2C). En estos geles se presentó acumulación de proteína en la parte superior (proteína de alto peso molecular que no entra en esta concentración de poliacrilamida).

Se observaron algunos péptidos de bajo peso molecular, bandas que son más intensas para membrana plasmática (P⁻) que en endomembranas (E⁻). Cuantificando el ³²Pi incorporado a proteínas de membrana (Figura 2A), se observó que la actividad de fosforilación fue aproximadamente un 40% mayor en membrana plasmática que en endomembranas, lo que coincide con la intensidad de los patrones de fosforilación en gel. El hecho de que la incubación de las membranas en presencia de ATP, resulte en la fosforilación de las proteínas membranales sugiere la presencia de una actividad de cinasa, así como de proteínas susceptibles de ser fosforiladas.

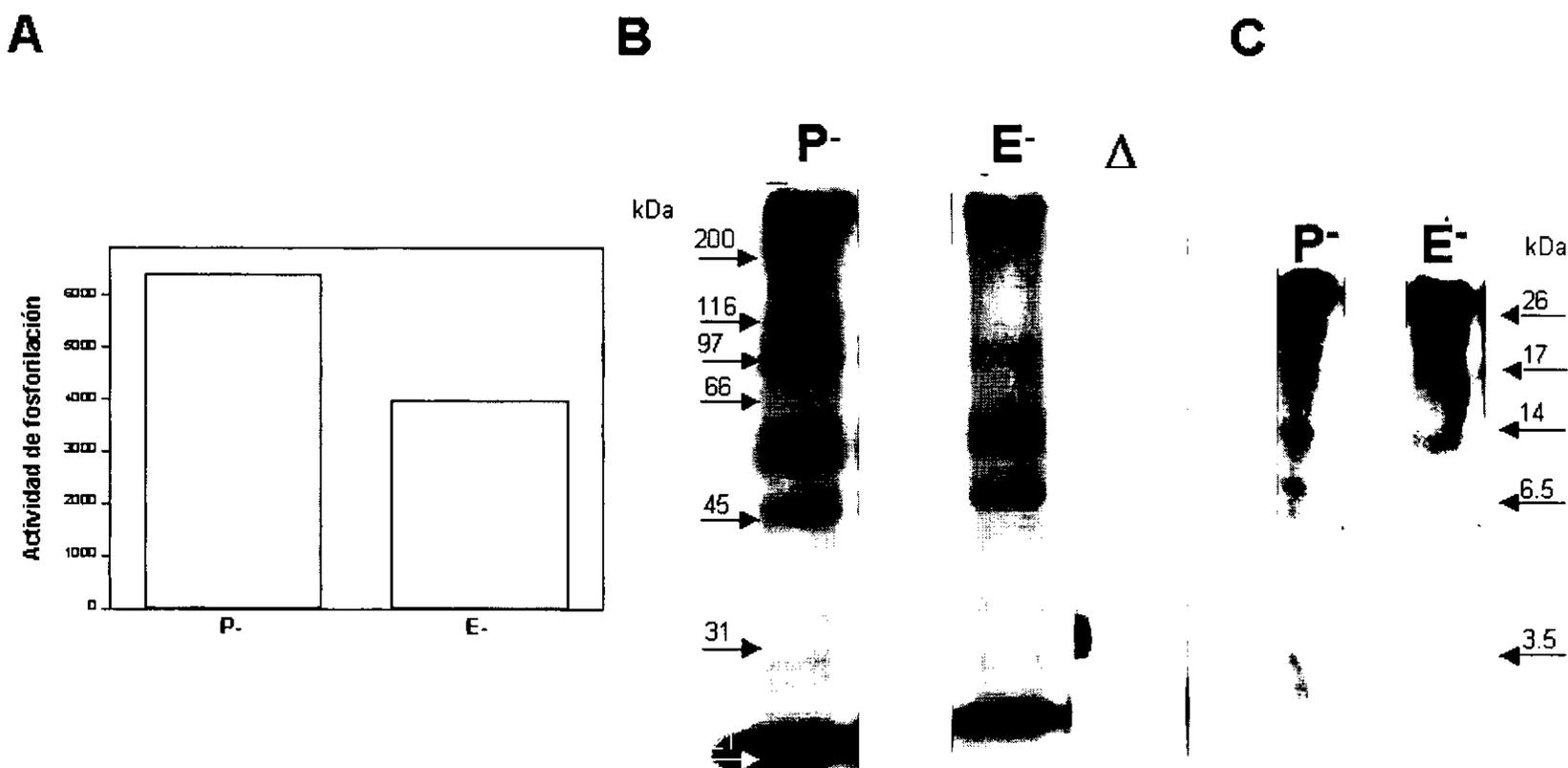


Figura 2. Actividad de fosforilación en membrana plasmática y endomembranas de aleuronas incubadas en ausencia de fito reguladores. A, Incorporación de ^{32}P a proteínas, CPM mg⁻¹ proteína; B, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel al 10%, tiempo de exposición 6 hs, 20 mg de proteína. D, membranas tratadas con calor para inactivación de actividad enzimática; C, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel 16.5%, tiempo de exposición 2.5 hs, 25 mg de proteína. P: membrana plasmática, E: endomembranas, (-) membranas control. NOTA: En el Anexo I se muestra la imagen del gel al 10% teñido con azul de Coomassie, como control de carga de proteína

Para comprobar que las bandas detectadas en los geles no fueran generadas inespecíficamente, se realizó un ensayo en el que la membrana fue sometida a ebullición durante 10 min para inactivar posibles actividades enzimáticas. Después se realizó la reacción de fosforilación y se corrió en un gel al 10% (Figura 2B, Δ). Se observó que las bandas fosforiladas desaparecieron por completo. Lo anterior sugiere que las señales encontradas en los geles se deben a una actividad de fosforilación específica.

EN ALEURONA EXISTE UNA ACTIVIDAD SIMILAR A LA DE PKC

La bisindolilmaleimida (BIM) es un inhibidor de la actividad de la cinasa C de proteína (PKC). Su efecto se lleva a cabo por la ocupación del sitio de unión a ATP en la enzima. Este compuesto inhibe la actividad de todas las isoformas de PKC.

En la figura 3 se muestra la incorporación de Pi^{32} en proteínas de membrana plasmática y endomembranas de aleuronas incubadas en ausencia de fitoreguladores.

En la membrana plasmática control (P^-) se observó una ligera disminución en la fosforilación de proteínas cuando el ensayo se realizó en presencia de BIM, aunque probablemente esta no sea muy significativa. En endomembranas (E^-) se detectó un decremento de aproximadamente un 30% en la incorporación de ^{32}P en las proteínas de membrana sometidas al mismo tratamiento. Estos resultados son consistentes con la presencia de una actividad similar a la de PKC, tanto en membrana plasmática como en endomembranas.

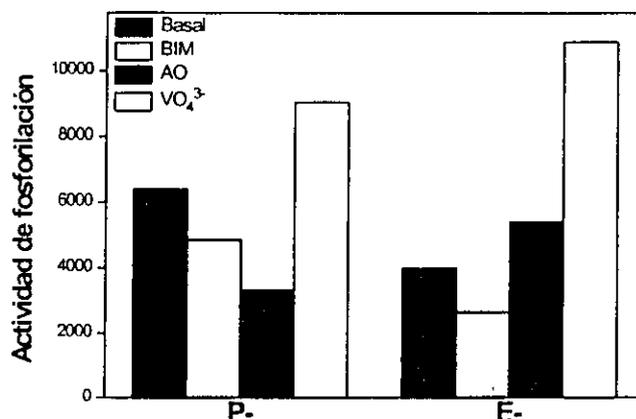


Figura 3. Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad de fosforilación de membrana plasmática (P-) y endomembranas (E-) aisladas de aleuronas incubadas en ausencia de fitoreguladores.

LAS MEMBRANAS DE LA ALEURONA CONTIENEN FOSFATASAS DE SERINA/TREONINA Y TIROSINA

Dado que la actividad de cinasas está estrechamente relacionada con la actividad de las fosfatasa -que regeneran los sitios libres para la fosforilación, o bien que modifican la actividad de la proteína sustrato o de la cinasa misma- se evaluó la presencia de estas enzimas en las membranas.

Para ello se utilizaron inhibidores como el ácido okadaico (AO) (Hunter 1995; Smith and Walker 1996). Este compuesto inhibe preferencialmente fosfatasa de serina y treonina. La adición de AO a la reacción de fosforilación de membrana control resultó en un decremento casi del 50% en la incorporación de ³²Pi en proteínas membranales (Figura 3, P⁻). Esto apunta hacia la posible presencia de este tipo de fosfatasa en la membrana.

Los resultados encontrados para el efecto del AO en endomembranas apuntan

también hacia la existencia de fosfatasas de ser/thr; ya que la actividad de fosforilación presentó un incremento del 35% con respecto a la detectada en ausencia del inhibidor.

También se exploró la posible presencia de fosfatasas de tirosina a través de su inhibición con Na_3VO_4 (Hunter, 1995). En membrana plasmática control, la incubación en presencia de vanadato resultó en un incremento del 40% en la incorporación de ^{32}P en proteínas (Figura 3). En endomembranas, el inhibidor produjo el mismo comportamiento en la fosforilación, sólo que el incremento fue mucho más pronunciado (aproximadamente 170%) (Figura 3). Los resultados en ambos casos sugieren la presencia de una actividad basal de fosforilación en tirosinas en membranas control que se ve pronunciada al no existir la correspondiente actividad de fosfatasa.

EL ÁCIDO GIBERÉLICO PROMUEVE UNA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFORILACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA, MIENTRAS QUE LA DE ENDOMEMBRANAS SE INCREMENTA

El ácido giberélico es el inductor natural de la capa de aleurona. A través de su estimulación, este tejido inicia el proceso de percepción y transducción de la señal. Para evaluar su efecto sobre la capacidad de fosforilación, se prepararon fracciones membranales de aleuronas incubadas en presencia de AG_3 y se sometieron a los ensayos de fosforilación *in vitro*.

Los patrones de bandas de proteína fosforilada de membranas control y obtenidas de aleuronas incubadas con AG_3 en geles de SDS-PAGE al 10% son similares entre la fracción plasmática y las endomembranas (Figura 4B). En general existen ligeras diferencias en la intensidad de las bandas para los diferentes tratamientos realizados, aunque estas no son muy pronunciadas. Nuevamente, los geles presentaron acumulación de proteína fosforilada en el frente, presumiblemente proteínas de bajo peso molecular

que no se alcanzan a separar. En los geles de Tris/Tricina al 16.5% (figura 4C) se pueden observar cambios en los patrones de fosforilación entre las membranas plasmáticas control (P⁻) y las de aleuronas incubadas en presencia del fitorregulador (P⁺), sobre todo en pesos moleculares entre 15000 y 3500 kDa. Los patrones de proteína de la parte superior de los geles fueron similares; sin embargo, hacia la parte media (16000-6000 kDa) de P⁺ se distinguió una disminución importante en la intensidad de fosforilación de los péptidos más conspicuos del patrón. También se observó la desaparición de los péptidos fosforilados de muy bajo peso molecular (6500-3500 kDa). Cuantitativamente, la disminución en la fosforilación es aproximadamente del 20% (figura 4A, P⁻ y P⁺).

Con respecto a las endomembranas podemos observar que el AG₃ induce un incremento en la fosforilación de proteínas de aproximadamente 60% (Figura 4A, E⁻, E⁺), que resulta más evidente en las proteínas de bajo peso molecular (Figura 4C, E⁻, E⁺). Sin embargo, el patrón de bandas fosforiladas es similar entre el control y el inducido (Figura 4C, E⁻, E⁺).

Cabe notar que en ambos casos no existen péptidos fosforilados de muy bajo peso molecular (6500-3500 kDa) (Figura 4C). Se observó que en las endomembranas la inducción de las aleuronas con AG₃ incrementa la fosforilación aún cuando esto no se refleje de manera clara en el patrón electroforético.

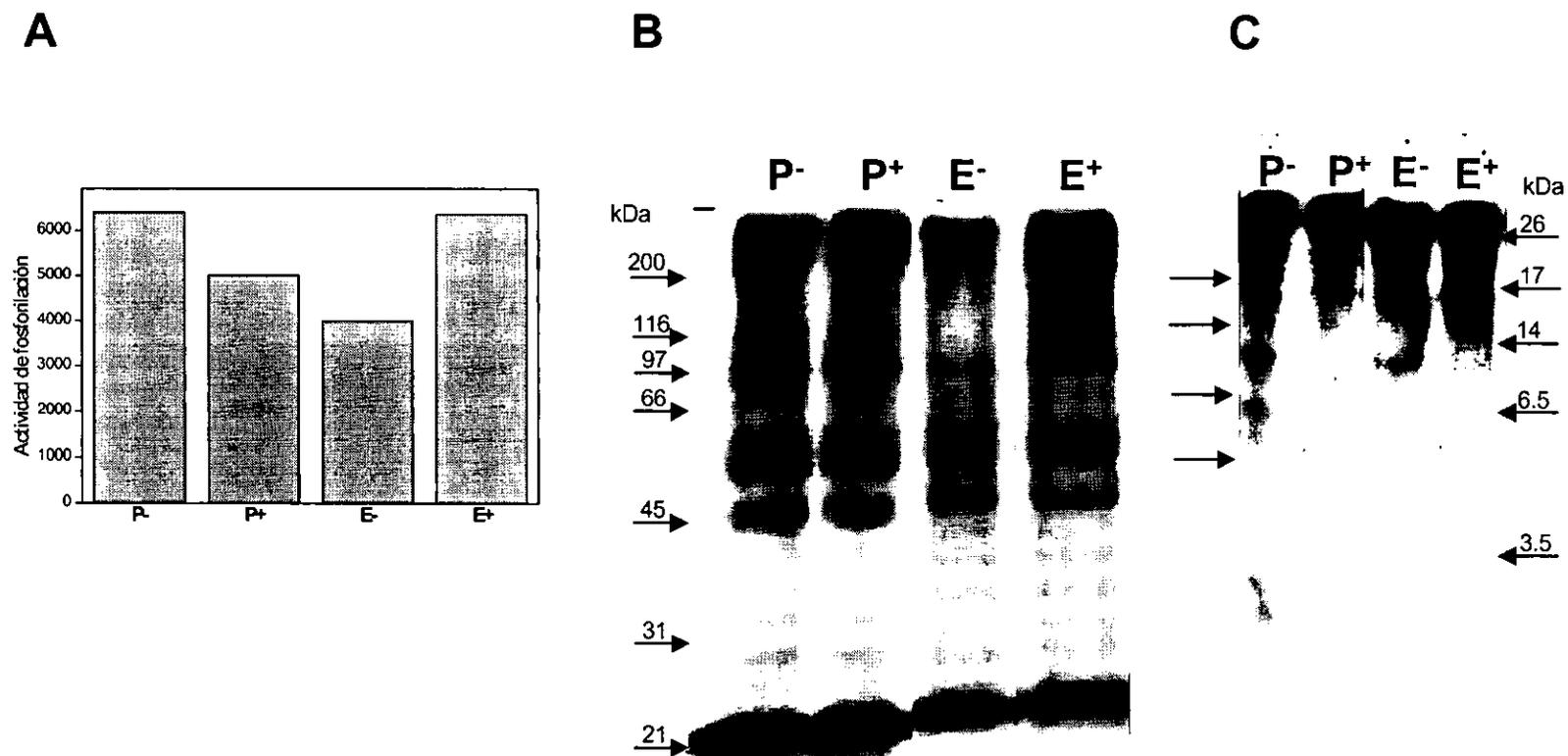


Figura 4. Efecto del AG3 en la actividad de fosforilación y patrón de proteínas fosforiladas de membrana plasmática y endomembranas. A, Incorporación de ^{32}P en proteínas de membrana plasmática y endomembranas, CPM mg⁻¹ proteína; B, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel al 10%, tiempo de exposición 6 hs, 20 mg de proteína. C, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel 16.5%, tiempo de exposición 2.5 hs, 25 mg de proteína. P: membrana plasmática, E: endomembranas; -, membranas control; +, membranas aisladas de aleuronas incubadas con 1m M AG3.

EL ÁCIDO ABCSÍCO INDUCE UN INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DE FOSFORILACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El ácido absísico (ABA) es un fitorregulador con acción antagónica al AG3, por lo que también se probó su efecto en las fracciones membranales. En proteínas de alto peso molecular de membrana plasmática (Figura 5B, P-, PA) se registró una ligera disminución en la intensidad a lo largo de todo el patrón en las membranas de aleuronas incubadas en presencia del ABA.

En cuanto a las proteínas de bajo peso molecular (Figura 5C, P⁻, P[^]), la inducción de las aleuronas con ABA generó un incremento pronunciado en la fosforilación, sobre todo en los péptidos más grandes (26000-6500 kDa). Esta intensidad se atenuó hacia la zona de muy bajo peso molecular (6500-3500 kDa). El incremento general en la fosforilación fue del 30% (Figura 5A, P⁻, P[^]).

EN ENDOMEMBRANAS, EL ÁCIDO ABSÍCO INDUCE UNA LIGERA DISMINUCIÓN EN LA FOSFORILACIÓN DE PÉPTIDOS Y PERMITE LA FOSFORILACIÓN DIFERENCIAL DE ALGUNOS DE ELLOS

El efecto de ABA sobre la fosforilación en las endomembranas tiende hacia una ligera disminución (Figura 5A). En el patrón electroforético de fosforilación de alto peso molecular (Figura 5B) no se observaron diferencias importantes entre las membranas control y las obtenidas de aleuronas tratadas con ABA. No obstante, en el patrón de proteínas fosforiladas de bajo peso molecular (Figura 5C) el efecto del fitorregulador se reflejó principalmente en la fosforilación de dos dobletes muy conspicuos en el patrón. El primer doblete [Figura 5C, a (aprox. 18 kDa) y b (aprox. 16.2 kDa)] se presentó en las membranas de aleuronas inducidas con el fitorregulador con intensidad considerable.

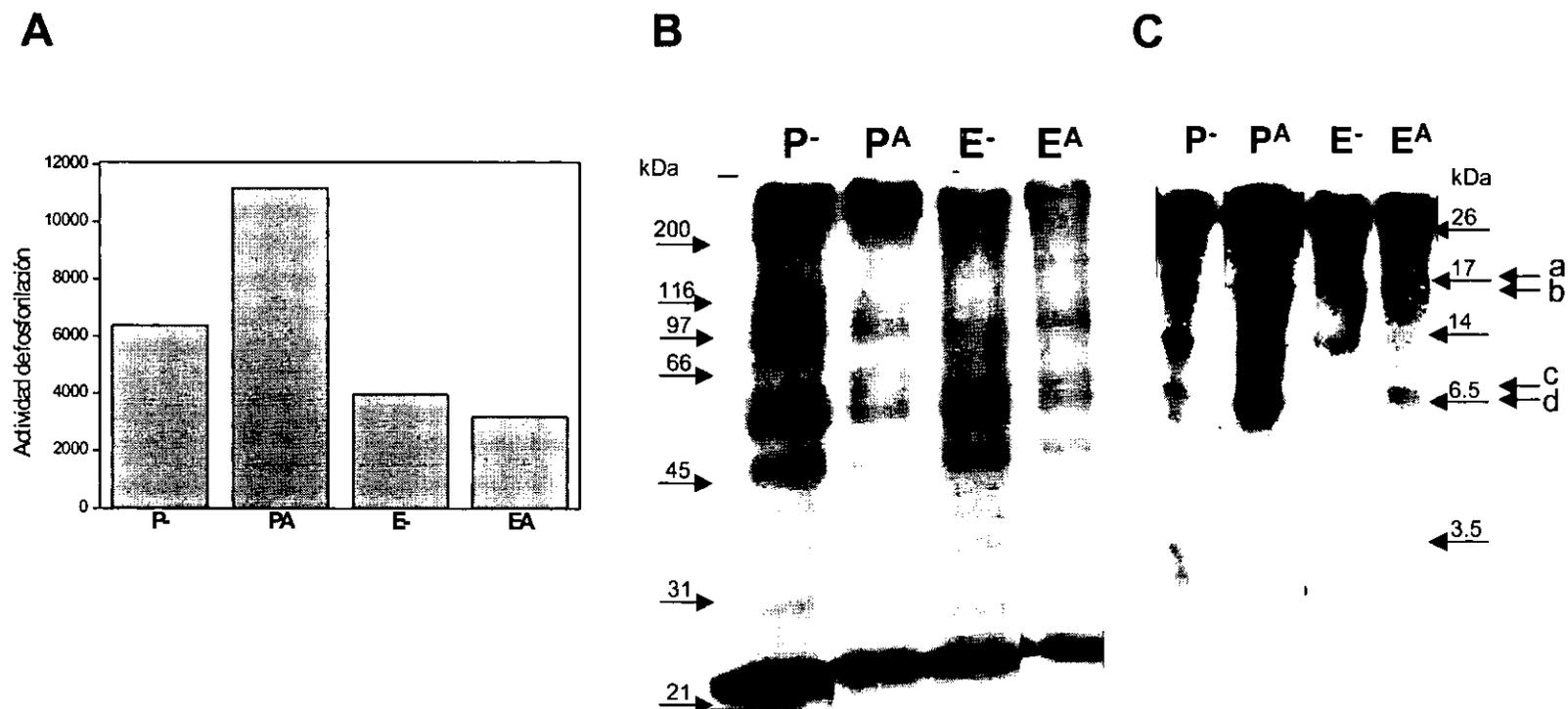


Figura 5. Efecto del ABA en la actividad de fosforilación y patrón de proteínas fosforiladas de membrana plasmática y endomembranas. A, Incorporación de ^{32}P en proteínas de membrana plasmática y endomembranas, CPM mg^{-1} proteína; B, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel al 10%, tiempo de exposición 6 hs, 20 mg de proteína. C, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel 16.5%, tiempo de exposición 2.5 hs, 25 mg de proteína. P: membrana plasmática, E: endomembranas; -, membranas control; A, membranas aisladas de aleuronas incubadas con 20m M ABA.

Mientras que en las endomembranas control tan sólo apareció la banda superior (a). En el segundo doblete [Figura 5C, c (aprox. 7.4 kDa) y d (aprox. 6.1 kDa)], la banda superior (c) se notó más pronunciada en las membranas de aleuronas inducidas. La banda inferior (d) fue casi imperceptible en el control y mostró considerable fosforilación en el inducido. Cabe mencionar que en la zona de menores pesos moleculares (después del segundo doblete, 6500- 3500 kDa) no hubo bandas en ninguno de los dos tratamientos.

EL ÁCIDO GIBERÉLICO REVIERTE EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE FOSFORILACIÓN INDUCIDA POR ABA

Hasta el momento no se ha definido a qué nivel se da el efecto antagónico del ABA sobre el AG₃, a pesar de que ambos se perciben a nivel de membrana plasmática. Por esto es que resulta interesante probar el efecto conjunto de ambos fitorreguladores como una forma probable de definir esto de manera más precisa. Por ello, se probó el efecto de la inducción de las aleuronas con AG₃ y ABA simultáneamente (P**, E**). Los patrones de proteína de las proteínas de alto peso molecular resultaron básicamente iguales; no obstante, presentaron ligeras diferencias en la intensidad de la fosforilación a lo largo de todo el patrón (Figura 6C).

Con respecto a las proteínas de bajo peso molecular, en la membrana plasmática de aleuronas tratadas de esta forma se presentó la más pronunciada desaparición de bandas fosforiladas a partir del primer doblete conspicuo del patrón con respecto al control (Figura 6D, P⁻, P**). Mientras que en las endomembranas se presentó el efecto inverso, ya que en éstas, a diferencia del control donde no existieron bandas fosforiladas de muy bajo peso molecular, aparecen por lo menos tres bandas fosforiladas en esta región (Figura 6D, E⁻, E**). Esto sugiere la inducción de la fosforilación de estos péptidos.

En la figura 6A, podemos observar que el efecto del ácido abscísico sobre la fosforilación (incremento de aproximadamente un 30% en P^A con respecto a P^- , Figura 5B) en membranas plasmáticas fue revertido por la presencia simultánea de ambos fitorreguladores. Esto es, parece predominar el efecto del ácido giberélico ya que los patrones de P^+ y P^{++} son muy similares (comparar Figura 4C y 6D). Cuantitativamente, observamos que la incorporación de $^{32}P_i$ regresa al nivel detectado en el control (Figura 6A, P^- , P^{++}).

Con respecto a las endomembranas, aparentemente predomina el efecto inductor de la fosforilación del AG_3 aún en presencia simultánea con el ABA, ya que se pudo observar el mismo incremento en fosforilación en E^+ y E^{++} (comparar Figura 3A y 6B).

LA CONTRIBUCIÓN DE LOS ELEMENTOS DE FOSFORILACIÓN DESFOSFORILACIÓN A LA ACTIVIDAD DE FOSFORILACIÓN MEMBRANAL ES ESPECÍFICA PARA CADA FITORREGULADOR

Una vez detectados los elementos de fosforilación-desfosforilación en las fracciones membranales, se determinó si su contribución a la fosforilación basal (aquella medida en ausencia de inhibidores) se modificaba por el efecto de la incubación previa de las aleuronas con los fitorreguladores. En la figura 3 se presenta la incorporación de ^{32}P a proteína de membrana plasmática de aleuronas incubadas en ausencia de fitorreguladores (membranas control). Como ya se mencionó, los ensayos realizados en presencia de los diferentes inhibidores (BIM, AO y VO_4^{3-}) apuntan a la presencia de una actividad similar a PKC, fosfatasas de serina-treonina y fosfatasas de tirosina, ya que la actividad de fosforilación en presencia de los inhibidores específicos de cada uno se vio modificada.

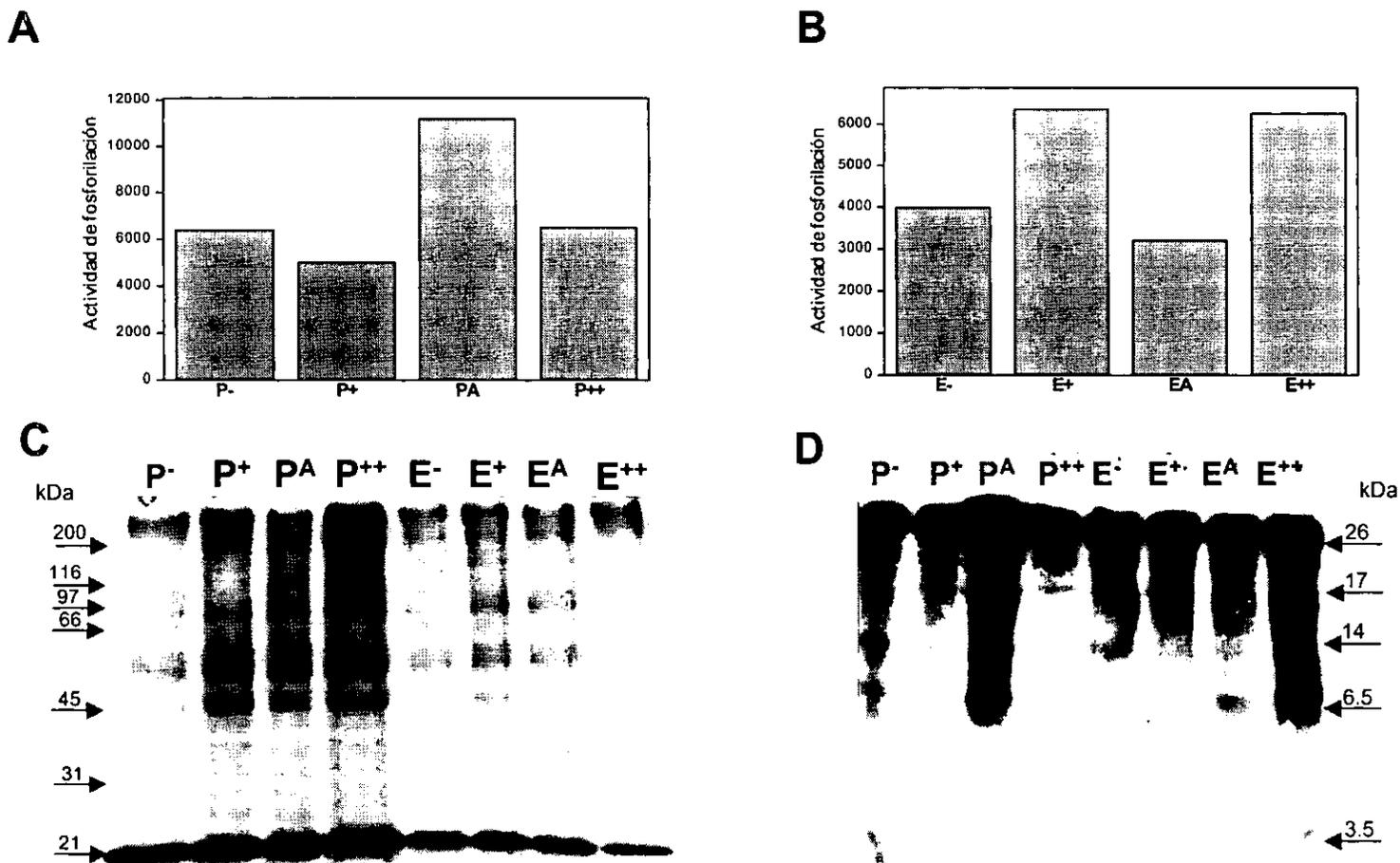


Figura 6. Actividad de fosforilación en membrana plasmática y endomembranas de aleuronas incubadas en presencia de AG3 y/o ABA. A, Incorporación de ³²P en proteínas de membrana plasmática, CPM mg⁻¹ proteína; B, Incorporación de ³²P en proteínas de endomembranas, CPM mg⁻¹ proteína; C, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel al 10%, tiempo de exposición 6 hs, 20 mg de proteína. D, Patrón de proteínas fosforiladas, corrimiento en EGPA-SDS en gel 16.5%, tiempo de exposición 2.5 hs, 25 mg de proteína. P: membrana plasmática, E: endomembranas, -, membranas control; +, membranas aisladas de aleuronas incubadas con 1m M AG3; A, membranas aisladas de aleuronas incubadas con 20m M ABA; ++, membranas aisladas de aleuronas incubadas en presencia de ambos fitoreguladores.

Cuando las aleuronas fueron incubadas en presencia del AG_3 , se observó que, a diferencia de las membranas control, la presencia de BIM produjo un incremento substancial en la incorporación de ^{32}P a la proteína con respecto a la actividad basal de fosforilación, aproximadamente 80% (Figura 7A). El comportamiento de las fosfatasas de serina-treonina también resultó inverso al observado en las membranas control. Esto es, en presencia de AO se presentó un incremento en la actividad de fosforilación de alrededor del 30%. Las fosfatasas de tirosina al ser inhibidas por el vanadato siguieron manifestando un comportamiento similar en la incorporación de ^{32}P a proteínas que en las membranas plasmáticas control, sólo que el incremento fue mucho más pronunciado (100%) (Figura 7A).

Como ya se mencionó, el efecto del ABA sobre la fosforilación en membrana plasmática resultó en un incremento importante con respecto a la del control (Figura 3, basal y 7B, basal). Cuando se realizó el ensayo de fosforilación con estas membranas en presencia de BIM, se observó que el nivel de fosforilación regresó al nivel basal detectado en P^- (disminución del 45% con respecto al basal de P^+ , Figura 7B). La inhibición de la actividad de ambos tipos de fosfatasa se reflejó como una disminución en la incorporación de ^{32}P en las proteínas con respecto a su nivel basal (Figura 7B).

El comportamiento de los elementos de fosforilación-desfosforilación en las membranas plasmáticas de aleuronas incubadas en presencia simultánea de AG_3 y ABA fue prácticamente igual al presentado por el de las membranas aisladas de tejido incubado con AG_3 . Con la excepción de que el incremento en la fosforilación en ausencia de la actividad de fosfatasas de tirosina fue mucho menos pronunciado (aproximadamente 30%) (Figura 7A y 7C).

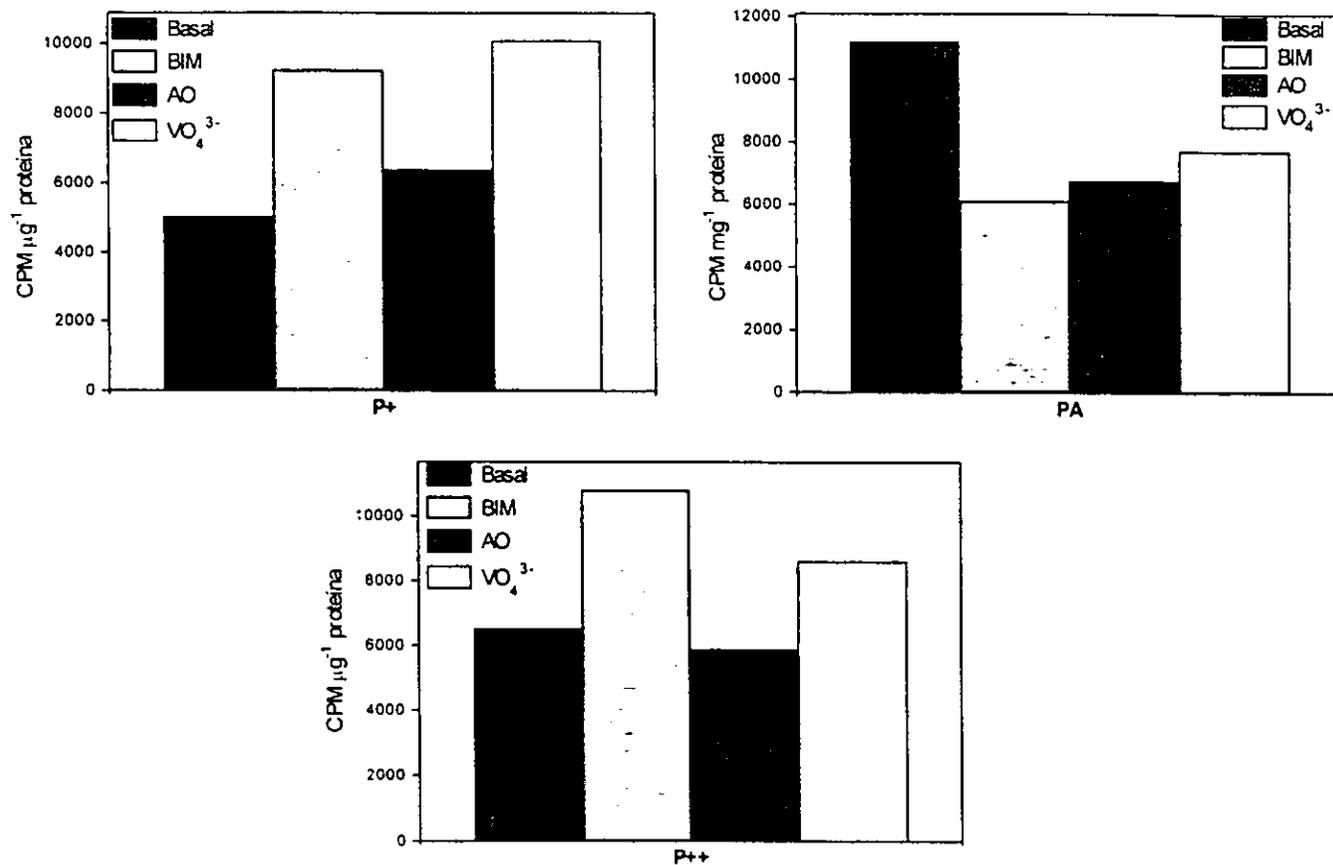


Figura 7. Efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad de fosforilación en membrana plasmática de aleuronas incubadas en presencia de (A) 1 mM AG3, (B) 20 mM ABA y (C) 1 mM AG3/ 20 mM ABA. BIM, bis-indolilmaleimida; AO, ácido okadaico; VO₄³⁻, vanadato.

En la figura 3 se muestran en conjunto los niveles de fosforilación detectados en las endomembranas aisladas de aleuronas no estimuladas (E^-) con el fin de facilitar la comparación. En las endomembranas aisladas de aleuronas incubadas en presencia de AG_3 (E^+) se observó que la presencia de BIM generó una disminución del 30% en la actividad de fosforilación con respecto a su nivel basal (Figura 8A). Este comportamiento es similar al presentado por las endomembranas control (E^- , figura 3), aun cuando los niveles de fosforilación basales fueron importantemente distintos. El AO indujo una disminución de la misma magnitud en la fosforilación que BIM en E^+ . En este caso, se invirtió la tendencia en la modificación de la actividad de fosforilación con respecto a E^- . La inhibición de las fosfatasas de tirosina se reflejó como un incremento en la incorporación de ^{32}P en E^+ , aunque dada la magnitud de la fosforilación en el nivel basal, el aumento representó tan sólo un 20%, el cual es bajo comparado contra el 170% de incremento en E^- con el mismo tratamiento (Figura 3).

El comportamiento de los elementos analizados ante la presencia de los distintos inhibidores en endomembranas de aleuronas tratadas con ABA (E^A , Figura 8B, fue similar al observado en E^- (Figura 3). La disminución de la fosforilación inducida por BIM; así como el incremento inducido por AO resultaron inclusive de la misma magnitud, aproximadamente 30 y 35%, respectivamente (Figuras 3 y 8B). Sin embargo, en cuanto a las fosfatasas de tirosina, aún cuando se reprodujo el comportamiento con respecto a E^- en presencia del vanadato (Figura 3), el incremento en la actividad de fosforilación fue tan solo del 75%.

Cuando se midió la capacidad de incorporación de ^{32}P en las endomembranas aisladas de tejido estimulado simultáneamente con AG_3 y ABA en presencia de los siferentes inhibidores (E^{**} , Figura 8C), prácticamente se reprodujo la tendencia de comportamiento de los elementos de fosforilación-desfosforilación presentado por E^+

(Figuras 8A y 8C). Tan solo el tratamiento con BIM generó un decremento más pronunciado en la fosforilación con respecto al que indujo en E⁺ (Figuras 8A y 8C).

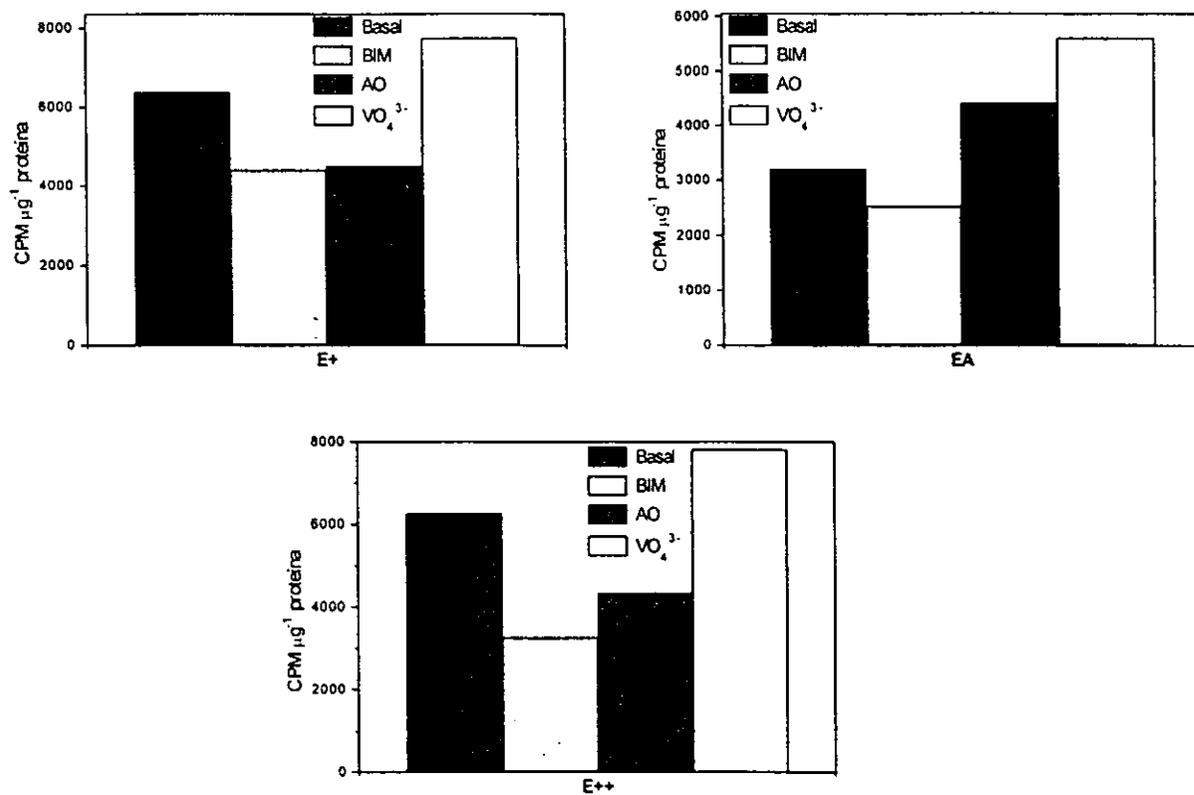


Figura 8. Efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad de fosforilación en endomembranas de aleuronas incubadas en presencia de (A) 1 mM AG3, (B) 20 mM ABA y (C) 1 mM AG3/ 20 mM ABA. BIM, bis-indolilmaleimida; AO, ácido okadaico; VO_4^{3-} .

DISCUSIÓN

ACTIVIDAD DE LA NADH OXIDASA

La membrana plasmática contiene una gran diversidad de sistemas óxidorreductores. Durante los últimos años, se ha generado una gran cantidad de evidencia que indica que algunas de estas enzimas redox podrían tener un papel importante en la transducción de señales; a través de la modulación directa de la actividad de las enzimas membranales responsables de la generación de segundos mensajeros y/o contribuyendo a la formación de diferentes dominios en la membrana plasmática. Esto facilitaría la fusión de vesículas membranales y promovería cambios en la actividad de los sistemas transportadores de iones, por ejemplo canales iónicos y ATPasas (Moller and Crane 1990; Aroeti *et al.* 1998; Gabbita *et al.* 2000).

La señalización del AG_3 en la aleurona es vía la formación de IP_3 y DAG (Ritchie and Gilroy 1996), lo que sugiere la presencia de PLC en la membrana plasmática del tejido. Esta enzima contiene una extensa secuencia homologa a la tioredoxina, que incluye conjuntos de grupos sulfhidrilo susceptibles de ser reducidos. El intercambio de estos grupos podría cambiar su actividad (Moller and Crane 1990). Además, para la respuesta celular se requiere el incremento de Ca^{2+} citoplásmico (Gilroy and Jones 1992; Bush 1996) y el tráfico de vesículas para la secreción de la α -amilasa (Gilroy and Jones 1992), cuya síntesis es la respuesta celular del fitorregulador en este tejido. En este sistema, al igual que en otros modelos, la actividad de estos eventos podría ser regulada a través de una NADH oxidasa de membrana plasmática.

En la capa de aleurona de cebada recién aislada e incubada en ausencia del fitorregulador se encuentra una actividad de NADH oxidasa constitutiva, insensible a cianuro, de alta afinidad por NADH (K_m en el rango mM) y cuya máxima actividad se manifiesta entre pH 7.0 y 7.4. Estas características sugieren que la NADH oxidasa de aleurona es de tipo I (Morré and Brightman 1991). Una actividad similar se encontró en membranas plasmáticas de hipocotilo de frijol soya (Morré *et al.* 1986); aunque la actividad de la óxidoreductasa en cuestión fue mucho mayor en aleurona (aproximadamente $80 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) que en soya (aproximadamente $1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) (Morré *et al.* 1995). Esta diferencia podría deberse a que el requerimiento de la actividad de esta enzima en cada tejido es diferente, ya que las características fisiológicas de cada uno de ellos también lo es, y/o a que en cada tejido se encuentra una isoenzima con diferente eficiencia catalítica, y/o a que su abundancia es distinta o a que en el caso de la aleurona existe más de una actividad.

La capa de aleurona responde al AG_3 iniciando la síntesis de α -amilasa que será secretada junto con otras enzimas hacia el endospermo almidonoso (Hill and MacGregor

1986). Al percibir esta señal, es factible que un cambio en el estado redox general de la membrana o de algunos de sus elementos fuese necesario como parte de la preparación del sistema para responder al estímulo. La NADH oxidasa podría participar en el establecimiento de este nuevo estado de oxidorreducción; o bien, verse modificada por el mismo. Esto concordaría con el hecho de que esta enzima es susceptible de ser modulada por el fitorregulador y por lo tanto participar en la señalización. La disminución de la actividad observada por efecto del AG₃ podría responder a dos factores principalmente: la disponibilidad de aceptores electrónicos y el cambio del estado redox de la enzima misma. El primero podría explicarse de varias formas. Una podría ser que hubiera un cambio en los componentes de la membrana plasmática que no permitiera la accesibilidad del aceptor a la enzima, ya sea físicamente o por una disminución en su concentración. Otra posibilidad sería que la enzima disminuyera su afinidad por el aceptor normal (en condiciones no estimuladas) y empezara a utilizar otro cuya disponibilidad fuese menor.

El cambio en el estado redox de la proteína implicaría que el efecto primario del AG₃ incide sobre otra actividad redox que altera el ambiente alrededor a la oxidasa, modificando algunos de sus grupos sulfhidrilos esenciales y disminuyendo su capacidad catalítica.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta última posibilidad resulta muy factible en el caso de la aleurona. Esto lo indica el hecho de que cuando el tejido ha sido expuesto al AG₃, la enzima queda en un estado tal que puede responder a cambios en el ambiente redox circundante, dando como resultado el restablecimiento de la actividad basal. Siendo que la actividad de la oxidasa de las membranas obtenidas de tejido recién aislado e incubado en ausencia del AG₃ no se altera ante cambios en el estado redox, entonces esta susceptibilidad de regulación parece ser inducida por efecto

del fitorregulador.

Este hecho apuntaría a que el estado óptimo de la enzima para la actividad basal sería el reducido. Entonces, se puede sugerir que el AG_3 promueve un estado más oxidado en la membrana. También es factible que la modificación en el estado redox no sea homogéneo en toda la membrana. Por ejemplo, podrían existir microdominios donde se presentara más pronunciadamente el cambio. Si esto ocurriera en las inmediaciones ricas en NADH oxidasa, la disminución en su actividad podría relacionarse con eventos más locales y éstos podrían tener que ver con la posible injerencia de esta enzima sobre otras directamente asociadas a la percepción y/o transducción que se encontraran en el mismo microdominio. En cuanto a la percepción, podría existir la necesidad de disminuir la actividad de la oxidasa para generar una configuración específica de un receptor (también regulado por estado redox) que favoreciera su interacción con el agonista o con algún efector. O bien, con respecto a la transducción, la modificación de la actividad podría generar alteraciones en la estructura (como la formación o reducción de puentes disulfuro) de una enzima productora de segundos mensajeros, como la PLC.

Finalmente, la disminución en la actividad de la NADH oxidasa podría no relacionarse con eventos tempranos de la transducción; sino más bien, contribuir a promover y mantener un estado metabólico específico para que el sistema pueda responder a la señal.

Dado que la secreción de α -amilasa es un evento tardío de la respuesta celular al AG_3 , los microdominios circundantes a la NADH oxidasa podrían constituir sitios de reconocimiento para la fusión de vesículas que contienen α -amilasa. Esto resulta factible debido a que, aparentemente, la membrana plasmática de la aleurona presenta una organización asimétrica, ya que la α -amilasa se secreta principalmente hacia el endospermo almidonoso (Jacobsen and Chandler 1988)

FOSFORILACIÓN IN VITRO

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de elementos de transducción de señales en la membrana plasmática de aleurona y estudiar el efecto del AG_3 y del ABA en estas actividades enzimáticas. Nuestros resultados sugieren que la membrana plasmática de aleurona posee actividades de cinasa de proteína tipo C, de fosfatasa de proteína de serina-treonina y de fosfatasa de proteína de tirosina. La evidencia que apoya la conclusión anterior se resume a continuación.

En la membrana plasmática de aleurona está presente una actividad basal de cinasa de proteína, pues en condiciones de fosforilación *in vitro*, el fosfato radiactivo del [γ - ^{32}P]-ATP se incorporó a polipéptidos de las membranas aisladas de aleuronas incubadas en ausencia de AG_3 . El análisis del patrón electroforético de las fosfoproteínas indica que la marca se distribuyó en polipéptidos de diversas masas moleculares, de los cuales los de bajo peso molecular (<30 kd) incorporaron mayor cantidad de ^{32}P . Lo anterior apunta, por un lado, a que en la membrana plasmática de la aleurona se encuentran presentes sustratos de las cinasas membranales y, por otro sugiere la existencia de múltiples proteínas que podrían ser modificadas por efecto de los fitorreguladores. Los niveles de proteínas fosforiladas detectadas en un sistema son el resultado del balance de la actividad de la pareja de enzimas cinasas de proteína (P-cinasas) y fosfatasas de proteína (P-fosfatasas). Por lo tanto, los resultados anteriores indican que estas enzimas están presentes en la membrana plasmática de aleuronas, así como los factores que regulan su actividad.

La calmodulina, el Ca^{2+} y la PKC se han descrito como factores que regulan la actividad de los sistemas de fosforilación/desfosforilación (Poovaiah and Reddy 1993; Ranjeva and Boudet 1987). La PKC también puede utilizar como sustrato otras proteínas,

las cuales por fosforilación modifican su conformación o su actividad, según sea el caso (modificación covalente por fosforilación) (Ranjeva and Boudet 1987).

De los factores reguladores antes mencionados sólo la PKC, o alguna cinasa análoga, podría ser activa durante el tratamiento con AG₃, ya que la cascada de señalización del AG₃ para la inducción de los genes de α -amilasa es independiente de Ca²⁺ y calmodulina (Gilroy 1996). Por ello es que sólo exploramos la presencia de PKC membranal como un factor responsable y/o regulador de la actividad de fosforilación *in vitro* de membrana plasmática aislada de aleurona.

En otros sistemas, la PKC está relacionada con la vía de señalización a través de la PLC que hidroliza los fosfoinosítidos de membrana para producir DAG e IP₃ (Berridge 1993). Esta evidencia también apoya la existencia de PKC o de una cinasa de proteína tipo PKC (tPKC) en membrana plasmática de aleurona como un factor modulador de la actividad del (los) sistema(s) de P-cinasa/P-fosfatasa presentes en este compartimento celular. En efecto, una actividad tPKC se detectó en la membrana plasmática de aleurona, ya que la capacidad de fosforilación de proteínas membranales disminuyó respecto a la basal cuando se evaluó en presencia de un inhibidor específico (BIM) (Toullec *et al.* 1991). Este resultado es sorprendente, ya que en otros sistemas está descrito que la PKC se recluta como consecuencia de la formación del complejo activo agonista-receptor y para que su asociación a la membrana sea de alta afinidad requiere de diacilglicerol y fosfatidilserina (Newton and Johnson 1998). En este trabajo, la tPKC se evaluó *in vitro* en membranas aisladas, por lo que su presencia indica que su asociación en estas membranas es a un sitio de alta afinidad y que, por tanto, podría haber una vía de formación de diacilglicerol independiente de agonista. Evidencia adicional que apoya esta sugerencia lo constituye el hecho de que la membrana plasmática de aleurona es rica en fosfatidilcolina (Hetherington and Laidman 1991; Arnalte *et al.* 1991) y el

diacilglicerol podría provenir de la hidrólisis la fosfatidilcolina (Besterman *et al.* 1986), fosfolípido de alto recambio en aleurona (Hetherington and Laidman 1976; Arnalte *et al.* 1991). La estimulación parcial de la fosforilación por BIM sugiere que en la membrana plasmática de este tejido están presentes cuando menos dos sistemas de cinasas: uno dependiente de tPKC y otro independiente. El dependiente contribuyó con el 28 % de la actividad de fosforilación observada y podría ser de dos clases, uno indirecto donde la tPKC fosforilara diversos sustratos de la membrana y así modificara su actividad enzimática. En el indirecto, la fosforilación se realizaría en los elementos del sistema P-cinasa/P-fosfatasa y a través de modificar esta actividad se modularían los niveles de fosforilación.

Mediante el uso de inhibidores se identificó la presencia de fosfatasas de serina-treonina (PPst) y de fosfatasas de tirosina (PPT). La primera se puso de manifiesto debido a que la actividad de fosforilación basal disminuyó en presencia de AO, lo que sugiere que esta P-fosfatasa tiene injerencia sobre una cinasa cuya actividad óptima se da en estado desfosforilado. La presencia de PPT se detectó utilizando como inhibidor al vanadato, que es específico de este tipo de fosfatasas (Hunter 1995). En su presencia, la fosforilación *in vitro* de proteínas de membrana se incrementó casi en un 50%. Estos resultados podrían explicarse si la PPT usara como sustrato una cinasa cuya actividad óptima es la forma fosforilada. En conjunto los resultados obtenidos con los inhibidores de fosfatasas de proteína son congruentes con la presencia de PKC identificada en este trabajo, puesto que esta enzima fosforila en residuos de serina y treonina (Newton and Johnson 1998), y con la propuesta de que la aleurona debe contar con estos elementos para que el AG_3 , que se percibe a nivel de membrana (Hooley *et al.* 1991, Gilroy and Jones 1994), induzca la transcripción de los genes de α -amilasa (Jacobsen and Chandler 1988).

Una vez identificados algunos de los componentes presentes en la membrana plasmática, se evaluó su comportamiento ante la inducción de las aleuronas con los fitorreguladores AG₃ y ABA. Los fitorreguladores no modificaron el patrón de proteínas fosforiladas, aunque sí se pudo observar que ABA incrementó notablemente la incorporación de ³²P en fosfoproteínas de bajo peso molecular (<30kd), mientras que AG₃ la disminuyó. El nivel de fosforilación de estos péptidos fue similar cuando la membrana se aisló de tejido tratado con AG₃ o con AG₃ y ABA. Desafortunadamente, estos experimentos no son concluyentes en cuanto a la participación de estos péptidos en señalización de los fitorreguladores, ya que para que una fosfoproteína participe en la cascada de señalización se requiere que su fosforilación sea transitoria (Suzuki and Shinshi 1995). Sin embargo, cabe recordar que en algunos sistemas, una vez percibida la señal, el complejo enzimático responsable de transmitir la señal al interior de la célula debe ser estable por el tiempo que deba sostenerse la señal (Ranjeva and Boudet 1987; Loshe *et al.* 1996; Pyne *et al.* 1996). En el caso de la aleurona se ha reportado que la eliminación del AG₃ del medio de incubación disminuye la acumulación del RNAm de α -amilasa, lo que sugiere que el complejo enzimático responsable de la señalización debe ser estable por lo menos las primeras 18 h de incubación (tiempo máximo en que se ha realizado este experimento).

Los experimentos con inhibidores permitieron identificar el efecto de fitorreguladores en los sistemas de P-cinasa/P-fosfatasa que estaban presentes, o se reclutaron durante el tratamiento, y que estaban contribuyendo a la actividad total de fosforilación en las membranas plasmáticas de aleurona.

El AG₃ regula un sistema de P-cinasa/ P-fosfatasa en el que no participan las PPst, ni las PPT; ya que la actividad de fosforilación *in vitro* observada en la membrana plasmática aislada de tejido tratado con AG₃ no se modificó cuando se ensayó en

presencia de AO, ni de VO_4 .

La actividad de la P-fosfatasa y/o de la P-cinasa parecerían ser reguladas por tPKC; y la máxima actividad de P-fosfatasa sería en estado fosforilado mientras que el de la P-cinasa sería en estado desfosforilado, por lo que al inhibir la actividad de tPKC con BIM, el grado de fosforilación de P-cinasa y/o de la P-fosfatasa disminuiría, con lo cual la actividad de P-cinasa aumentaría y o la de la P-fosfatasa disminuiría. En ambos casos, el resultado sería un incremento de sustratos fosforilados. La evidencia que apoya esta propuesta lo constituye el hecho de que la actividad de fosforilación en la membrana plasmática aislada del tejido tratado con AG_3 aumentó en un 58 %, cuando se evaluó en presencia de BIM.

En el caso de ABA, la actividad total de fosforilación de la membrana plasmática podría deberse a la presencia de dos sistemas de P-cinasa/P-fosfatasa, uno dependiente de tPKC y el otro independiente. Sin embargo, en ambos participarían PPst, susceptibles a inhibición por AO (Hunter 1995, Smith and Walker 1996), ya que la actividad de fosforilación inducida por el tratamiento con ABA se inhibió totalmente en presencia de AO; mientras que en presencia de BIM el decremento fue sólo del 25 %, respecto a la que presenta el tejido tratado con ABA. Las PPT no son regulables por ABA, ya que la actividad de fosforilación no se modificó de manera importante respecto a la basal cuando se evaluó en presencia de vanadato.

Aparentemente, la actividad del (los) sistema(s) de P-cinasa(s) activada(s) en membrana plasmática aislada de tejido tratado con ABA es inhibida por AG_3 , ya que la actividad de fosforilación en membrana plasmática aislada del tejido tratado con AG_3 y ABA fue similar a la basal. Estos resultados podrían explicarse si algunos eventos de señalización intracelular del ABA son revertidos por AG_3 , como en el caso de la transcripción del gene PHVA1 (Bethke *et al.* 1997). Cuando el tejido es tratado con ABA y

AG₃, los niveles de este mensajero se reducen al 25% del detectado con ABA (Kuo *et al.* 1996). Otra interpretación que explicaría los resultados de que el AG₃ inhibe la actividad de fosforilación promovida por ABA es que los fitorreguladores compartieran elementos de transducción a nivel de membrana plasmática, cuya afinidad es mayor para AG₃.

De lo anterior, resulta evidente que el AG₃ es capaz de modificar el comportamiento de los elementos de fosforilación-desfosforilación presentes en la membrana plasmática, especialmente a las cinasas dependientes de tPKC, sin que esto lleve a un cambio en el estado de fosforilación basal. Mientras que, por otra parte, el ABA también es capaz de alterar el comportamiento de estos factores, especialmente a las PPst, conduciendo a un incremento en la fosforilación. El efecto antagónico del AG₃ y ABA en la capa de aleurona podría deberse a que ambos fitorreguladores actúan en el mismo sistema de P-cinasa/P-fosfatasa, sólo que el AG₃ promueve la actividad de alguna(s) cinasa(s) de proteína dependiente(s) de tPKC; y el ABA inhibe a las PPst.

La existencia de moléculas señalizantes y/o efectoras de las cascadas de transducción de señales en endomembranas no es inusual, ya que en algunos sistemas se han reportado la existencia de receptores endógenos para ABA (Bethke *et al.* 1997) y auxinas (Hobbie *et al.* 1994). En aleurona, el AG₃ induce la síntesis y secreción de α -amilasa, procesos que requieren las actividades coordinadas de RE, aparato de Golgi y vesículas que almacenan proteínas. Por lo que en estos organelos debe haber blancos de los estímulos de transducción que provienen de la percepción de la señal en membrana plasmática, como los receptores-canales de Ca²⁺ estimulados por IP₃.

A la actividad de fosforilación observada en endomembranas aisladas de aleuronas sin tratamiento contribuyen al menos una P-cinasa que fosforila proteínas en residuos de serina/treonina y una actividad de tPKC. Estas propuestas derivan de que la actividad de fosforilación del sistema se modificó cuando se cuantificó en presencia de

ácido okadaico y en presencia de BIM. A diferencia de la membrana plasmática, en endomembranas no se detectó actividad de PPT, ya que la actividad de fosforilación no se modificó cuando en el ensayo se adicionó vanadato.

La actividad de fosforilación observada en endomembranas, al igual que la observada en membrana plasmática fue regulada por fitorreguladores. El efecto, en cuanto a magnitud y sentido, fue diferente para cada fitorregulador. El tratamiento con ABA disminuyó la actividad de fosforilación, mientras que AG_3 la incrementó. Asumiendo, que el sistema P-cinasa/P-fosfatasa sensible a AO presente en las endomembranas aisladas de aleuronas sin tratamiento es el mismo que se regula por fitorreguladores, y que su actividad de fosforilación depende de la proporción de P-cinasa desfosforilada (mayor actividad, C) a P-cinasa fosforilada (menor actividad C-P), los resultados de actividad de fosforilación en las endomembranas se podrían explicar si los fitorreguladores modifican la actividad de la cinasa a través de modificar la relación de C/C-P. Partiendo de la relación presente en el estado basal y asignándole arbitrariamente un valor de uno, el AG_3 cambiaría este valor a un valor mayor de la unidad. Las modificaciones de este equilibrio estarían a cargo de la P-fosfatasa sensible a AO. Obviamente que para fosforilar a la cinasa se requiere de una P-cinasa específica cuya actividad podría ser constitutiva.

En el caso de ABA, la actividad de fosforilación es menor que la basal, lo que indica una menor actividad de cinasa. Sin embargo los resultados con AO sugieren que ABA está actuando a través de un sistema de P-cinasa/P-fosfatas diferente del que utiliza AG_3 . Cuando se utilizan endomembranas aisladas de tejidos previamente tratados con ABA, AO incrementa la actividad de fosforilación *in vitro* respecto a la mostrada en su ausencia, lo que sugiere que la cinasa responsable es más activa en forma fosforilada, modificación que podría ser preservada dado que la fosfatasa está inhibida.

Aparentemente, la contribución de tPKC a la actividad de fosforilación sólo se modificó ligeramente en presencia de ABA, a diferencia de membrana plasmática, donde su actividad fue regulada por ambos fitorreguladores.

La localización membranal de estos componentes de la cascada de transducción de señales y el hecho de que su actividad y sensibilidad a inhibidores dependa del tratamiento del tejido, nos hace suponer que son elementos que unen la percepción del fitorregulador con su respuesta celular. Sin embargo, requerimos de aislarlos e identificarlos de manera inequívoca.

Los resultados anteriores se pueden integrar en el modelo que se muestra en el diagrama 1. En el recuadro B se muestran algunos de los elementos de transducción de señales presentes en la membrana plasmática de aleurona que no ha sido estimulada por el AG_3 . En este estado se encontrarían las actividades basales de cinasas (Ca), fosfatasa (PPa) y de la NADH oxidasa (Nox). También se representa la existencia de un receptor con dos sitios de unión, uno para el AG_3 y otro para el ABA. Cuando se estimula el sistema con el AG_3 (recuadro A), el fitorregulador ocuparía su sitio en el receptor y provocaría un cambio conformacional que promovería la desaparición del sitio de unión del ABA. En esta configuración, el receptor induciría la disminución en la actividad de la NADH oxidasa. Este decremento en la actividad podría propiciar el establecimiento del estado redox necesario para la activación de la PLC. Esta última generaría un incremento en la concentración de IP_3 y el DAG para la activación de tPKC. Esta cinasa actuaría activando a una fosfatasa y/o inactivando a una cinasa. A pesar de que no existen elementos suficientes para afirmar que existe una interacción directa entre el receptor y la NADH oxidasa en este modelo se representó así por simplicidad, aunque la inhibición de la enzima podría realizarse de manera indirecta.

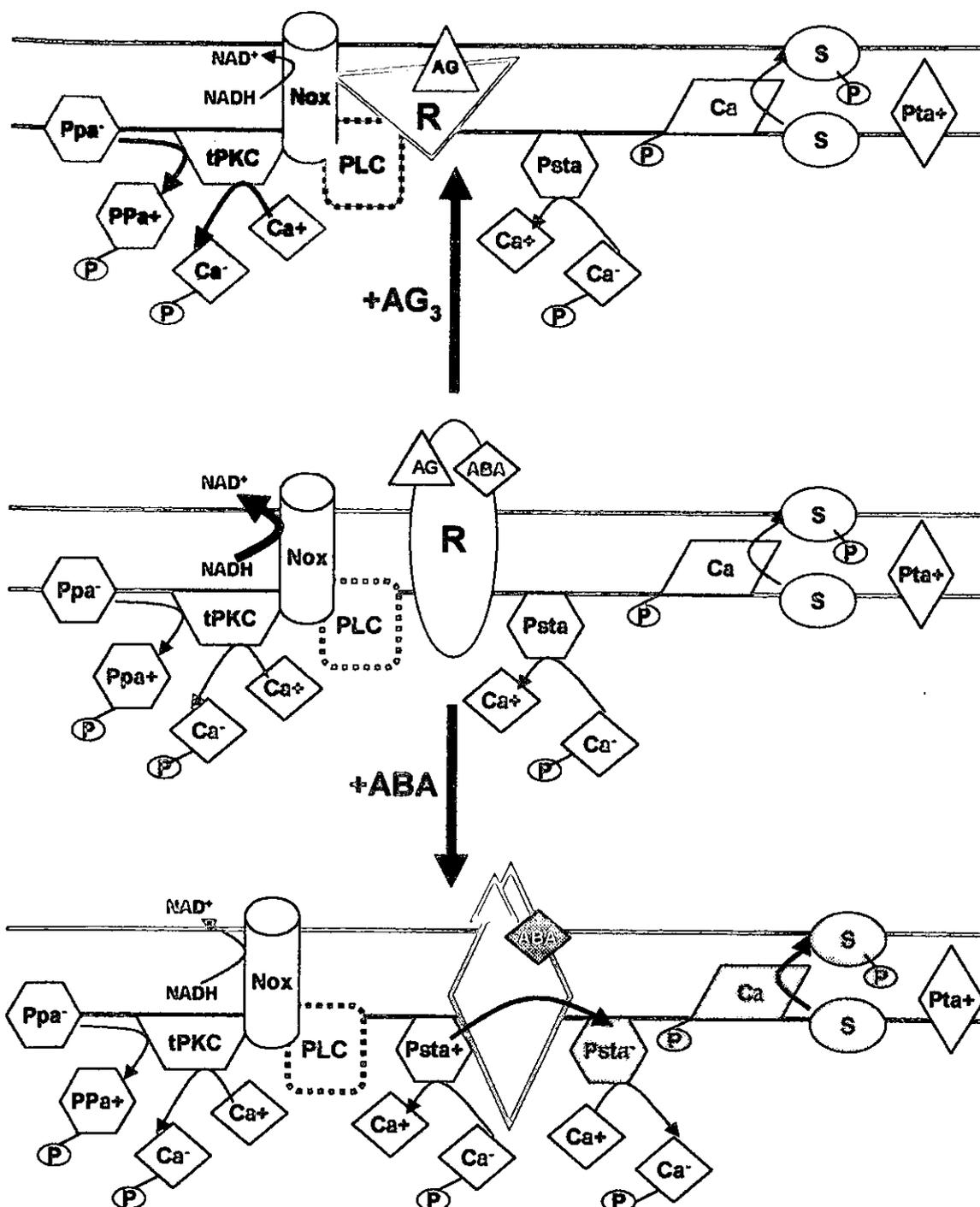


Diagrama 1. Elementos de fosforilación en membrana plasmática de aleurona. Los elementos en color rosa representan aquellos estimulados por la unión del AG₃ al receptor; los morados representan aquellos estimulados por ABA. PPa⁻, fosfatasa de proteína; Ca, cinasa de proteína; Psta, fosfatasa de serina/treonina; Pta, fosfatasa de tirosina; PLC, fosfolipasa C; tPKC, actividad tipo cinasa C de proteína; R, receptor; Nox, NADH oxidasa. Los superíndices - y + representan baja actividad y alta actividad, respectivamente

Al estimular a la aleurona con ABA (recuadro C), éste ocuparía su sitio de unión y generaría un cambio conformacional en el receptor. De esta forma, el receptor promovería la inactivación de una fosfatasa de serina/treonina. La disminución en la actividad de esta fosfatasa se reflejaría en la permanencia de una cinasa que es inactiva en estado fosforilado y de otra que es activa en este estado y es capaz de fosforilar otros sustratos.

Como se puede observar en este modelo, en la aleurona existe una gran diversidad de cinasas que podrían participar en las vías de transducción presentes en este tejido. Dado que la regulación por fosforilación es un proceso reversible y dinámico, no sólo la actividad de fosforilación resulta importante, sino que también es indispensable la actividad de fosfatasas que puedan regular el grado de fosforilación, ya sea para activar, inactivar y/o modular alguna enzima que permita el sostenimiento o la eliminación de una señal.

Ya que el proceso de fosforilación-desfosforilación es uno de los mecanismos principales de amplificación de las señales, éste debe ser sumamente preciso y altamente regulado. Resulta evidente entonces que, además de su capacidad de regular su actividad por medio de la fosforilación, estas enzimas deben tener formas de modular su susceptibilidad de ser fosforiladas (o desfosforiladas) en condiciones específicas.

Recientemente, ha surgido evidencia que sugiere que las especies redox y el estado general de óxido-reducción de la célula juegan un papel muy importante en los mecanismos de regulación de la transducción de señales. En particular, con respecto a los procesos de fosforilación, se ha descrito la inactivación de la actividad de fosfatasas de proteína a través de la oxidación reversible de una cisteína conservada en el dominio catalítico. Para que la fosfatasa presente su actividad completa, se requiere que este dominio se encuentre completamente reducido, lo que se puede lograr sólo si existe un

balance redox intracelular adecuado (Gabbita *et al.* 2000).

Entonces es factible que los mismos mensajeros químicos sean capaces de promover cambios en el balance de óxido-reducción de la célula para que su señal se propague de forma más específica. En el caso de la aleurona, se observó la disminución de la actividad de una enzima regulada por su estado redox ante el AG_3 . Por el momento, no es posible proponer la participación directa de la NADH oxidasa en la transducción de este fitorregulador; sin embargo, el hecho de que el estado redox de la enzima se modifique por la presencia del AG_3 , sugiere que éste induce un cambio en el estado redox de la célula. Esto puede tener relevancia en cuanto a la regulación de otros elementos involucrados en este proceso.

CONCLUSIONES

- Las condiciones de aislamiento y purificación de la membrana plasmática de capa de aleurona de cebada resultaron adecuadas para lograr una fracción altamente enriquecida en este tipo de membrana.
- En la membrana plasmática de la aleurona existe la actividad de una NADH oxidasa cuya actividad se modifica por efecto del ácido giberélico y es capaz de responder al estado de oxidorreducción circundante a la membrana.
- Los elementos de fosforilación-desfosforilación identificados en la membrana plasmática de aleurona son: un tipo de cinasa C de proteína (tPKC), fosfatasas de proteína de serina-treonina y fosfatasas de proteína de tirosina. Estos elementos son regulados de diferente manera por los fitorreguladores, AG₃ y ABA.

-
- La actividad del sistema de cinasas/fosfatasas se modifica por la acción de AG_3 en membrana plasmática. En esta modificación está involucrada tPKC.
 - El sistema de fosforilación-desfosforilación presente en membranas de aleuronas tratadas con ABA parece tener dos contribuciones: una dependiente de tPKC y otra independiente, y en ambas participan fosfatasas de serina-treonina.
 - El efecto antagónico de los fitorreguladores parece ser resultado de la activación de cinasas de proteína dependientes de tPKC por el AG_3 y la inactivación de las fosfatasas de serina-treonina por el ABA.
 - En endomembranas, los elementos de fosforilación-desfosforilación identificados son una tPKC y las fosfatasas de serina-treonina. Estos también son susceptibles de ser modulados por los fitorreguladores.

BIBLIOGRAFÍA

Arnalte, M.E., Cornejo, M.J., Bush, D.S., Jones, R.L. 1991, Gibberellic acid stimulates lipid metabolism in barley aleurone protoplasts. *Plant Sci* 77, 223-232

Aroeti, B., Okhrimenko, H., Reich, V., Orzech, E. 1998. Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNARE's, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1376, 57-90

Baizabal-Aguirre, V.M., González de la Vara, L.E. 1997. Characterization of the protein kinase activity in beet root plasma membranes. *Physiol Plant* 91, 147-154

Baizabal-Aguirre, V.M., González de la Vara, L.E. 1997. Purification and characterization of a calcium-regulated protein kinase from beet root (*Beta vulgaris*) plasma membranes. *Physiol Plant* 99, 135-143

Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325

Besterman, J.M., Duronio, V., Cuatrecasas, P. 1986. Rapid formation of a diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 83, 6785-6789
- Bethke, P.C., Schuurink, R., Jones, R.L. 1997. Hormonal signaling in cereal aleurone. *J Exp Bot* 48 (312), 1337-1356
- Braun, D.M., Walker, J.C. 1996. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *TIBS* 21, 70-73
- Briskin, D.P., Leonard, R.T., Hodges, T.K. 1987. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *En Methods in Enzymology* 148, 542-575
- Bush, D.S. 1996. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* 199, 89-99
- Bush, D.S., Wang, T. 1995. Diversity of calcium efflux transporters in wheat aleurone cells. *Planta* 197, 19-30
- Chen, X., Chang, M., Wang, B., Wu, R. 1997. Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene and the role of cytosolic Ca^{2+} in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J* 11(3), 363-371
- Dangl, J.L., Preuss, D., Schroeder, J.I. 1995. Talking through walls: Signaling in plant development. *Cell* 83, 1071-1077
- Dixon, R.A., Lamb, C.J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41, 339-367
- Drayer, A.L., van Haastert, P.J.M. 1994. Transmembrane signaling in eukaryotes: a comparison between higher and lower eukaryotes. *Plant Mol Biol* 26, 1239-1270
- Evans, D.E., Williams, L.E. 1998. P-type calcium ATPases in higher plants- biochemical, molecular and functional properties. *Biochim Biophys Acta* 1376, 1-25
- Gabard, K.A., Jones, R.L. 1986. Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. *Physiol Plant* 67, 182-192
- Gabbita, S.P., Robinson, K.A., Stewart, C.A., Floyd, R.A., Hensley, K. 2000. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 376, 1, 1-13
- Garril, A., Findlay, G.P., Tyerman, S.D. 1997. Mechanosensitive ion channels. *En: M. Smallwood, J.P. Knox and D.J. Bowles (eds) Membranes: Specialized functions in plants. BIOS scientific publishers, UK, 247-260*

- Gilroy, S. 1996. Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. *Plant Cell* 8, 2193-2209
- Gilroy, S., Jones, R.L. 1992. Gibberellic acid and abscisic acid co-ordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3591-3595
- Gilroy, S., Jones, R.L. 1994. Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membranes of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol* 104, 1185-1192
- González de la Vara, L.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Medina, G. 1992. Kinetics of the plasma membrane H⁺-ATPase from red beet (*Beta vulgaris*). *Physiol Plant* 86, 407-413
- González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S., Gavilanes-Ruiz, M., 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem* 200, 235-238
- Gubler, F., Jacobsen, J.V. 1992. Gibberellin responsive elements in the promoter of a barley high-pI α -amylase gene. *Plant Cell* 4, 1435-1441
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K., Jacobsen, J.V. 1995. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. *Plant Cell* 7, 1879-1891
- Hetherington, P.R., Laidman, D.L. 1991. Influence of gibberellic acid and the Rht3 gene on choline and phospholipid metabolism in wheat aleurone tissue. *J Exp Bot* 42, 244, 1357-1362
- Hill, R.D., MacGregor, A.W. 1986. Cereal α -amylases in grain research and technology. *Adv. in Cereal Sci Tech* 217-261
- Hobbie, L., Timpte, C., Estelle, M. 1994. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol Biol* 26, 1499-1519
- Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J. 1991. Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* 183, 274-280
- Hooley, R. 1984. Gibberellic acid controls the secretion of acid phosphatase in aleurone layers and isolated aleurone protoplasts of *Avena fatua*. *J Exp Bot* 35 (155) 822-828

- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of a protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236
- Huttly, A.K., Phillips, A.L. 1995. Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 27, 1043-1052
- Jacobsen, J.V., Beach, L.R. 1985. Evidence for control of transcription of α -amylase and ribosomal RNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellic acid and abscisic acid. *Nature* 316, 275-277
- Jacobsen, J.V., Chandler, P.M. 1988. Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. In *Plant hormones and their role in plant growth development*. Kluwer Acad. Publishers, Ed. P.J. Davies, 164-193
- Jones, H.D., Smith, S., Plakidou-Dymock, S., Hooley, R. 1996. $G\alpha$ and $G\beta$ subunit genes and signal transduction in *Avena fatua* aleurone. *J Exp Bot* 47, supplement 5
- Jones, H.D., Smith, S.J., Desikan, R., Plakidou-Dymock, S., Lovegrove, A., Hooley, R. 1998. Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* 10, 245-253
- Jones, R.L. 1973. Gibberellic acid and ion release from barley aleurone tissue. *Plant Physiol* 52, 303-308
- Knetsch, M.L., Wang, M., Snaar-Jagalska, B.E., Heimovaara-Dijkstra, S. 1996. Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8, 1061-1067
- Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodríguez, M., Bush, D.S. 1996. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 8, 259-269
- Larsson, C., Widell, S., Kjellbom, P. 1987. Preparation of high-purity plasma membranes. *En Methods Enzymol.* 148, 558-568
- Lazarus, C.M., Baulcombe, D.C., Martienssen, R.A. 1985. α -amylase genes of wheat are two multigene families which are differentially expressed. *Plant Mol Biol* 5, 13-24
- Lohse, M.J., Blümi, K., Danner, S., Krasel, C. 1996. Regulators of G-protein-mediated

signaling. *Biochem Soc Trans* 24, 975-979

Loomis, W.F., Shaulsky, G., Wang, N. 1997. Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci* 110, 1141-1145

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

Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185

Maya, V. 1997. Aislamiento y purificación de membrana plasmática de capa de aleurona de cebada. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México

Moller, I.M., Crane, F.L. 1990. Redox processes in the plasma membrane. En: Larsson, C., Moller, I.M. (eds) *The plant plasma membrane: structure, function and molecular biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 94-126

Morré, D.J. 1994. Hormone- and growth factor-stimulated NADH oxidase. *J Bioenerg Biomem* 26, 4, 421-432

Morré, D.J., Brightman, A.O. 1991. NADH oxidase of plasma membranes. *J Bioenerg Biomem* 26, 4, 469-489

Morré, D.J., Navas, P., Penel, P., Castillo, F.J. 1986. Auxin-stimulated NADH oxidase (semidehydroascorbate reductase) of soybean plasma membrane: role in acidification of cytoplasm? *Protoplasma* 133, 195-197

Newton, A., Johnson, J.E. 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta* 1376, 155-172

Penson, S.P., Shuurink, R.C., Fath, A., Gubler, F., Jacobsen, J.V., Jones, R.L. 1996. cGMP is required for gibberellic acid induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 8, 2325-2333

Petty, H.R. 1993. Receptors and responses. En *Molecular biology of membranes: structure and function*, Chap. 7. Plenum Press Ed., New York & London

Poovaiah B.W., Reddy, A.S.N., McFadden, J.J. 1987. calcium messenger system: Role of protein phosphorylation and inositol bis-phospholipids. *Physiol Plant* 69, 569-573

Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N., 1993. Calcium and Signal transduction in plants. *Critical*

Reviews in Plant Sciences 12 (3), 185-211

Pyne, N.J., Asshovsky, V., Lochhead, A. 1996. cGMP signal termination. *Biochem Soc Trans* 24, 1019-1022

Ranjeva, R., Boudet, A.M. 1987. Phosphorylation of proteins in plants: regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38, 73-93

Ray, P.M. 1979. Membrane associated molecules and structures: Maize coleoptile cellular membranes bearing different types of glucan synthetase activity. En: *Plant Organelles*, E. Reid ed., 135-146

Ritchie, S., Gilroy, S. 1996. The regulation of the response of barley aleurone protoplasts to GA and ABA by elements of the phospholipid signal transduction pathway. *Plant Physiol* 111, 153

Rogers, J.C., Milliman, C. 1984. Coordinate increase in major transcripts from the high pI α -amylase multigene family in barley aleurone cells stimulated with gibberellic acid. *J Biol Chem* 259 (19), 12134-12241

Rogers, J.C., Rogers, S.W. 1992. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid cis-acting hormone response complexes. *Plant Cell* 4, 1443-1451

Schroeder, J.I., Hagiwara, S. 1990. Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of non-selective Ca^{2+} permeable channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 9305-9309

Shen Q., Ho, T-HD. 1995. Functional dissection of an ABA-inducible gene reveals two independent ABA responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* 7, 295-307

Shen, Q., Zhange, P., Ho, T-HD. 1996. Modular nature of ABA response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8, 1107-1119

Shimoni, Y., Zhu, X., Levanony, H., Segal, G., Galili, G. 1995. Purification, characterization, and intracellular localization of glycosylated protein disulfide isomerase from wheat grains. *Plant Physiol* 108, 327-335

- Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C., Mundy, J. 1991. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7266-7270
- Smith, R.D., Walker, J.C. 1996. Plant protein phosphatases. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 47, 101-125
- Stone, J.M., Trotochaud, A.E., Walker, J.C., Clark, S.E. 1998. Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol* 117, 1217-1225
- Stone, J.M., Walker, J.C. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant physiol* 108, 451-457
- Suttlif, T.D., Lanahan, M.B., Ho, T-HD. 1993. Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley α -amylase promoter. *Plant Cell* 5, 1681-1692
- Suzuki, K., Shinshi, H. 1995. Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7, 639-647
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Thierry, G.P., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D., Kirilovsk, J. 1991. The bisindolylmaleimide GF109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266, 15771-15775
- Vicente, J.A.F., Vale, M.G.P. 1994. Proton transport by a fraction of endoplasmic reticulum and golgi membranes of corn roots: comparison with the plasma membrane and tonoplast H⁺ pumps. *Plant Sci* 96, 55-68
- Walker, R.P., Waterworth, W.M., Hooley, R. 1993. Preparation and polypeptide composition of plasma membrane and other subcellular fractions from wild oat (*Avena fatua*). *Physiol Plant* 89, 388-398
- Walker, R.P., Waterworth, W.M., Beale, M.H., Hooley, R. 1994. Gibberellin photoaffinity labeling of wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. *Plant Growth Reg* 15, 271-279
- Wang, M., Sedde, N.J.A., Heidekamp, F., Snaar-Jagalska, B.E. 1993. Detection of GTP-binding proteins in barley aleurone protoplasts. *FEBS Lett* 329, 245-248

Wurgler, S.M., Saito, H. 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. TIBS 22, 172-176

Zwar, J.A., Hooley, R. 1986. Hormonal regulation of α -amylase gene transcription in wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. Plant Physiol 80, 459-463

ANEXO I

P- P+ P^A P⁺⁺ E- E+ E^A E⁺⁺

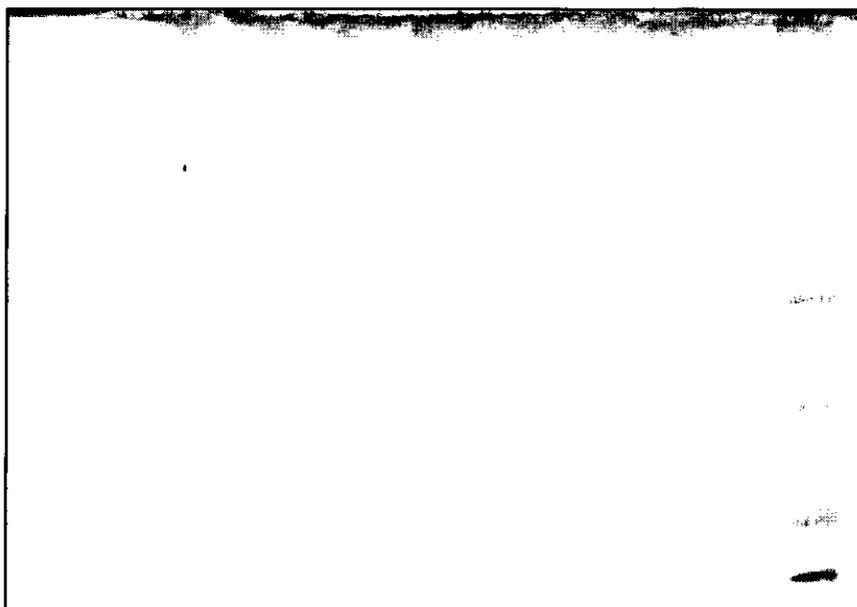


Imagen del EGPA-SDE al 10% teñido con azul de Coomassie: 20 mg de proteína por carril. P-, membrana plasmática control; P+, membrana plasmática de aleuronas incubadas en presencia de AG₃; P^A, membrana plasmática de aleuronas incubadas en presencia de ABA; P⁺⁺, membrana plasmática de aleuronas incubadas en presencia simultánea de AG₃ y ABA; E-, endomembranas control; E+, endomembranas de aleuronas incubadas en presencia de AG₃; E^A, endomembranas de aleuronas incubadas en presencia de ABA; E⁺⁺, endomembranas de aleuronas incubadas en presencia simultánea de AG₃ y ABA;