

124



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

DETERMINACION DE LOS PATRONES DE FOSFORILACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA PLASMATICA EN EMBRIONES DE MAIZ EXPUESTOS A LA FUMONISINA B1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: ZOMOSA SIGNORET VIVIANA CHANTAL

283495





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

**Presidente** Dra. MARINA GAVILANES RUÍZ

**Vocal** Dr. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

**Secretario** Dra. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

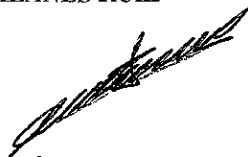
**1er. Suplente** Dr. JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

**2º. Suplente** M. en C. LUIS TONATTUH SÁNCHEZ LINARES

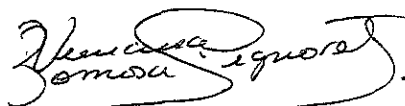
**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio 101, Edificio "E", Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, U.N.A.M.



**Asesor del tema:** Dra. MARINA GAVILANES RUÍZ



**Supervisor técnico:** Química LAUREL FÁBILA IBARRA



**Sustentante:** VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET

A mi mamá Chantal Signoret Poillon por demostrarme siempre que aunque hay momentos en que las cosas parecen difíciles, juntas podemos encontrar una solución.

A mi hermana Andrea Zomosa Signoret por su apoyo de toda la vida y por ser la mejor amiga que tengo.

A mi tía Martha Signoret Poillon por enseñarme que el camino de la Ciencia es difícil pero está lleno de satisfacciones.

A mi abuelita Martha Poillon de Signoret por ser siempre un apoyo incondicional.

A todos mis familiares y amigos por estar tanto en los momentos fáciles como en los difíciles.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz por sus sabios consejos y por el apoyo y dedicación que me brindó en todo este tiempo.

A la Química Laurel Fábila por su supervisión técnica.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y el Dr. Fernando Montiel Aguirre por las correcciones pertinentes realizadas a este trabajo.

A los integrantes del Lab. 101, Edificio "E" de la Facultad de Química por todo el apoyo que me brindaron.

Al Doctor Antonio Peña Díaz por permitirme realizar parte de los experimentos en su laboratorio. Agradezco también a todo su equipo de trabajo por todas las atenciones que tuvieron para conmigo.

A los Doctores Armando Gómez-Puyou y Marietta Tuena de Gómez-Puyou por permitirme realizar parte de los experimentos en sus laboratorios. Agradezco también a todo su equipo de trabajo por todo el apoyo brindado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de tesis fue realizado bajo dirección de la Dra. Marna Gavilanes Ruiz y la supervisión técnica de la Química Laurel Fábila en el Laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, conjunto E, de la Facultad de Química, UNAM

Viviana Chantal Zomosa Signoret, recibió una beca de tesis del proyecto DGAPA No. IN204097 y del Subprograma 127 de la Facultad de Química

El trabajo de la tesis fue financiado por los proyectos DGAPA IN204097 y CONACyT No 25131-B

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1-1
INTRODUCCIÓN.....	2-37
<b>I. Hongos patógenos de plantas.....</b>	<b>2-7</b>
<b>I.I. Síntomas de enfermedades en plantas</b>	
<b>II. Interacción planta patógeno.....</b>	<b>8-11</b>
<b>II.1. Penetración por parte del hongo</b>	
<b>III. Mecanismos de resistencia a patógenos.....</b>	<b>11-29</b>
<b>III.1. Barreras preformadas</b>	
<b>III.2. Barreras mecánicas inducidas</b>	
<b>III.3. Sustancias preformadas</b>	
<b>III.4. Sustancias producidas como respuesta al ataque por patógenos (fitoalexinas)</b>	
<b>III.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)</b>	
<b>III.6. Cinasas de proteínas</b>	
<b>6.a. Propiedades generales</b>	
<b>6.b. Especificidad para los donadores de fosfato en las reacciones de las cinasas de proteínas</b>	
<b>6.c. Reacciones de autofosforilación</b>	
<b>6.d. Sistemas cíclicos de cascadas</b>	
<b>6.e. Fosforilación de proteínas en plantas</b>	
<b>III.7. Calcio y canales iónicos</b>	
<b>III.8. Respuesta a evocadores (elicitores)</b>	
<b>III.9. Respuesta de hipersensibilidad</b>	

<b>IV. Fitotoxinas y su acción sobre la planta hospedera.....</b>	<b>30-32</b>
<b>V. Membrana plasmática.....</b>	<b>33-37</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>38-38</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38-38</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>38-38</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>39-62</b>

**I.- Imbibición de los embriones de maíz**

**II.- Obtención de la fracción microsomal de embriones de maíz**

**III.- Determinación de la concentración de proteína**

**IV.- Remoción de lípidos de vesículas microsomales de embriones de maíz**

**V.- Preparación de geles de poliacrilamida-SDS**

**VI.- Obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP)**

**VII.- Ensayo de fosforilación de proteínas de VMP**

**VIII.- Medición de hidrólisis de ATP**

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63-81</b>
------------------------	--------------

**1) Obtención de la fracción microsomal**

**2) Tratamiento de precipitación de la proteína**

**3) Optimización de las condiciones de electroforesis**

**4) Ensayos de fosforilación**

**I. Fosforilación de proteínas de la membrana plasmática por cinasas endógenas en ausencia y presencia de calcio**



- II. Efecto de la orientación membranal en la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática
- III. Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática
- IV. Efecto del tiempo con la FB<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática
- V. Efecto de la concentración de ATP en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática
- VI. Efecto de diferentes concentraciones de FB<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática
- VII. Efecto de inhibidores o activadores de cinasas de proteínas

DISCUSIÓN .....	82-87
CONCLUSIONES.....	88-88
BIBLIOGRAFÍA.....	89-93

## **ÍNDICE DE TABLAS**

- I. Clasificación taxonómica de los principales hongos patógenos de plantas**
- II. Fitoalexinas importantes y plantas que las producen**
- III. Composición del medio I (medio de homogeneización)**
- IV. Composición del medio II (buffer del pellet)**
- V. Determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Lowry**
- VI. Composición de geles de acrilamida-bisacrilamida ( 30%-0.8% )-SDS**
- VII. Composición de la mezcla de fases para embriones embebidos**
- VIII. Composición de la mezcla general para los ensayos de fosforilación**
- IX. Composición de las muestras esenciales en el ensayo de fosforilación**
- X. Inhibidores o activadores utilizados en el ensayo de fosforilación**
- XI. Concentraciones de las soluciones stock y finales para medir la actividad de la hidrólisis de ATP**
- XII. Curva patrón de fosfato inorgánico**
- XIII. Procedimiento para medir la hidrólisis de ATP con fosfato liberado**
- XIV. Precipitación de proteínas membranales de fracciones microsomales de embriones de maíz**

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**Fig. 1. Interconversión de diferentes ROS y las enzimas involucradas**

**Fig. 2. Modelo de la cascada cíclica de fosforilación–defosforilación de proteínas**

**Fig.3. Conversión de estímulos en respuestas bioquímicas y fisiológicas**

**Fig.4. Activación de una respuesta celular mediada por calcio**

**Fig.5. Activación de la HR y su relación con la producción de fitoalexinas**

**Fig.6. Estructura de la Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>)**

**Fig.7. Estructura de las membranas biológicas**

**Fig.8. Componentes de la membrana**

**Fig.9. Esquema sobre la vectorialidad y energética de las reacciones de transporte de H<sup>+</sup> y de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup>**

**Fig.10. Diagrama del ensayo de imbibición de los embriones de maíz**

**Fig.11. Procedimiento para obtener la fracción microsomal de embriones de maíz**

**Fig.12. Procedimiento de remoción de lípidos de vesículas microsomales**

**Fig.13. Procesos de obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP)**

**Fig.14. Procedimiento para concentrar la fracción de vesículas de membrana plasmática**

**Fig.15. Patrón electroforético de las proteínas de las fracciones microsomales precipitadas con y sin la mezcla acetona/etanol**

**Fig.16. Optimización de condiciones de electroforesis de las proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz**

**Fig.17. Fosforilación de cinasas endógenas de la membrana plasmática en ausencia y presencia de calcio**

**Fig.18. Ensayo de fosforilación en presencia de Brij No. 58**

**Fig.19. Ensayo de fosforilación en presencia y ausencia de Fumonisina B<sub>1</sub>**

**Fig.20. Efecto del tiempo y de la FB<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática**

**Fig.21. Efecto de la concentración de AT-<sup>32</sup>P y de la fumonisina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática**

**Fig.22. Efecto de la concentración de FB<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática**

**Fig.23. Efecto de distintos inhibidores o activadores sobre la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática**

**Fig.24. Efecto de la estaurosporina sobre la fosforilación de proteínas de membrana plasmática**

## SECCIÓN DE ABREVIATURAS

**AMPc.**- AMP cíclico. Adenosin monofosfato cíclico

**ATP.**- Adenosin trifosfato

**BIS.**- Bisindolilmaleimida

**BSA.**- Albúmina Sérica Bovina

**CCCP.**- Carbonil cianido m-clorofenilhidrazona

**DTT/DTE.**- DL-dithiothreitol

**EDTA.**- Ácido etilendiaminotetracético

**EGTA.**- Etilen Glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil Éter) $N,N,N',N'$ -Ácido tetraacético.

**ESTAUROS.**- Estaurosporina

**FB<sub>1</sub>.**- Fumonisina B<sub>1</sub>

**HEDTA.**- Ácido N,Hidroxi-etilendiamina tetracético.

**Hepes.**- (N-[2-Hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-Ácido etanosulfónico])

**HR.**- Respuesta de hipersensibilidad

**HSTs.**- Toxinas selectivas del huésped

**MOPS.**-(3-[N-Morfolino] ácido propansulfónico)

**PEG.**- Polietilenglicol

**PMA.**- Phorbol 12-myristate 13-Acetate

**QUEL.**- Cloruro de queleritina

**ROS.**- Especies reactivas de oxígeno

**SDS.**- Dodecil Sulfato de Sodio

**SOD.**- Superóxido dismutasa

**TEMED.**-  $N,N,N',N'$ -Tetrametilendiamina

**TLCK.**- N- $\alpha$ -p-Tosil-L-lisina Clorometil Cetona

**TPCK.**- N-Tosyl-L-phenylalanine Chloromethyl

**TRIS (TRIZMA BASE).**- (Tris[hidroximetil]amino metano)  
**VMP.**- Vesículas de Membrana Plasmát

**RESUMEN:**

Se ha propuesto que uno de los principales blancos celulares de las fumonisinas son las membranas debido a la naturaleza anfipática de estas toxinas (Desjardins *et al.* 1997). La implicación fisiológica de este efecto puede ser muy importante, ya que la membrana plasmática es un sitio primario de recepción de estímulos externos y de transmisión de señales hacia el interior celular, ambos, elementos fundamentales en los procesos de transducción de señales.

Ya que el ataque de un hongo fitotóxico desencadena una serie de mecanismos de defensa en la célula hospedera (Knogge 1996, Manners 1982, Scheel 1998), es también concebible que las fumonisinas, metabolitos secundarios liberados por el hongo *Fusarium moniliforme*, puedan generar una serie de cambios celulares que se inician a nivel de la membrana plasmática de la célula vegetal.

Uno de los procesos en los que participa la membrana plasmática durante el ataque de hongos patógenos es la fosforilación de proteínas (Ranjeva y Boudet 1987; Vera-Estrella, *et al.* 1994a; Vera-Estrella *et al.* 1994b; Xing *et al.* 1996). Asimismo se han descrito cinasas de proteínas en plantas tanto de naturaleza soluble (Lino *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 1992), como de membrana plasmática (González de la Vara 1990, Xing *et al.* 1996).

## **INTRODUCCIÓN:**

### **I.Hongos patógenos de plantas.**

Los hongos constituyen un grupo muy versátil de organismos eucariotes carbonoheterótrofos que han ocupado con éxito diversos habitats. La mayoría de los hongos son saprófitos; menos del 10% de las aproximadamente 100,000 especies fúngicas conocidas son capaces de colonizar plantas y una pequeña fracción de éstas es capaz de causar alguna enfermedad (Knogge 1996). Entre los agentes causales de enfermedades infecciosas de cultivos de plantas, los hongos fitopatógenos juegan un papel dominante, no sólo como causantes de epidemias devastadoras, sino también como representantes del grupo económicamente más importante de microorganismos patógenos.

La evolución de los hongos fitopatógenos se ha dado a través de un grado alto de selección con respecto a las especies individuales de plantas hospederas y se refleja en los diferentes niveles de especialización de los mecanismos que involucran la interacción planta-patógeno. El primer nivel puede observarse en parásitos oportunistas que entran a la planta a través de heridas o requieren de plantas débiles para su colonización, causando sólo enfermedades poco severas debido a que el crecimiento del hongo se ve restringido gracias a la formación de zonas de necrosis en la planta. El siguiente nivel comprende a patógenos verdaderos que necesitan de plantas vivas para crecer, pero que pueden sobrevivir fuera de su huésped sólo bajo condiciones especiales; la mayoría de los patógenos de plantas más importantes se encuentran en este nivel ya que afectan al grupo económicamente más importante; muchos son altamente virulentos en un número limitado de especies. Finalmente, el nivel con una complejidad más alta es el de los patógenos obligados, para los cuales las plantas vivas son absolutamente necesarias para completar su ciclo de vida, por lo cual establecen una relación muy estrecha con su huésped. Durante el desarrollo de la infección, estos



patógenos se involucran en varios procesos muy sofisticados, pero pobremente entendidos, relacionados con el flujo de nutrientes hacia los tejidos de la planta, alterando el crecimiento y la morfología de ésta. Los cambios en el patógeno son también evidentes durante la patogénesis, aunque aún se requiere que se estudien más profundamente (Jackson y Taylor 1996).

Los hongos fitopatógenos pueden dividirse en dos grandes categorías de acuerdo al tipo de células huésped en las cuales sustentan su crecimiento (Gurr et al. 1992).

- 1) **Necrótrofos:** Usualmente causan un extenso daño a nivel de tejido y derivan su nutrición de células muertas o que están muriendo. Esta muerte está generalmente asociada con la degradación de la pared celular.
- 2) **Biótrofos:** Tienen una mayor relación con sus huéspedes, se nutren de células vivas y generalmente causan un menor daño a nivel de tejido en la infección temprana. Representan la mayoría de los patógenos más significativos a nivel económico.

El daño a los tejidos del huésped puede ser directo o indirecto. Cuando el daño es directo, las células son dañadas y generalmente mueren como resultado de una producción de toxinas sintetizadas por el patógeno. Cuando el daño es indirecto, las células mueren o son dañadas debido a la interrupción de un proceso como la translocación o el movimiento de agua causado por la actividad patogénica en cualquier parte de la planta hospedera.

Debido a que las esporas de los hongos son relativamente resistentes a la desecación y a la radiación, los hongos patógenos pueden dispersarse por el aire a través de distancias considerables, a veces miles de kilómetros; algunas esporas requieren para su germinación agua líquida, o por lo menos, una humedad relativa muy alta en la superficie de la planta.

La posesión de un estado saprofitico es otra característica por la cual el hongo difiere de otros patógenos (Manners 1982).

Los hongos pueden causar una gran variedad de enfermedades a las plantas. Frecuentemente, en hongos patógenos de plantas hay entidades estructurales subespecíficas que atacan diversos huéspedes.

Las infecciones por hongos patógenos causan la reducción en el crecimiento de las plantas, la cual puede ser tan severa como para causar la muerte de la planta.

Muchas enfermedades de las plantas pueden manifestarse por un patrón característico o por el desarrollo de síntomas que generalmente se refieren como el síndrome de la enfermedad. El diagnóstico puede ser complicado, ya que las plantas son generalmente incapaces de exhibir todos los síntomas, además, causas diferentes pueden dar origen a síntomas similares, lo cual puede resultar en una confusión en la identidad de la enfermedad. (Ver tabla I).

### **L1 Síntomas de enfermedades en plantas**

Muchos patógenos fúngicos causan la producción de síntomas característicos en plantas huéspedes. La definición de dichos síntomas se usa generalmente en inspecciones para definir el grado de daño que ocurrió en un cultivo. Los síntomas que afectan relativamente poco a toda la planta deben ser considerados también cuando la mercadotecnia del producto se ve afectada en cuanto al ámbito económico, por ejemplo, en frutas o granos.

El desarrollo de los síntomas está influenciado por el ambiente y por la salud del huésped al momento de la infección. La velocidad con la cual el patógeno puede influir en la fisiología del huésped y por lo tanto, dar origen a síntomas, dependerá de la facilidad con la que las interacciones se inician y del curso que la enfermedad pueda tomar. En algunos casos, las plantas hospederas son pobladas rápidamente por el

patógeno (necrótrofos), pero en otros, la planta puede parecer no afectarse por los invasores (biótrofos) por algún tiempo antes de que se desarrollen los síntomas (Isaac 1991). Los síntomas que se presentan generalmente se exponen a continuación:

**Reducción en el crecimiento.-** Este se manifiesta como una reducción en el rendimiento total de un cultivo, por ejemplo, en frutos, granos, semillas, flores, etc. Varios de estos efectos se originan por la ruptura de tejidos fotosintéticos y de otros mecanismos fisiológicos (incremento en la velocidad de respiración, cambios en la relación de agua debidos a rupturas en la cutícula cuando el hongo esporula), como resultado de la invasión por parte del patógeno.

**Moho.-** Afecta un rango muy amplio de especies de plantas incluyendo cereales y otros cultivos, árboles y plantas de ornato. Los agentes que lo causan son parásitos obligados. El moho se propaga con mucha facilidad, ya que es llevado por el aire y es extremadamente común. El enmohecimiento ocurre como infecciones devastantes que causan desastres económicos en los cultivos. Las infecciones ocurren generalmente en tallos, vainas y hojas en una enorme variedad de plantas.

**Necrosis.-** El término necrosis se utiliza para describir la muerte de los tejidos que contienen células infectadas. Durante el desarrollo de la enfermedad, la necrosis puede extenderse y provocar rápidamente la muerte de toda la planta, o puede estar restringida a ciertas zonas. Puntos de necrosis aparecen en las hojas de las plantas infectadas como el resultado de muerte celular localizada. Un buen número de enfermedades causan la formación de regiones de necrosis, como por ejemplo, manchas en las hojas, destrucción del tejido, etc.

**Destrucción.-** El término destrucción se refiere a la enfermedad que causa ennegrecimiento de las hojas y de otros órganos de las plantas y que se aplica generalmente a infecciones que se extienden rápidamente.

**Humedecimiento.-** Puede afectar a todas las plantas, pero generalmente afecta con mayor facilidad a las semillas que no han germinado. Las infecciones iniciales aparecen como lesiones oscuras. Al hinchamiento de las células sigue su colapso, provocando rápidamente la muerte de toda la planta.

**Escabro.-** El término escabro es utilizado para describir lesiones necróticas superficiales que se forman como resultado de la invasión al huésped. En algunas infecciones estas lesiones van acompañadas por la formación de corcho debajo de la epidermis o por asociación del micelio fúngico. La epidermis generalmente se rompe para liberar las esporas fúngicas.

**Antracnosis.-** Es el nombre común de enfermedades de plantas caracterizadas por una lesión muy oscura y hundida que contiene esporas. En casos muy severos la necrosis producida puede extenderse a través de toda la hoja provocando deformaciones de la vaina.

**Manchas en las hojas.-** Pequeñas manchas de necrosis en las hojas pueden atribuirse a varias causas. Estas lesiones reducen efectivamente la capacidad de fotosíntesis y cuando el hongo esporula, la relación de agua puede ser alterada debido a una ruptura en la cutícula. Las manchas causan pequeños problemas en la planta a menos de que la infección sea muy severa, pero en términos económicos causan problemas debido al aspecto de la hoja.

**Úlceras.-** Lesiones necróticas hundidas pueden aparecer en los tejidos de las plantas y son llamadas úlceras. Estas áreas pueden estar rodeadas por un sobrecrecimiento del tejido de la planta, el cual ocurre como respuesta al efecto causado por la herida.

**Clorosis.-** Una numerosa cantidad de enfermedades hace que las hojas tomen una coloración amarillenta que se conoce como clorosis.

**Marchitamiento.**- Las condiciones de sequía resultan en la pérdida de la turgencia en hojas y puede resultar en que la planta llegue a marchitarse. A menos de que el suministro de agua sea restringido o prolongado, esta condición es reversible. La causada por la invasión de patógenos es generalmente irreversible y puede progresar y afectar a toda la planta con relativa rapidez.

**Tabla I. Clasificación taxonómica de los principales hongos patógenos de plantas.**

Divisiones y clases características	Ejemplos
<b>Mixomicota</b> (poseen plasmodium o pseudoplasmodium) Plasmodiophoromicetos -	<i>Plasmodiophora brassicae</i> (raíz de brassica club), <i>Polymyxa graminis</i> , y <i>P.betae</i> (patógenos de cereal y raíz)
<b>División Eumicota</b> (unicelular o micelio filamentoso) <b>Mastigomicotina</b> (produce zoosporas móviles) Oomicetos -	<i>Pythium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> (raíz, tallo), y <i>Phytophthora infestans</i> (destrucción de la papa). Moho ,por ejemplo, <i>Bremia lactucae</i> (lechuga) y <i>Plasmopara viticola</i> (vino).
<b>Ascomicotina</b> (esporas sexuales = ascosporas) Plectomicetos -	moho polvoso, por ejemplo <i>Erysiphe spp</i> (por ejemplo, <i>E graminis</i> (cereales)), <i>Podosphaera leucotricha</i> (manzana), <i>Uncinula necator</i> (vino)
Pirenomicetos -	<i>Ophiostoma ulmi</i> (destrucción del olmo), <i>Endothia parasitica</i> (destrucción de la castaña).
Discomicetos -	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (tallo y raíz), <i>Pyrenopeziza brassicae</i> (manchas leves en las hojas de la Brassica)
Loculoascomicetos -	<i>Ophiobolus graminis</i> (cereal), <i>Pyrenophora teres</i> (cebada), <i>Helminthosporium maydis</i> (destrucción de las hojas del maíz del sur).
<b>Deuteromicotina</b> (estado sexual ausente o desconocido) Coleomicetos -	<i>Ascochyta pisi</i> (destrucción del durazno), <i>Septoria tritici</i> (mancha en las hojas del trigo)
Hyphomicetos -	<i>Alternaria spp.</i> (manchas en las hojas y destrucción de éstas), <i>Botrytis cinerea</i> (moho gris), <i>Fulvia fulva</i> (moho en las hojas del tomate), <i>Fusarium spp</i> (putrefacción de la raíz)
<b>Basidiomicotina</b> (las esporas sexuales son basidiosporas) Hemibasidiomicetos -	<i>Ustilago spp</i> por ej. <i>U maydis</i> (causantes del hollín), <i>Hemileia vastatrix</i> (enmohece el café).
Hymenomicetos -	<i>Armillariella mella</i> (putrefacción de la raíz, hongo de la miel), <i>Chondrostereum purpureum</i> (ciruelo / hoja de cereza de plata).

## **II. Interacción Planta Patógeno**

Cualquier encuentro entre un patógeno y la planta hospedera dará inmediatamente origen a interacciones entre los dos individuos, estas interacciones comienzan cuando la espora se fija en la superficie de la planta o cuando el contacto hifal se hace con las raíces en el suelo, pero antes de que se establezca cualquier contacto fisiológico entre ambos. La secuencia de eventos que lo siguen involucra una serie de mecanismos integrados que dependen directamente de las propiedades y capacidades de ambos organismos involucrados. Como consecuencia, puede resultar, desde que no haya éxito en la penetración del huésped, a la alteración de la estructura y la función del huésped o hasta la muerte de la planta (Isaac 1991).

Para colonizar satisfactoriamente a un huésped en particular, el microorganismo debe desarrollar la habilidad de evadir a las barreras de defensa elaboradas por la planta para prevenir la infección. Una vez que dichas barreras se han roto, la planta susceptible ejerce presión para desarrollar nuevas respuestas que bloqueen la infección del patógeno. Después de una nueva respuesta de resistencia, el patógeno responderá nuevamente con otro mecanismo alternativo que restaure el estado de virulencia. Estas batallas dinámicas que se presentan resultan de la utilización de estrategias altamente específicas y extremadamente sofisticadas tanto por parte del patógeno como por parte del huésped (Knogge 1996).

Las colonizaciones subsecuentes generalmente involucran las penetraciones repetidas de paredes celulares y de enzimas extracelulares que pueden degradar la mayor parte de los componentes de las paredes celulares de las plantas. Estas enzimas son producidas por la mayor parte de los hongos patógenos de plantas.

Los procesos de penetración a través de los cuales los hongos ganan la entrada a los tejidos de la planta son eventos altamente complejos que en muchos casos involucran la

secreción de una mezcla de enzimas proteolíticas e hidrolíticas y cuya composición varía dependiendo del tipo de hongo del que se trate y del tipo de huésped al que se enfrente. Durante la penetración, las enzimas hidrolíticas y/o la respuesta de defensa generada por la planta, produce fragmentos de hongos y/o de pared celular de las plantas, llamados evocadores. Estos compuestos, que son generalmente oligosacáridos, pueden originar una respuesta general en contra del patógeno, lo que impide que penetre rápidamente. La elicitación o producción rápida de la respuesta de defensa por parte de la planta puede provocar que se impida o disminuya la respuesta al ataque del hongo.

### **II.1. Penetración por parte del hongo**

El hongo puede penetrar de diferentes maneras, de las cuales las más importantes son las que se mencionan a continuación.

**Heridas.-** Las heridas en la superficie de las plantas son ideales para la penetración del hongo. El daño puede influenciarse por el ambiente, actividades de animales e insectos, etc. y también puede producirse por factores inherentes a la planta, como por ejemplo, los sitios emergentes de la raíz. Estas áreas dañadas pueden exudar materiales, los cuales pueden funcionar como nutrientes para los hongos.

**Penetración directa.-** Está claro que la adhesión de invasores potenciales a las superficies de las plantas es importante. Algunas especies fúngicas producen vainas mucilaginosas, las cuales cubren a la hifa; además producen otras sustancias adhesivas que provocan un contacto más cercano, como por ejemplo, polisacáridos, glicoproteínas y polímeros como la hexosamina y los xilanos. Después del contacto entre un tubo germinal y la superficie de la planta. la penetración directa a la planta puede requerir una combinación con una fuerza mecánica, la cual necesita ser considerable y requiere de un ablandamiento previo de la cutícula.

**Mecanismos químicos de penetración.-** Ya que se aproximan a la pared celular, muchos hongos patógenos son capaces de producir ataques bioquímicos en los tejidos de la planta y en las células para, de esta manera, permitir una penetración extendida. Muchas interacciones complejas pueden ocurrir, lo cual resulta en un daño celular y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Pueden considerarse dos clases de armas bioquímicas: una, enzimas de alto peso molecular capaces de degradar la pared celular huésped y que provocan la ruptura de células epidérmicas al contacto, provocando la maceración del tejido. El segundo tipo de armas es la producción de toxinas de bajo peso molecular, las cuales matan a las células en el avance de la invasión de la hifa en los tejidos del huésped.

El estado en el que el patógeno está presente en la superficie del huésped, pero en el que todavía no ha penetrado, es conocido como la fase de penetración, que es seguida por el establecimiento y la invasión al huésped. (Manners 1982).

#### **Fase de penetración:**

Antes de que una espora pueda germinar, se deben cumplir ciertos requisitos, algunos internos y algunos externos.

Latencia: Muchas esporas resistentes son incapaces de germinar por un cierto periodo después de su formación. En algunos casos la latencia puede ser rota en algún momento por un tratamiento específico ya sea químico o físico. En otros, nada puede inducir a las esporas a germinar antes de que haya pasado un periodo determinado.

Estimulación e inhibición de la germinación: Además de varios factores como la latencia, existe una larga lista de factores que han sido demostrados como estimuladores o inhibidores de la germinación de las esporas. Los factores físicos son quizás los más importantes, ya que en ciertas ocasiones, si no se cumplen, la germinación simplemente no ocurre.



### **Fase de establecimiento:**

Crecimiento en la superficie del huésped: La extensión a la cual el microorganismo crece a través de la superficie del huésped es muy variable.

Es muy probable que todos los hongos patógenos de plantas hagan uso de enzimas extracelulares que son secretadas en diversas situaciones de ataque a sus huéspedes. En hongos necrótrofos la producción de toxinas en grandes cantidades mata a los tejidos del huésped; finalmente, éstos son invadidos y los hongos se alimentan de ellos, esta fase sería la denominada de **invasión al huésped**.

### **III. Mecanismos de resistencia a patógenos**

El reconocimiento de un patógeno en el sitio de la infección involucra procesos de señalización a nivel celular y sistémico que tienen como propósito la activación de respuestas de defensa con multicomponentes tanto a nivel sistémico como local, y estas respuestas conducen a un establecimiento rápido de resistencia local y al desarrollo ulterior de la denominada resistencia sistémica adquirida (Scheel 1998). En muchos casos la respuesta probablemente se inicia con la interacción de evocadores que actúan como ligandos de moléculas específicas o receptores a nivel de membrana plasmática o bien a nivel de citosol en la membrana de la planta.

Algunos de los mecanismos de resistencia son:

- 1) La manera en como la planta resiste la entrada y propagación del patógeno depende de la estructura y potencialidad bioquímica de ambos, huésped y patógeno y de la ruta de entrada e invasión al huésped. Algunas barreras se presentan en las plantas saludables que no han sido atacadas, y se conocen como barreras preformadas, otras se forman solamente cuando el patógeno trata de penetrar o invadir y son llamadas barreras inducidas.

**Fase de establecimiento:**

Crecimiento en la superficie del huésped: La extensión a la cual el microorganismo crece a través de la superficie del huésped es muy variable.

Es muy probable que todos los hongos patógenos de plantas hagan uso de enzimas extracelulares que son secretadas en diversas situaciones de ataque a sus huéspedes. En hongos necrótrofos la producción de toxinas en grandes cantidades mata a los tejidos del huésped; finalmente, éstos son invadidos y los hongos se alimentan de ellos, esta fase sería la denominada de **invasión al huésped**.

**III. Mecanismos de resistencia a patógenos**

El reconocimiento de un patógeno en el sitio de la infección involucra procesos de señalización a nivel celular y sistémico que tienen como propósito la activación de respuestas de defensa con multicomponentes tanto a nivel sistémico como local, y estas respuestas conducen a un establecimiento rápido de resistencia local y al desarrollo ulterior de la denominada resistencia sistémica adquirida (Scheel 1998). En muchos casos la respuesta probablemente se inicia con la interacción de evocadores que actúan como ligandos de moléculas específicas o receptores a nivel de membrana plasmática o bien a nivel de citosol en la membrana de la planta.

Algunos de los mecanismos de resistencia son:

- 1) La manera en como la planta resiste la entrada y propagación del patógeno depende de la estructura y potencialidad bioquímica de ambos, huésped y patógeno y de la ruta de entrada e invasión al huésped. Algunas barreras se presentan en las plantas saludables que no han sido atacadas, y se conocen como barreras preformadas, otras se forman solamente cuando el patógeno trata de penetrar o invadir y son llamadas barreras inducidas.

**III.1. Barreras preformadas.** Para cualquiera de las rutas por las cuales los patógenos entran a la planta, ésta puede construirse una barrera o forma de evitar la entrada del patógeno, esta defensa puede ser selectiva para ciertas especies de plantas (Manners 1982). A continuación se describen algunos tipos de barreras preformadas.

- a) **Cutícula y pared celular:** Una cutícula gruesa, generalmente reforzada por una pared celular gruesa, puede prevenir la penetración de un patógeno capaz de penetrar una cutícula más delgada.
- b) **Estomas.-** Se han obtenido correlaciones entre los tipos particulares de estructuras de estomas y la resistencia a la entrada. La resistencia funcional debe jugar un papel en la reducción a la susceptibilidad a la invasión por parte de cualquier hongo.
- c) **Lenticelas.-** La apertura de las lenticelas provee una ruta de entrada de los patógenos a ciertos órganos de la planta. Si la lenticela se cierra por la producción de una barrera, la penetración se ve inhibida frecuentemente.
- d) **Órganos florales.-** Los estigmas y ovarios de las plantas en germinación proveen un canal de entrada para ciertos patógenos. El estigma de la planta y el estilo del tejido pueden inhibir el crecimiento del hongo.

### **III.2. Barreras mecánicas inducidas**

Se pueden producir varios tipos de barreras mecánicas en respuesta a la infección por un patógeno en particular, éstas dependen de la naturaleza del patógeno y del huésped. La reacción de la planta al ataque del patógeno es generalmente similar a la que se da en diferentes especies después de haber un daño mecánico. Las células involucradas mueren y las células que se encuentran alrededor comienzan a sintetizar diferentes sustancias como la suberina, ligninas, gomas, taninos, etc. Esta barrera se forma dentro

de las primeras 24 horas o cuando se trata de un daño muy extenso. Unos días después se inicia un cambio en el lugar que fue dañado y se forma un tejido más grueso y resistente.

El hongo prolifera lentamente en los cultivos resistentes, presumiblemente produciendo bajas concentraciones de los metabolitos relevantes y rápidamente en los cultivos susceptibles, produciendo altas concentraciones de sus metabolitos.

Cuando la hifa trata de penetrar a la célula, ésta algunas veces reacciona produciendo la deposición de una sustancia específica alrededor de la hifa invasora, originando una vaina que es similar al material de la pared celular invaginada dentro de las células. El estímulo puede ser físico, químico o ambos. La efectividad de esta vaina en delimitar el crecimiento de la hifa varía. La mayoría de éstas vainas contienen celulosa y callosa y generalmente están impregnadas con algunos de los constituyentes de la lignina.

2) Uno de los mecanismos más efectivos de las plantas para contender contra el patógeno es la producción de sustancias tóxicas. Como en los mecanismos de resistencia mecánica, algunas de éstas sustancias químicas son compuestos formados previamente en las plantas sanas, sin embargo, también se forman otros compuestos en respuesta al ataque por parte del patógeno.

### **III.3 Sustancias preformadas**

Ocasionalmente se producen por la planta como exudados que pueden inhibir el desarrollo del patógeno antes de que éste pueda siquiera penetrar a la planta.

Los factores de resistencia preformados deben ser más tóxicos al patógeno que al huésped, o deben estar confinados físicamente o unidos químicamente, para que de esta manera la toxina no dañe los tejidos del huésped.

Como ejemplos se tienen los siguientes:

- El ácido clorogénico inhibe la germinación de esporas a concentraciones similares a aquellas que tiene una planta joven.
- La arbutina es un ejemplo de un compuesto no tóxico, que cuando se hidroliza da origen a una hidroquinona tóxica.

#### **III.4. Sustancias producidas como respuesta al ataque por patógenos (fitoalexinas)**

Las sustancias que no están presentes en las plantas saludables que no han sufrido ningún ataque, pero que se producen cuando el huésped es atacado por un patógeno y que resultan tóxicas para los patógenos, se conocen como fitoalexinas. Las fitoalexinas son compuestos orgánicos de una composición química variable y su actividad antifúngica o antibacteriana es usualmente poco específica (Hammond-Kosack y Jones 1996).

Existen diversos mecanismos por medio de los cuales un patógeno puede ser capaz de inhibir la acción de la producción de una fitoalexina.

- 1) El huésped puede producir cantidades tan pequeñas de fitoalexina cuando es inoculado con ese patógeno o cuando es inoculado con cualquier otro patógeno.
- 2) Un patógeno exitoso puede ser menos sensible a la fitoalexina que un microorganismo no patógeno.
- 3) Una cepa patógena puede ser capaz de inactivar una fitoalexina.

Algunas de las fitoalexinas más importantes y las principales plantas que las producen se encuentran en la Tabla II.

**Tabla II. Fitoalexinas importantes y plantas que las producen**

FITOALEXINA	PLANTA QUE LA PRODUCE
Ácido clorogénico	<i>Solanum tuberosum</i>
Hidroxihaesolina	<i>Glycine max</i>
Kievitona	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Faesolina	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Fituberina	<i>Solanum tuberosum</i>
Fistaina	<i>Pisum sativum</i>
Rishitina	<i>Solanum tuberosum</i>

### III.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción de especies reactivas de oxígeno juega un papel clave en la defensa de las plantas (Hammond-Kosack et al.1996). Uno de los mecanismos es la generación de  $O_2^-$ , el cual se transforma rápidamente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), éste puede atravesar fácilmente las membranas biológicas debido a que no tiene carga (Fig.1). Ambos,  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  son moderadamente reactivos, sin embargo, el daño celular que producen parece deberse a su conversión en especies más reactivas.

El peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico en combinación, son necesarios y suficientes para la activación de genes de defensa y la inducción de una muerte celular programada (Scheel 1998). Se cree que el  $H_2O_2$  puede difundir intercelularmente y así propagar la señal de alerta - defensa en el tejido.

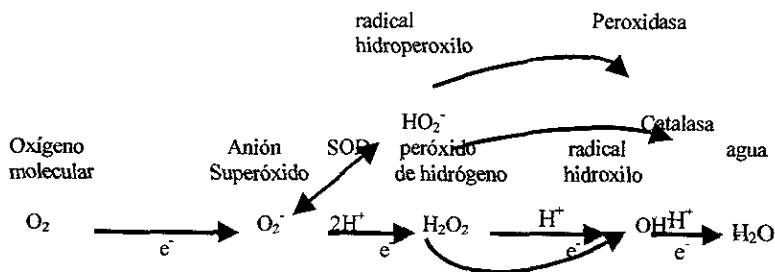


Figura 1. Interconversión de los diferentes ROS y las enzimas involucradas. Tomada de Hammond-Kosack y Jones (1996).

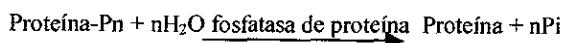
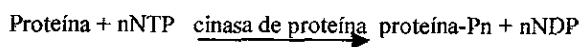
### III.6 Cinasas de proteínas:

Las cascadas de fosforilación están involucradas en señales de defensa a diferentes niveles. Algunos genes de resistencia de plantas codifican para proteínas receptoras con función de cinasas, las cuales activan una serie de señales mediante la fosforilación específica de proteínas específicas (Scheel 1998).

El tipo más común de modificación reversible de las proteínas es la fosforilación. La naturaleza ha elegido la fosforilación-defosforilación como uno de los mecanismos más usados para regular la función de las proteínas, no solamente la que se despliega a través de la actividad enzimática, sino también la de proteínas involucradas en otros procesos biológicos.

#### 6.a. Propiedades Generales

Las reacciones de la fosforilación-defosforilación de las cinasas de proteínas y de las fosfatasa de proteínas se muestran a continuación:



En donde NTP y NDP corresponden a nucleósidos tri o difosfatados.

Una cinasa de proteínas específicas generalmente cataliza la transferencia de un grupo fosfato a más de un sitio en el sustrato (proteína) y que generalmente es un residuo de treonina, serina o tirosina.

En las reacciones de fosforilación de proteínas es común que una proteína sirva como sustrato para varias cinasas. En algunos casos, las diferentes cinasas catalizan la fosforilación de sitios idénticos en el sustrato de la proteína, pero comúnmente cada cinasa tiene su sitio de preferencia, ya que éstas muestran un grado moderado de especificidad para ciertas secuencias de aminoácidos. La fosforilación de un sitio idéntico por dos o más cinasas de proteínas probablemente ocurre debido a un alto grado de exposición de ese sitio, combinado con el hecho de que las cinasas de proteínas no poseen una especificidad absoluta.

Las cinasas de proteínas constituyen un grupo muy diverso de enzimas cuya actividad es comúnmente regulada a través de su interacción con segundos mensajeros como el calcio (Xing et al. 1996), mismos que son generados en las células en respuesta a hormonas y otros agentes extracelulares. Las reacciones catalizadas por cinasas requieren iones metálicos divalentes como el  $Mg^{++}$  y se regulan a través de la interacción de metabolitos con sus sustratos.

6.b. Especificidad para los donadores de fosfato en las reacciones de las cinasas de proteínas

Se ha descrito que la reacción de las cinasas de proteínas es dependiente de un nucleósido trifosfatado. El donador en casi todas las situaciones es el ATP.

6.c. Reacciones de autofosforilación

Casi todas las cinasas de proteínas catalizan reacciones de autofosforilación en donde la cinasa funciona como su propio sustrato. Las reacciones de autofosforilación pueden ser intramoleculares o intermoleculares. En algunas, particularmente en aquellas en las



que la autofosforilación ocurre por un proceso intermolecular en donde no ocurre un cambio funcional en la actividad de la cinasa como resultado de la autofosforilación, la reacción puede ser simplemente la expresión de la deficiencia de una especificidad absoluta por parte de la cinasa de proteína. La autofosforilación se observa utilizando altas concentraciones de cinasas, aunque la enzima sea extremadamente pobre como sustrato para sí misma.

Un posible significado de las reacciones de autofosforilación de las cinasas de proteínas es que la mayoría de estas enzimas pueden conservarse en un estado inactivo o inhibido, como resultado de la interacción entre sus sitios de autofosforilación y los sitios en donde se enlazan sus sustratos proteicos. Para algunas cinasas de proteínas, cuando un sitio funcional de autofosforilación está ausente, en su lugar están presentes sitios de pseudofosforilación. Para dichas enzimas la activación es dependiente de activadores que alteran la conformación de la cinasa y que causan un desplazamiento del Pi desde los sitios de pseudosustrato hasta los centros activos de estas enzimas (Boyer y Krebs 1986).

#### 6.d. Sistemas cíclicos de cascadas

La modificación covalente de las enzimas es catalizada por otras enzimas como las cinasas y las fosfatasas. Éstas involucran la acción de una enzima sobre otra y por ello, son referidas como sistemas en cascada. Tales sistemas pueden dividirse en dos clases: cascadas unidireccionales y cascadas cíclicas.

Las cascadas unidireccionales son cascadas irreversibles y generalmente están involucradas en hendiduras proteolíticas de un enlace peptídico específico, por ejemplo, la cascada de la coagulación sanguínea. Las vías que son designadas como amplificadores son aquellas que, en respuesta a algunas señales de alarma, generan una avalancha de productos requeridos para satisfacer cambios biológicos específicos.

Cuando la necesidad finaliza, las cascadas se detienen. Por lo tanto, las cascadas unidireccionales son sistemas de contingencia que sirven como interruptores biológicos que pueden ser encendidos para afrontar situaciones de emergencia.

En contraste, las cascadas cíclicas involucran la derivatización de uno o más residuos específicos de aminoácidos dentro de la proteína. Estas derivatizaciones de enzimas son procesos cíclicos que resultan del acoplamiento de dos cascadas opuestas: una que concierne a la modificación covalente y la otra con la no modificación de una enzima interconvertible.

Las propiedades de las cascadas cíclicas muestran que éstas poseen características únicas que proveen a la célula de la capacidad de regular y coordinar una multitud de vías metabólicas.

Se ha propuesto que la modificación covalente de las enzimas no funciona simplemente como un encendido y apagado para varias vías metabólicas, sino que éstas son parte de un proceso dinámico en donde las actividades fraccionales de las enzimas interconvertibles pueden variar dentro de un amplio rango.

El modelo de la cascada cíclica se deriva de un acoplamiento de una cascada que va hacia adelante y de otra en reversa (Fig.2). La cascada que va hacia adelante involucra la activación de una enzima convertidora inactiva, cinasa de proteínas (PK), por medio de un efector alostérico ( $e_1$ ). La enzima convertidora activada,  $PK_a$ , cataliza entonces la modificación (fosforilación) de la enzima interconvertible a partir de su forma no modificada S, hacia su forma modificada S-P; en la cascada reversa, la enzima convertidora inactiva  $PK_i$ , se activa por un efector alostérico  $e_2$ , y la enzima convertidora activa cataliza la no modificación (defosforilación) de la enzima interconvertible S-P, hacia su forma no modificada.



El análisis cuantitativo de las cascadas cíclicas revela que están dotadas de una capacidad enorme para la *amplificación de las señales*. Como resultado, pueden responder como efectores primarios, pueden modular la amplitud de la respuesta máxima de una enzima interconvertible, pueden funcionar a concentraciones de saturación de efectores alostéricos, pueden realzar la sensibilidad de la modificación de una enzima interconvertible ante cambios en las concentraciones de los efectores alostéricos; son capaces de estimular la cooperatividad aparente positiva o negativa en respuesta al aumento en las concentraciones de los efectores alostéricos, sirven como sistemas de integración biológica que pueden estimular fluctuaciones simultáneas en las concentraciones intracelulares de numerosos metabolitos y ajustan la actividad específica de las enzimas interconvertibles; son altamente flexibles con respecto a la regulación alostérica y son capaces de exhibir una variedad de respuestas a estímulos alostéricos primarios, sirven como amplificadores de velocidad y son capaces de responder extremadamente rápido a cambios en los niveles de metabolitos.

Muchas cinasas de proteínas existen en formas latentes o inactivas y requieren la unión de un regulador alostérico específico o la fosforilación por otra cinasa de proteínas para llevar a cabo su actividad. Algunas veces las cinasas de proteínas se encuentran inactivas porque parte de su estructura bloquea el acceso hacia el sitio activo y actúa autoinhibitoriamente. Ésta región se conoce con el nombre de pseudo sustrato porque su enlace es en la región del sitio activo. La activación de la cinasa de proteínas se lleva a cabo removiendo al pseudo sustrato del sitio activo y permitiendo el acceso del sustrato. Ésta forma de regulación se conoce como *regulación intraestérica* para enfatizar que ocurre en el sitio activo, y la interacción del pseudosustrato se vincula con la estructura del sustrato (Woodgelt 1994).

Ambos, la regulación del pseudosustrato y el reconocimiento del sustrato están íntimamente interrelacionados. La regulación intraestérica representa cualquier cambio en la región del sitio activo que modifica las propiedades cinéticas de la enzima; éstas pueden incluir fosforilación en el sitio activo (fosforilación intraestérica). Los eventos de fosforilación que ocurren lejos del sitio activo son referidos como eventos de fosforilación *extraestéricos*.

#### 6. e. Fosforilación de proteínas en plantas.

En plantas se ha observado que las cinasas fosforilan diversas proteínas, incluyendo a la ATPasa de membrana plasmática (Lino et al. 1998; Suzuki et al. 1992; Xing et al. 1996 ). Lino et al. (1998) demostraron que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática de raíces de remolacha se inhibe por una fosforilación estimulada por calcio. Xing et al. (1996) investigaron la interacción entre un moho patógeno (*C.fulvum*) y el tomate y llegaron a la conclusión de que uno de los mecanismos de modificación de la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática era su fosforilación/defosforilación reversible, también atribuyeron la estimulación del proceso de fosforilación/defosforilación a la presencia de calcio; finalmente, Suzuki et al. (1992) demostraron que la siringomicina estimula *in vitro* la fosforilación de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática del tejido de remolacha roja (*Beta vulgaris* L.).

Varias respuestas de las plantas hacia el estrés ambiental, luz, fitohormonas y ataques por patógenos, son mediadas por cambios en la concentración citoplásmica de calcio libre. Los aumentos en las concentraciones de calcio libre son captados por proteínas enlazadas al calcio. Además de la calmodulina se han encontrado en las plantas cinasas de proteínas dependientes de calcio pero independientes de calmodulina

(CDPKs) y se ha demostrado que juegan un papel importante como mediadoras de la respuesta por parte del calcio hacia diversos estímulos (Iwata et al. 1998).

Se ha observado que existe una fosforilación de proteínas a nivel de membrana plasmática en plantas que son activadas por concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y se fosforilan en residuos de serina y muy pocas de ellas en residuos de treonina. Estas características son similares a aquellas cinasas de proteínas dependientes de calcio que han sido purificadas en soya. La presencia de una actividad de cinasas de diferentes pesos moleculares, puede indicar que se trata de diferentes cinasas de proteínas con características similares (Verhey et al. 1993).

La fosforilación de proteínas mediada por cinasas es una de las modificaciones proteicas covalentes que se llevan a cabo para el control de la estructura / actividad y funcionamiento de enzimas y otras proteínas. Las cinasas de proteínas se han encontrado en muchos compartimentos celulares y sirven para diversas funciones, desde la modificación post-transduccional de las proteínas hasta ser componentes en la transducción de señales y su amplificación (Hunter 1991). En plantas, los polipéptidos capaces de actuar como cinasas se han identificado en el citosol, en el núcleo, en mitocondrias, y en las membranas plasmáticas (Ranjeva and Boudet 1987).

No se ha establecido cómo las cinasas de proteínas de la membrana plasmática de plantas se involucran en la transducción de señales a través de la membrana plasmática, pero se han reportado cambios en la actividad de las cinasas de proteínas o en la

fosforilación de proteínas que han sido correlacionados con la aplicación de estímulos extracelulares (Verhey et al. 1993)

En comparación con la gran cantidad de datos obtenidos de células animales, la información sobre la fosforilación de proteínas en plantas todavía no está muy clara. Existe una hipótesis que plantea que las plantas tienen que responder rápidamente a cambios en las condiciones ambientales y por ello traducir estímulos externos vía respuestas bioquímicas (Ranjeva et al. 1984).

Los diferentes pasos del esquema propuesto se ilustran en la fig. 3.

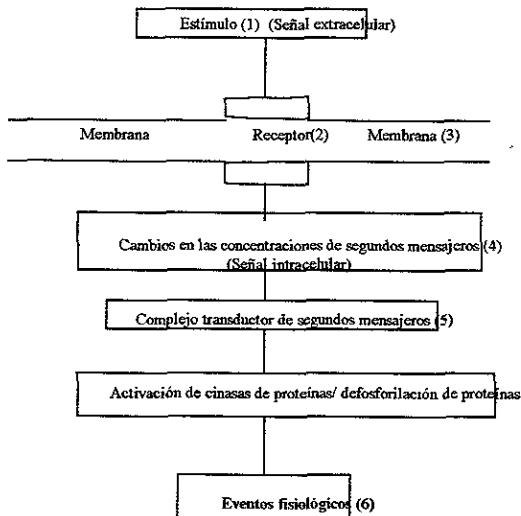


Fig. 3.- Conversión de estímulos en respuestas bioquímicas y fisiológicas. Tomada de Ranjeva et al. 1984.

El estímulo (1) puede ser la luz, mensajeros químicos y hormonales, incluyendo señales del ambiente biótico de la planta (por ejemplo evocadores).

La percepción del estímulo inicial puede involucrar a receptores ligados a la membrana que se sensibilizan de alguna manera (2) a nivel de membrana (3).

El  $\text{Ca}^{++}$  citoplásmico puede variar en un amplio rango de concentraciones en respuesta a varios estímulos (4). Como consecuencia de procesos dependientes de calcio, incluyendo la fosforilación de proteínas, puede ser modificado rápidamente.

Una molécula capaz de ser sensible a pequeñas variaciones en la concentración de segundos mensajeros es referida como un transductor (5). Su principal función es enlazar al mensajero para formar un complejo reversible.

Los eventos bioquímicos y fisiológicos que pueden ser controlados a través de la fosforilación reversible de proteínas son múltiples en naturaleza (6). Debido a la modificación de cargas eléctricas provocadas por la adhesión o liberación de residuos de fosforilo se lleva a cabo un cambio en el arreglo molecular del complejo sustrato-proteína. Dicha variación puede provocar cambios en la localización subcelular, la asociación-disociación con moléculas reguladoras, o la activación-desactivación de enzimas. Además de estos procesos descritos, las modificaciones post-transduccionales pueden conducir a un cambio en la sensibilidad de efectores de bajo peso molecular. También pueden involucrarse en el control del flujo de los iones a través de los canales iónicos, o en interacciones del DNA con proteínas nucleares.

### **III.7 Calcio y canales iónicos:**

El calcio es un regulador importante de los procesos biológicos; se ha demostrado que su ausencia extracelular afecta a una amplia variedad de procesos. Se ha propuesto que el  $\text{Ca}^{++}$  puede ser requerido para procesos de fosforilación (Boyer y Krebs 1986).



Es conocido que el  $\text{Ca}^{++}$  existe en bajas concentraciones en el citoplasma de las células que no se encuentran activadas por algún estímulo o señal. Una variedad de estímulos extracelulares apropiados sobre una célula en particular, da como resultado un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  citoplásmico y un inicio de respuestas que son dependientes de  $\text{Ca}^{++}$ . Los dos segundos mensajeros, AMPc y  $\text{Ca}^{++}$  pueden, ambos, afectar una respuesta celular (la función celular puede estar regulada por uno o ambos de estos sistemas en los que participan dichos segundos mensajeros)

Existen varias proteínas que son capaces de unir calcio, la más importante de éstas es la calmodulina, la cual se encuentra en la mayoría, si es que no en todas, las células eucariotes, mediando el control del contenido de  $\text{Ca}^{++}$  de un gran número de enzimas. Estas dos propiedades generales confieren a la calmodulina el papel de mediador de varios procesos celulares dependientes de calcio. Se sabe que la calmodulina activa distintas cinasas de proteínas (Boyer y Krebs 1986).

En respuesta hacia una señal apropiada, se ha propuesto que los niveles de calcio citoplásmico aumentan transitoriamente y esto modula la actividad de otras enzimas como las cinasas de proteínas (Fig.4) (Larsson 1990)

Un modelo propuesto en el cual se encuentra implicado el calcio es el siguiente:

El modelo propone que un estímulo primario interacciona con un receptor específico a nivel de la membrana plasmática. Esta interacción causa un aumento en la concentración del nivel libre de  $\text{Ca}^{++}$  en el citoplasma mediante influjo de calcio en la membrana plasmática y/o una liberación de  $\text{Ca}^{++}$  almacenado intracelularmente. Este influjo amplifica el estímulo por parte de los receptores y por ende, la señal; por lo tanto, el aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  citoplásmico modula una gran variedad de procesos dependientes de  $\text{Ca}^{++}$ , como la fosforilación de las proteínas directamente o la formación de un complejo con otras proteínas reguladoras como la calmodulina.

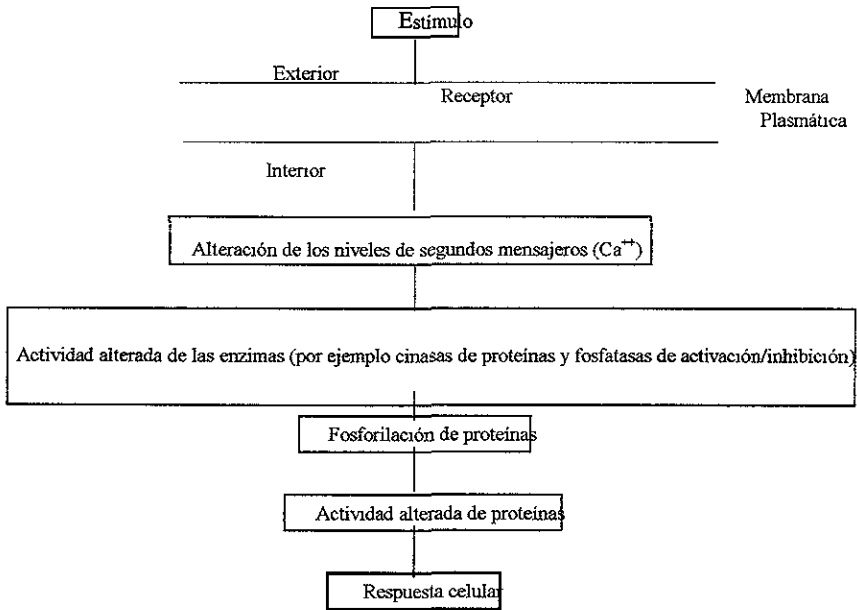


Figura 4. Activación de una respuesta celular mediada por calcio (Tomado de Larson 1990).

### III.8. Respuesta a evocadores.

Las reacciones en la etapa temprana de las células de las plantas ante la presencia de evocadores incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, permitiendo el movimiento de iones como en la entrada de calcio y protones y la salida tanto de cloruro como de potasio. Aparentemente, el enlace del evocador con su receptor, aumenta la probabilidad de que se abran canales iónicos localizados en la membrana plasmática, llegando por ejemplo a aumentar los niveles de calcio a nivel de citosol, así como promueve la activación de canales de iones adicionales y de bombas que causan otros flujos de iones (Knogge 1996).

### III. 9 Respuesta de Hipersensibilidad

La respuesta de hipersensibilidad (HR) es elaborada por la planta como respuesta a la invasión por toda clase de patógenos (Larsson 1990). Se presenta comúnmente y está asociada con la resistencia activa por parte del huésped; ésta está definida como la muerte de células del huésped después de unas cuantas horas de que se tuvo contacto con el patógeno (Hammond-Kosack et al. 1996) y se presenta como una consecuencia de incompatibilidad entre el huésped y el patógeno. Sin embargo, hay una serie de eventos moleculares conocidos o causantes de la HR, entre los que se incluyen la producción de ROS y la acción de cinasas. En muchas ocasiones, la activación de la HR provoca la muerte celular en el sitio de infección, lo cual resulta en la restricción al crecimiento o a la invasión del patógeno a áreas pequeñas, mismas que rodean inmediatamente a las células infectadas inicialmente. A nivel de toda la planta, la HR se manifiesta como pequeñas lesiones con necrosis. Las células infectadas pierden rápida y repentinamente la permeabilidad de su membrana y su turgencia, aumentan su actividad respiratoria y acumulan compuestos fenólicos y fitoalexinas. Un aumento en las reacciones de oxidación y una disminución en las reacciones de reducción dan como resultado la necrosis mencionada con anterioridad. El número de células afectadas por la HR es solamente una pequeña fracción de toda la planta, sin embargo, ésta respuesta contribuye a que la planta sobreviva al ataque del patógeno. Por ello, se ha propuesto que la HR juega un papel importante en la resistencia a enfermedades.

Cuando existe un contacto entre el patógeno y su huésped, se disparan cambios bioquímicos asociados con la hipersensibilidad debido a la adhesión entre las superficies externas de la hifa invasora del hongo y la membrana plasmática del huésped. En una reacción incompatible, los determinantes en la superficie del invasor, que son más probablemente componentes de la pared de la hifa, inician los primeros

eventos de la respuesta de hipersensibilidad. La síntesis de fitoalexinas se dispara entonces en las células adyacentes a las que sufrieron el daño (Fig.5). Se ha sugerido que en reacciones compatibles, las moléculas inhibidoras específicas actúan como supresores bloqueando el reconocimiento en la planta hospedera y previniendo el progreso de la respuesta de hipersensibilidad. El modelo propuesto de como se van dando este tipo de interacciones y cambios se expone en la Fig.5.

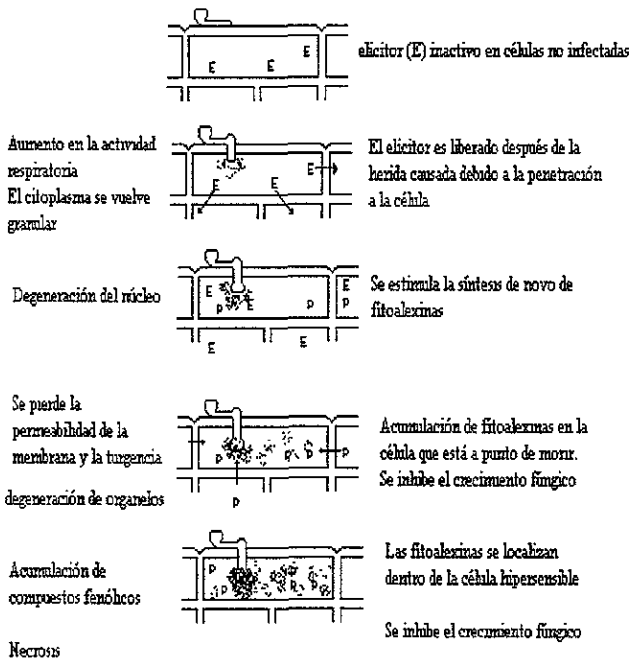


Figura 5. Activación de la Respuesta de Hipersensibilidad y su relación con la producción de fitoalexinas.

#### **IV. Fitotoxinas y su acción sobre la planta hospedera**

Una vez internalizado en la planta, ¿cómo es que el hongo puede causar una enfermedad? Parte de los síntomas resultan del efecto de productos del metabolismo secundario como las toxinas generadas por el hongo.

Las toxinas pueden ser definidas como productos microbianos que dañan directamente a la planta y que están involucradas en el desarrollo de la enfermedad, interrumpen los procesos fisiológicos del huésped, dando origen a síntomas como el debilitamiento y pueden causar necrosis.

Las micotoxinas producen efectos dramáticos en la salud de animales de granja y en humanos que se alimentan de productos agrícolas que se encuentran contaminados (Nelson et al. 1993). Algunas interrumpen procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración y el movimiento de agua.

Algunos de los factores involucrados en la aparición de una toxicosis en animales o humanos (micotoxicosis) causada por un hongo patógeno en una planta, son:

- a) La infección de una planta hospedera que es susceptible a una micotoxicosis producida por un hongo.
- b) Factores ambientales que sean favorables al desarrollo de la enfermedad.
- c) Capacidad genética del patógeno para producir uno o varios metabolitos tóxicos para el ser humano y/o animales.
- d) Condiciones ambientales favorables a la producción y acumulación de cantidades suficientes de metabolitos tóxicos en la planta enferma para causar toxicosis al consumidor.
- e) El consumo de cantidades suficientes de aquella planta que contenga toxinas por un consumidor susceptible.

Algunas toxinas fúngicas, llamadas toxinas selectivas del huésped (HSTs), parecen ser específicas para especies de plantas en particular. Estas toxinas son compuestos de bajo peso molecular con diversas estructuras que actúan como agentes positivos de virulencia y patogenia; la mayoría son metabolitos secundarios. Algunos ejemplos de estas toxinas son: fusicocina, tricoteceno, coronatina, etc. La mayoría de estas toxinas son producidas principalmente por dos géneros: *Alternaria* y *Cochilobolus* (Walton 1996).

*Fusarium moniliforme* es uno de los hongos más asociados con la contaminación de granos consumidos en la dieta tanto de animales como de humanos, como por ejemplo el maíz. *Fusarium moniliforme* lleva a cabo la síntesis de las fumonisinas, las cuales causan una contaminación del maíz provocando un alto riesgo de toxicidad tanto para el ser humano como para los animales; la manifestación más dramática de la "enfermedad del maíz mohoso" es la leucoencefalomalacia, una enfermedad fatal de caballos, burros, mulas y conejos (Desjardins y Hohn 1997). Las fumonisinas también son capaces de causar daño a nivel hepático y renal en una gran variedad de animales de investigación. Las enfermedades asociadas con el consumo de fumonisinas son varias y las más importantes son: la leucoencefalomalacia equina, el edema pulmonar porcino y el cáncer hepático.

Se ha demostrado que varias especies del hongo del género *Fusarium* sintetizan diversas clases de compuestos que son fitotóxicos, éstos incluyen al ácido fusárico, la moniliformina, las eninantinas, los tricotecenos y las fumonisinas (Doehlert et al. 1994).

Las fumonisinas son polialcoholes aminados, estructuralmente similares a los esfingolípidos, su blanco molecular mejor conocido en la célula es la esfingosina N-

acetil transferasa, la cual al ser inhibida produce un efecto de acumulación de bases esfingoideas tóxicas (Fig 6) (Desjardins et al. 1997). Se ha demostrado que la esfingosina inhibe a la proteína cinasa C *in vitro* en células intactas, afecta los sistemas de transporte de iones, inhibe a la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; para la mayoría de las células que se han estudiado, la esfingosina es un inhibidor del crecimiento y es citotóxica. (Merrill 1994)

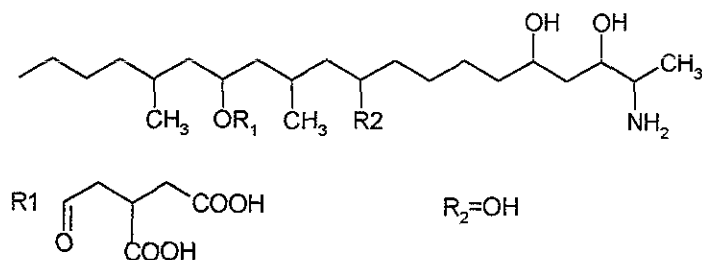


Fig. 6. Estructura de la Fumonisinina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>)

Existen varios tipos de fumonisinas, entre los cuales se encuentran la fumonisina A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>, aunque la que se encuentra en mayor proporción es la FB<sub>1</sub>.

Se han encontrado fumonisinas inclusive en maíz de buena calidad en los Estados Unidos, pero éstas se encuentran en una baja concentración; en maíz asociado a enfermedades en animales o en humanos la concentración de fumonisinas es más alta (Nelson 1993). En muchos países no desarrollados, incluyendo México, se han encontrado niveles altos de fumonisina en cereales almacenados como el maíz.

Se ha demostrado que la fumonisina B<sub>1</sub> causa efectos en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y el crecimiento de la raíz de semillas de maíz en proceso de germinación. (Doehlert et al 1994).

## V. Membrana plasmática

La célula de la planta consiste en un número de organelos y sistemas de membranas incluyendo a los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, Golgi, retículo endoplásmico, una variedad de vesículas más o menos bien definidas y un núcleo, todos embebidos en el citoplasma y encerrados por una membrana plasmática, la cual está rodeada por una pared celular. Mientras que la pared celular tiene una relativa rigidez confiriendo estabilidad y protección a la célula en contra de algún daño mecánico, la membrana plasmática provee una barrera dinámica pero estable para contener al metabolismo intracelular, llevando a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y su entorno.

Todas las membranas de la célula tienen la misma estructura que consiste en una bicapa lipídica en donde se encuentran embebidas proteínas. La porción transmembranal de éstas proteínas embebida en la bicapa lipídica es hidrofóbica, mientras que la porción expuesta a cada lado de la membrana es hidrofílica (Fig. 7).

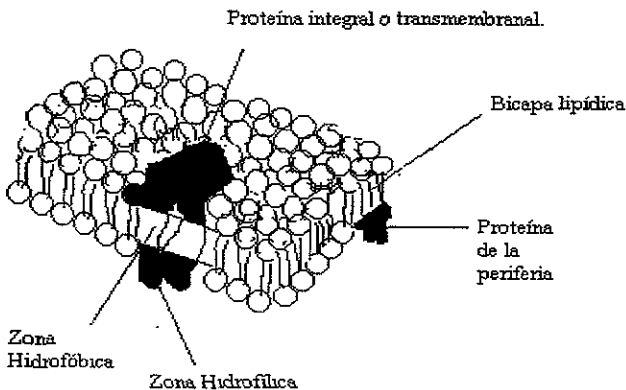


Figura 7. Estructura de las membranas biológicas (Tomada de Raven 1992)



Las dos monocapas de la membrana pueden diferir considerablemente en los tipos de componentes. Existen dos tipos de lípidos en la membrana plasmática de las células de las plantas: fosfolípidos (son los más abundantes), esfingolípidos y esteroides (en particular estigmasterol, el cual es el esteroide más abundante en los tejidos animales). Las dos capas de la bicapa lipídica tienen diferentes concentraciones de cada uno (Raven, 1992). Además, las proteínas transmembranales tienen estructuras asimétricas en la bicapa lipídica, ya que las porciones en cada lado de la membrana tienen una diferente composición de aminoácidos y por ende, una estructura terciaria diferente. Otras proteínas se asocian también con las membranas, sin estar atravesándolas y son conocidas como proteínas periféricas. En la otra cara exterior de la bicapa puede haber carbohidratos de cadena corta que se encuentran unidos a proteínas o bien a lípidos membranales (Fig. 8).

Aunque la bicapa lipídica provee la estructura básica que soporta la naturaleza impermeable de las membranas celulares, las proteínas son responsables de la mayoría de las funciones de las membranas. Las mayorías de las membranas se componen de carbohidratos, 40 a 50 por ciento de lípidos (por peso) y de 60 a 50 por ciento de proteínas, pero la cantidad y el tipo de proteínas varía en las membranas reflejando su función. Las membranas involucradas en la transducción de energía, como las membranas internas de las mitocondrias y de los cloroplastos, contienen de cerca del 70% de proteínas. Algunas proteínas son enzimas que catalizan reacciones asociadas con la membrana, mientras que otras son acarreadores involucrados en el transporte de moléculas específicas hacia dentro o fuera de la célula o de un organelo específico. Otras actúan como receptores para recibir y transducir señales químicas a nivel intra o extracelular.

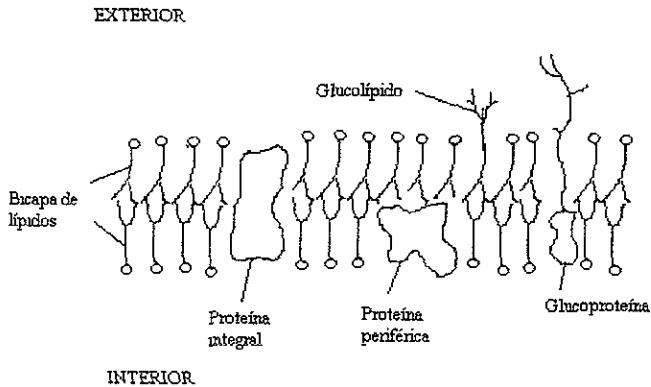


Figura 8. Componentes de una membrana biológica

Entre las proteínas más importantes de las membranas plasmáticas de las células vegetales se encuentra una ATPasa de  $H^+$  que bombea protones desde el citoplasma hacia el espacio apoplástico, lo cual crea un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática (negativo en el interior). Este gradiente es utilizado para conducir la entrada y la salida de solutos realizado por las proteínas acarreadoras y los canales proteicos. Una característica de la ATPasa de  $H^+$  es que su pH óptimo de actividad es ácido (aproximadamente 6.5).

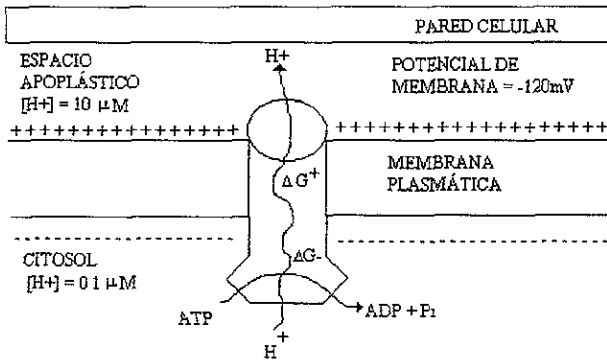


Fig.9. Esquema sobre la vectorialidad y energética de las reacciones de transporte de  $H^+$  y de hidrólisis de ATP por la ATPasa de  $H^+$ , que incluye el gradiente electroquímico de  $H^+$  que se genera. Esquema tomado de Gavilanes et al. 1995.

La ATPasa  $H^+$  de membrana plasmática es la enzima responsable de la creación del gradiente electroquímico de  $H^+$  a través de esta membrana. Este gradiente provee la energía necesaria para el transporte secundario y para la regulación de la turgencia de la célula y del pH intracelular. Debido a que mantener este gradiente es importante, la ATPasa de  $H^+$  hidroliza más de la cuarta parte del ATP que se produce en la célula y su actividad está altamente regulada.

Se ha propuesto que la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática es regulada por la fosforilación (Xing et al. 1996), y que dicha fosforilación puede llevarse a cabo por una cinasa dependiente de calcio (Lino et al. 1998).

Existen también proteínas acarreadoras específicas o canales de la membrana plasmática que median el movimiento de pequeños solutos (iones, productos fotosintéticos, etc.) dentro y fuera de la célula. Este movimiento se encuentra regulado

por diversos factores como las concentraciones mismas de los solutos, el  $\text{Ca}^{++}$  libre en el citoplasma, el potencial de membrana y la diferencia transmembranal de pH. Moléculas largas, como las proteínas y los polisacáridos, son transportados dentro de vesículas, las cuales pueden ser formadas en la membrana plasmática para encerrar material extracelular para una internalización; o pueden fusionarse con la membrana plasmática desde el interior para excretar productos.

**HIPOTESIS:**

Al establecerse el contacto huésped-patógeno se desencadena una serie de mecanismos de señalización como la fosforilación de proteínas membranales, es posible que la FB<sub>1</sub> promueva la fosforilación de algunas proteínas de la membrana plasmática.

**OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz es afectada por la acción de la toxina Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>).

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1.- Estudiar si la exposición de FB<sub>1</sub> produce cambios en los patrones de fosforilación de proteínas de la fracción de membrana plasmática expuesta a la toxina (FB<sub>1</sub> )
- 2.- Estudiar si la magnitud de la fosforilación encontrada depende de la concentración de FB<sub>1</sub> y de su tiempo de exposición.
- 3.- Caracterizar algunos de los elementos moleculares que participan en la fosforilación en particular, cinasas membranales. Determinar su posible dependencia de Ca<sup>++</sup>, su respuesta a la concentración de FB<sub>1</sub> y explorar el tipo de cinasas involucradas.

**HIPOTESIS:**

Al establecerse el contacto huésped-patógeno se desencadena una serie de mecanismos de señalización como la fosforilación de proteínas membranales, es posible que la FB<sub>1</sub> promueva la fosforilación de algunas proteínas de la membrana plasmática.

**OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz es afectada por la acción de la toxina Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>).

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1.- Estudiar si la exposición de FB<sub>1</sub> produce cambios en los patrones de fosforilación de proteínas de la fracción de membrana plasmática expuesta a la toxina (FB<sub>1</sub>)
- 2.- Estudiar si la magnitud de la fosforilación encontrada depende de la concentración de FB<sub>1</sub> y de su tiempo de exposición.
- 3.- Caracterizar algunos de los elementos moleculares que participan en la fosforilación en particular, cinasas membranales. Determinar su posible dependencia de Ca<sup>++</sup>, su respuesta a la concentración de FB<sub>1</sub> y explorar el tipo de cinasas involucradas.

**HIPOTESIS:**

Al establecerse el contacto huésped-patógeno se desencadena una serie de mecanismos de señalización como la fosforilación de proteínas membranales, es posible que la FB<sub>1</sub> promueva la fosforilación de algunas proteínas de la membrana plasmática.

**OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz es afectada por la acción de la toxina Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>).

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1.- Estudiar si la exposición de FB<sub>1</sub> produce cambios en los patrones de fosforilación de proteínas de la fracción de membrana plasmática expuesta a la toxina (FB<sub>1</sub>).
- 2.- Estudiar si la magnitud de la fosforilación encontrada depende de la concentración de FB<sub>1</sub> y de su tiempo de exposición.
- 3.- Caracterizar algunos de los elementos moleculares que participan en la fosforilación en particular, cinasas membranales. Determinar su posible dependencia de Ca<sup>++</sup>, su respuesta a la concentración de FB<sub>1</sub> y explorar el tipo de cinasas involucradas.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

**Material biológico.** En todo el trabajo de tesis se utilizaron embriones de maíz del híbrido H-355, los cuales se embebieron 24 horas. El ensayo de imbibición se describe en el esquema de la Fig. 10.

La solución de fumonisina B<sub>1</sub> se preparó a una concentración de 10 μM en agua.

### I. Imbibición de los embriones de maíz

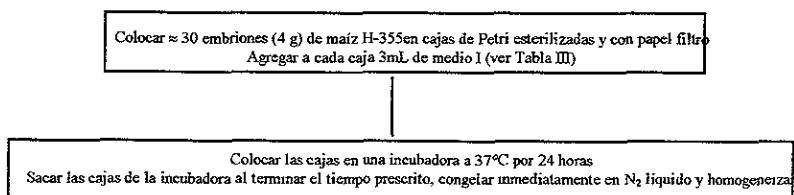


Fig 10.- Diagrama del ensayo de imbibición de los embriones de maíz



## II. Obtención de la fracción microsomal de embriones de maíz

Se obtuvo la fracción microsomal de embriones de maíz de acuerdo a la Fig. 11 con objeto de usarla para estandarizar las condiciones de electroforesis que se usarían luego con la fracción de membrana plasmática

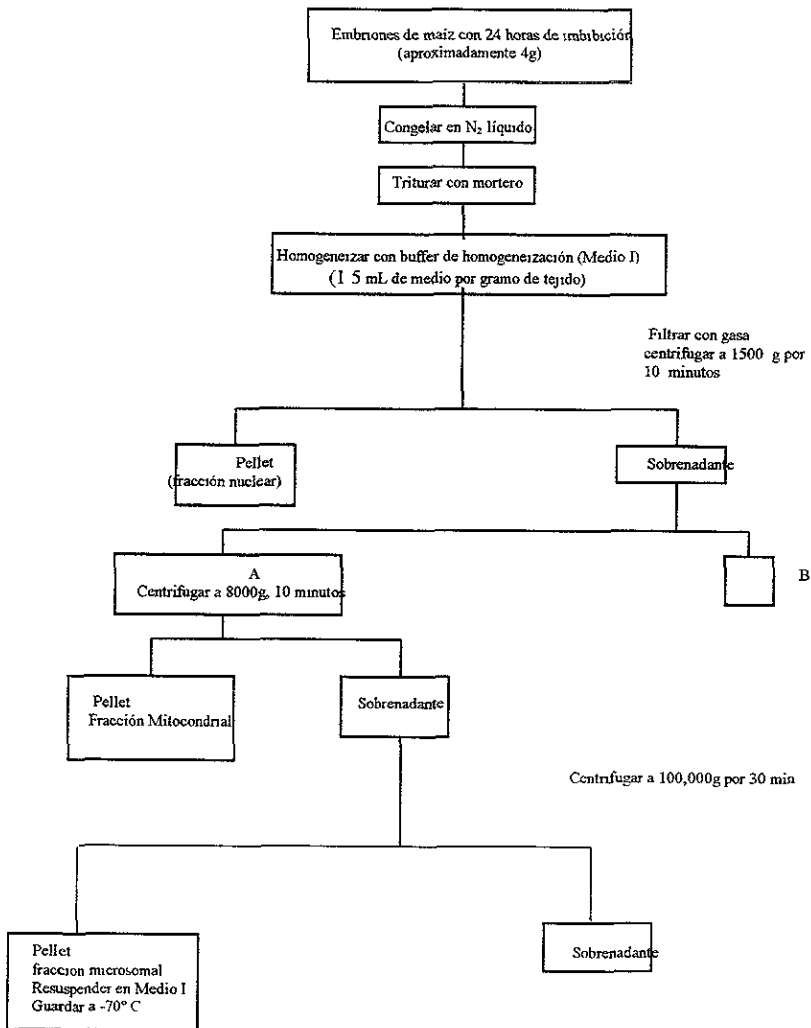


Fig 11 - Procedimiento para obtener la fracción microsomal de embriones de maíz.

TABLA III. Composición del medio I (Medio de homogeneización) y medio de imbibición.

REACTIVO	CONCENTRACION
Sacarosa	250mM
EDTA	2mM
ATP	1mM
DTE o DTT	4mM *
$\beta$ -mercapto etanol	15mM*
TPCK	100 $\mu$ g/mL*
TLCK	50 $\mu$ g/mL*
Quimostatina	7 $\mu$ g/mL*

Medio de Imbibición:

REACTIVO	CONCENTRACION
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Tris HCl	50 mM
Sacarosa	20%
Cloramfenicol	10 $\mu$ g / mL

TABLA IV. Composición del medio II (Buffer del pellet).

REACTIVO	CONCENTRACION
Sacarosa	250mM
EDTA	2mM
ATP	1mM
DTE o DTT	4mM *
TPCK	100 $\mu$ g/mL*
TLCK	50 $\mu$ g/mL*
Quimostatina	7 $\mu$ g/mL*

\* Se añaden justo antes de utilizar la solución

### III. Determinación de la concentración de proteína.

Se determinó la cantidad de proteína presente en la fracción microsomal y en la preparación de vesículas de membrana plasmática. Se usó el método de Lowry et al. modificado por Peterson, 1977 (Tabla V).

Reactivos o soluciones utilizadas.

MEDIO I - Es el mismo reactivo que el que se enlista en la Tabla III.

REACTIVO A.- Partes iguales de H<sub>2</sub>O, NaOH 0.8N, SDS al 10% y CTC (NaHCO<sub>3</sub> 10%, CuSO<sub>4</sub> 0.1% y K<sub>2</sub>C<sub>11</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 0.2%)

REACTIVO B.- Un volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu + 5 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada.

TABLA V. Determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Lowry.

TUBO	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	BSA ( $\mu$ L)	MUESTRA ( $\mu$ L)	MEDIO I ( $\mu$ L)	NaDOC 0.15% (mL)	REACTIVO A (mL)	REACTIVO B (mL)
1	900				0.1	1	0.5
2	900				√	√	√
3	890	10			√	√	√
4	880	20			√	√	√
5	870	30			√	√	√
6	860	40			√	√	√
7	840	60			√	√	√
8	820	80			√	√	√
9	810	90			√	√	√
10	800	100			√	√	√
11	900		2 *		√	√	√
12	900		2 *		√	√	√
13	900		2 *		√	√	√
14	900			2 *	√	√	√
15	900			2 *	√	√	√
16	900			2 *	√	√	√

El procedimiento seguido se detalla en la tabla V, tomando en consideración que

- a) Si la proteína se encontraba muy diluida, se agregaban 5 $\mu$ L de muestra en lugar de 2 $\mu$ L.
- b) Se utilizó como estándar a la albúmina sérica bovina a una concentración de 1mg/mL. Después de añadir el reactivo B se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750nm.

#### IV.- Remoción de lípidos de vesículas microsomales de embriones de maíz

Se había observado previamente en el laboratorio que las fracciones membranales daban frecuentemente bandas de proteínas difusas en los geles. Por ello, se realizó una remoción de lípidos con una mezcla etanol - acetona 1:1 de los microsomas para eliminar el posible efecto de los lípidos membranales en la resolución de las bandas de proteínas en los geles de poliacrilamida - SDS.

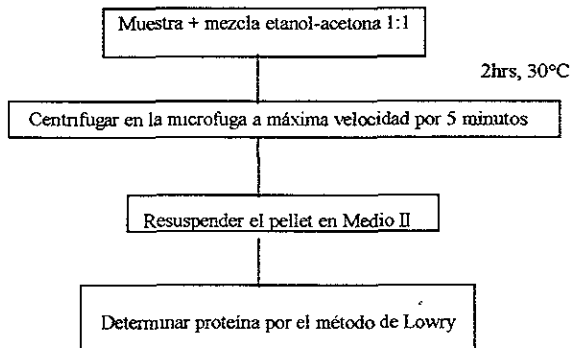


Fig. 12 - Esquema de remoción de lípidos de vesículas microsomales.

### V.- Preparación de geles de poliacrilamida - SDS

Se prepararon geles de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%) para determinar el patrón electroforético de las proteínas que se encontraban tanto en microsomas como en membranas plasmáticas. (Se siguió el procedimiento de Schaggerand, Von Jagow, 1987).

El gel preparado constaba de dos geles uno separador y otro concentrador. Los reactivos utilizados y las cantidades agregadas de cada reactivo para preparar cada uno de los geles se muestran en la Tabla VI.

TABLA VI.- Composición de geles de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%) - SDS.

Los reactivos se añaden en el orden enlistado

REACTIVOS	GEL SEPARADOR ( $\mu$ L)	GEL CONCENTRADOR ( $\mu$ L)
Acrilamida-bisacrilamida (10%-0.3%)	1.1mL	224.6
Amortiguador del gel Tris/SDS, pH 8.9	1.1mL	421.1
Glicerol	445.0	_____
H <sub>2</sub> O	668.0	1038.0
Persulfato de amonio al 10%	11.1	14.0
TEMED	1.11	1.4
CANTIDAD TOTAL (volumen)	3354.0	1700.0

La preparación de los reactivos utilizados en la preparación de geles e indicados en la Tabla VI fue como sigue:

a) Solución de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%).

b) Amortiguador del gel.-

Tris 3M

SDS 0.3%

HCl 1N

Ajustar el pH a 8.9-9.0

c) Buffer del cátodo.-

Tris 0.1M

Tricina 0.1M

SDS 0.1 %

Preparar volumen de 1L. Completar con agua destilada.

d) Buffer del ánodo.-

Tris 0.2M

Ajustar el pH a 8.9.

Preparar volumen de 1L. Completar con agua destilada.

e) Solución digestora.-

SDS 10%

Tris 100mM. PH 6.8

Azul de bromo fenol 0.6%

$\beta$ -mercapto etanol 4% \*

\* Se añade justo antes de usarse. A 96 $\mu$ L de la mezcla anterior, añadir 4 $\mu$ L de  $\beta$ -mercapto etanol.

f) Estándar de proteínas con diferente peso molecular.- El estándar utilizado fue el de Bio-Rad, catálogo 161-0305, el denominado de intervalo de bajo peso molecular y que estaba compuesto de los siguientes proteínas marcadoras de peso molecular:

PROTEINA	PESO (DALTONES)	MOLECULAR
Fosforilasa B	102,000	
Albúmina sérica bovina	78,000	
Ovoalbúmina	49,500	
Anhidrasa carbónica	34,200	
Inhibidor de tripsina de soya	28,300	
Lisozima	19,900	

También se utilizó otro estándar, fue de Bio-Rad, catálogo 161-0318, de amplio rango de peso molecular y estaba compuesto por los siguientes marcadores de peso molecular.

PROTEINA	PESO (DALTONES)	MOLECULAR
Miosina	210	
$\beta$ -galactosidasa	127	
Albumina sérica bovina	84	
Ovoalbúmina	49.5	
Anhidrasa carbónica	35.3	
Inhibidor de Tripsina de soya	28.1	
Lisozima	20.5	
Aprotinina	7.0	

g) Muestras.- Para preparar las muestras, agregar 1 $\mu$ L muestra + 24  $\mu$ L de buffer del pellet (preparado como se indica en la Tabla IV). De esta manera se obtiene la muestra I.

Agregar 25 $\mu$ L de la muestra I + 25 $\mu$ L del buffer de digestión (se preparó conforme se señaló en el inciso e).

h) Solución fijadora:  
1800mL H<sub>2</sub>O  
200mL CH<sub>3</sub>COOH

i) Solución teñidora:  
1500 mL metanol  
1500 mL H<sub>2</sub>O  
800 mL CH<sub>3</sub>COOH  
6 gramos de azul de coomassie, Brilliant blue G – 250.

j) Solución desteñidora.  
1500 mL etanol  
1500 mL H<sub>2</sub>O  
300 mL CH<sub>3</sub>COOH

Con todos los reactivos listos, se procedió a preparar el gel según el siguiente procedimiento:

- 1) Se monta la cámara de electroforesis. Se utilizó una cámara para minigeles de marca Bio-Rad. Se ensamblan los vidrios y se montan sobre el soporte incluido en la cámara, se colocan los espaciadores y se prueba que no tenga fugas.
- 2) Se prepara el gel separador conforme a la Tabla VI y se vierte entre las dos placas de vidrio. Al final de vaciar dicho gel se coloca una capa de agua para evitar la formación del menisco propio de toda sustancia líquida. Se deja polimerizar durante 15 minutos.
- 3) Pasados los 15 minutos de polimerización, se procede a la preparación del gel concentrador (su preparación se indica en la Tabla VI) y después de agregar éste, se coloca un peine que permite la formación de 10 carriles después de que se deja polimerizando el gel por 20 minutos.
- 4) Se ensambla la cámara de electroforesis y se prueba con agua para observar si hay presencia de fugas, si es así, se ajustan un poco más los tornillos.
- 5) Ya que la cámara está perfectamente ensamblada, se procede a agregar las muestras en los carriles, se cargan con diferentes cantidades dependiendo de las características del experimento a realizar. En cuanto a la cantidad a agregar del estándar va de 5-10  $\mu\text{L}$  y generalmente se colocan a en los carriles de las orillas; mientras que las muestras van colocadas en los carriles del centro del gel.
- 6) Ya que las muestras se han colocado se agregan los buffers del cátodo (dentro de la cámara) y del ánodo (fuera de la cámara) que se preparan conforme a la Tabla VI.
- 7) Después de haber agregado los buffers, se conecta la cámara a una fuente de poder y se deja corriendo el gel 1 hora a 35V y de 2-4 horas a 60V.



8) Después de haberse terminado este tiempo, se apaga la fuente de poder y se procede a sacar el gel lavando constantemente con agua para evitar que se rompa, se transfiere a un recipiente y se le van agregando las siguientes soluciones por los periodos de tiempo siguientes.

- |                        |               |
|------------------------|---------------|
| • Solución fijadora    | Toda la noche |
| • Solución teñidora    | 4 - 5 horas   |
| • Solución desteñidora | Toda la noche |

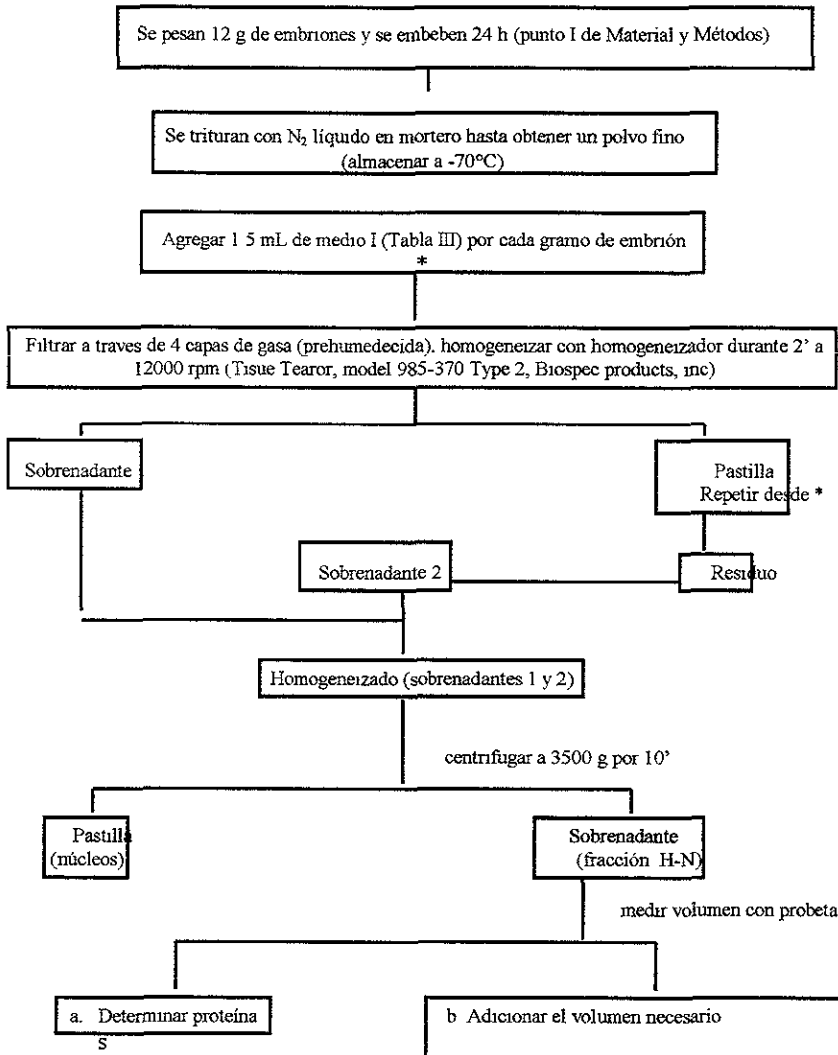
9) El gel se conserva en solución fijadora hasta que se fotografíe, posteriormente, seca.

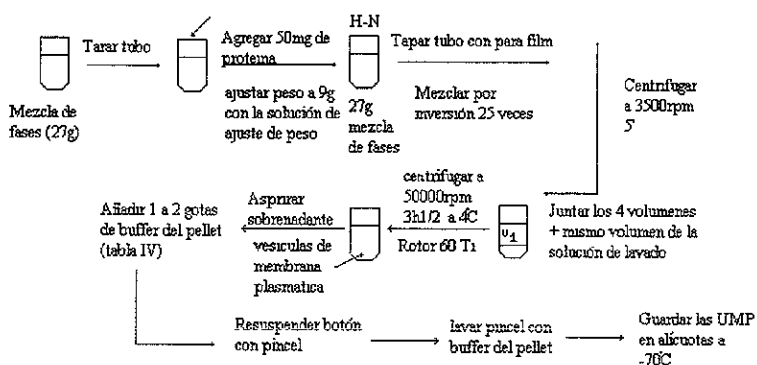
#### **VI.- Obtención de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz (VMP)**

Debido a que se quería estudiar si había participación de las proteínas presentes en la membrana plasmática en específico de cinasas de proteínas membranales al estar en contacto con la toxina de un patógeno, se procedió a realizar la extracción de vesículas de membrana plasmática, la cual se expone en la Fig.13.

Los reactivos que se utilizan para la obtención de vesículas de membrana plasmática son los siguientes.

- a) Medio I.- Se prepara de la misma manera como se indica en la Tabla III.
- b) Medio II.- Se prepara de la misma manera como se indica en la Tabla IV.





- Al día siguiente, se centrifuga 2 horas a 35,000 rpm en el rotor 50Ti para concentrar a las membranas y eliminar residuos del PEG

Fig 13.- Proceso de obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP). Todo el procedimiento debe de hacerse a 4°C

### c) Dextran T-500 20% (p/p)

Cuando se haga esta solución se debe de añadir el dextran aproximadamente a las dos terceras partes del volumen que se necesita preparar y agitar suavemente con una varilla de vidrio hasta que la barra de agitación pueda moverse en el vaso de precipitados. Se continua agitando suavemente hasta que todos los grumos desaparezcan, aforar y guardar a -20°C.

### b) Polietilenglicol (PEG) 335 o 40% (p/p)

Hacer un volumen grande de PEG y almacenarlo a -20°C en alícuotas. La solución debe estar clara en el momento de almacenarse, si se ve turbia, colocarla a 4°C durante unos minutos hasta que esté transparente

c) Preparar una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2M pH 7.8 se debe almacenar a 4°C.

d) Preparar una solución de KCl 2M, almacenar a 4°C.

e) Solución para ajustar el peso de la fracción membranal.- Ésta solución contiene 330mM sacarosa, 5 mM KCl, 5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.8. Guardar a 4°C.

f) Solución para lavar las membranas - 250mM sacarosa, 10mM Tris/HCl pH 7.5. Guardar a 4°C.

d) Mezclas de fases y sistema de fases.

Para embriones secos, se utiliza una mezcla de fases que contiene polietilenglicol al 6.8% y dextran al 6.8% como concentraciones finales, mientras que para embriones embebidos la concentración de los polímeros es de 6.7% de cada uno.

Estas soluciones se preparan por peso, añadiéndolas con pipeta al tubo en el que se va a centrifugar la preparación cruda de membranas que se va a purificar; si se emplean 27g de la mezcla de fases, utilizar un tubo de centrifuga con capacidad para 50mL (no necesita tener tapa) y de preferencia de policarbonato (transparente), para poder apreciar con claridad la separación de las dos fases. Todo el procedimiento de pesado se debe hacer a 4°C, ya que la separación de las fases se realiza mejor en frío

Las mezclas y sistemas de fases ya preparadas según la Tabla VII, se agitan con moderación, ya que si se agitan demasiado, los polímeros, en especial el dextran, se pueden romper; agitar varias veces para disolver la sacarosa o dejarlo por un día a 4°C.

Los sistemas de fases deben centrifugarse a 1500 x g ó 3500rpm 5' antes de usarse para facilitar la separación de las fases.

TABLA VII.- Composición de la mezcla de fases para embriones embebidos

[Solución madre]	Mezcla de fases	Sistema de fases	[final]
20% Dextran T-500	11.52g	11.52g	6.4%
40% PEG 3350	5.76g	5.76g	6.4%
Sacarosa sólida	3.05g	3.05g	330mM
0.2M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.8	0.675 mL	0.675 mL	5mM
$\text{H}_2\text{O}$ lo suficiente para aforar a un peso de	27.0g	36.0g	

Esta concentración final de la mezcla de fases resulta al considerar el volumen final de 36g tanto para la mezcla de fases como para el sistema de fases, ya que cuando se le añada a la mezcla la fracción membranal por purificar, se completará el peso de 36.0g.

A continuación se mencionan las cantidades aproximadas de las soluciones que se utilizan en la obtención de vesículas de membrana plasmática partiendo de 5 g de embriones:

Solución	Preparar
Medio I	15mL
Solución para ajuste de peso	< 15mL
Mezcla de fases	2 tubos de centrifuga con 27g c/u.
Sistema de fases	2 tubos de centrifuga con 36g c/u
Solución de lavado de membranas	100mL
Medio II	1.5mL

## VII.- Ensayo de fosforilación de proteínas de vesículas de membrana plasmática

## VII.- Ensayo de fosforilación de proteínas de vesículas de membrana plasmática

Se probaron diversas condiciones en el ensayo de fosforilación, ya que se quería detectar la presencia de cinasas de proteínas endógenas capaces de fosforilar a algunas de las proteínas presentes en la membrana plasmática de los embriones de maíz en germinación. Se deseaba saber si éstas eran dependientes de calcio y si su efecto se veía alterado al exponer a los embriones de maíz a la Fumonisina B<sub>1</sub>.

El ensayo consta de varios pasos, los cuales se exponen a continuación:

### 1) Preparación de las membranas para el ensayo de fosforilación.

- a) Se obtienen las vesículas de membrana plasmática (véase Material y Métodos, punto VI)
- b) Se concentran las vesículas de membrana plasmática, ya que se trata de un microensayo, por lo que se requieren cantidades en volúmenes extremadamente pequeños. (Se necesita una concentración de proteína membranal de aproximadamente 8 µg/µL).

El procedimiento para concentrar las vesículas de membrana plasmática se realiza como se indica en la Fig. 14. Todo el procedimiento se realiza a 4°C.

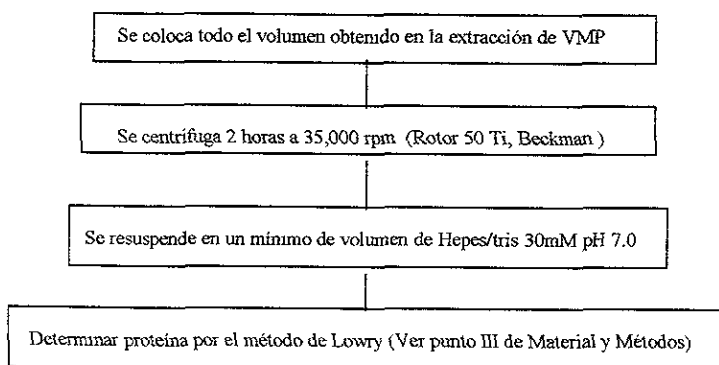


Fig 14 - Procedimiento para concentrar la fracción de vesículas de membrana plasmática

2) Preparación del gel. Ver punto V de Material y Métodos.

3) Se procede a realizar lo que es propiamente el ensayo de fosforilación.

Las soluciones requeridas para su realización son las expuestas a continuación:

Hepes/Tris pH 7.0	300mM
EGTA/Tris pH 7.0	30mM
HEDTA/Tris pH 7.0	30mM
MgSO <sub>4</sub>	25mM
CaCl <sub>2</sub>	32mM
ATP	160mM
ATP- <sup>32</sup> P	

El ATP utilizado tenía las siguientes características.

Redivue [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	AA0018	
Aqueous solution	37 MBq	1mCi.
370 MBq /mL	10mCi /mL	
>185 TBq /mmol	> 5000 Ci/ mmol	100 $\mu$ L
Amersham pharmacia biotech.		

Para el cálculo de las concentraciones de calcio y magnesio libres que se requieren en el medio de ensayo fosforilación se utilizó el programa de cómputo Chelator, en el cual se insertan los datos de fuerza iónica, buffers y reactivos utilizados; ya que se tienen estos datos en el programa, se indica el valor de la concentración de calcio y magnesio libres requeridos para realizar el ensayo de fosforilación, cuando se agregan estos datos, el programa calcula el valor de la cantidad de calcio y/o magnesio a agregar en concentraciones molares; después, se realizan una serie de cálculos para determinar las cantidades necesarias para determinar las concentraciones de calcio y magnesio deseadas partiendo de la solución stock de cada uno.

#### **Preparación de la mezcla general**

Se parte de una mezcla general, la cual es utilizada para todos los tubos en donde se realiza el ensayo, esta mezcla consta de buffers y sales que se agregan en la misma cantidad a todos los tubos que participan en el ensayo de fosforilación, después de

agregar esta mezcla a cada tubo por separado, se le agregan los reactivos necesarios dependiendo de lo que se desea probar en el ensayo.

Dicha mezcla consta de los reactivos que se encuentran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Composición de la mezcla general para los ensayos de fosforilación.

Reactivo	Hepes/Tris	EGTA/Tris	HEDTA/Tris	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	ATP- <sup>32</sup> P/ATP	Membranas
[stock]	300mM pH 7.0	30mM 7.0	30mM pH 7.0	25mM	32mM	153.7μM	
[final]	18.8mM	1mM	1mM	2.5mM		12.5μM 0.96μCi/tubo	Vol. final 16μL
Vol/tubo	1.0μL	0.5μL	0.5μL	X Vol.	X Vol.		50μg X Vol.

Todas esas cantidades se utilizan en todos los tubos, por lo tanto se puede partir de una mezcla general, la cual consta de cada cantidad de reactivo multiplicada por el número de tubos que van a prepararse, siempre preparando un tubo más para tener un pequeño exceso.

En cada experimento se varían condiciones dependiendo de lo que se desea comprobar, las concentraciones de calcio y magnesio permanecen constantes en la mayoría de los experimentos, si se cambiaron se indica en dichos experimentos.

La composición de los tubos en el ensayo fue como se indica en la tabla IX.

Tabla IX. Composición de las muestras esenciales en el ensayo de fosforilación.

TUBO	MEZCLA GENERAL	25mM MgSO <sub>4</sub>	32mM CaCl <sub>2</sub>	Concentración final	H <sub>2</sub> O Completar a 16μL	50μg (agregar en intervalos de t)	Incubar 10' a T° ambiente	Agregar 16μL de buffer de digestión
1	X Vol.	2.22μL			√	0' X Vol.		10'
2	X Vol.	2.04μL	0.52μL	2μM	√	1' X Vol.		11'
3	X Vol.	1.74μL	0.88μL	20μM	√	2' X Vol.		12'



La reacción se detuvo con la adición del buffer de digestión (Ver tabla VI para su preparación), y se incubó 1 hora a temperatura ambiente para después cargar las muestras a los geles que se describieron anteriormente.

En algunos experimentos se utilizaron inhibidores y activadores de proteínas cinasas, los cuales se muestran en la tabla X así como la concentración utilizada y la función que se conoce de estos reactivos.

Tabla X. Inhibidores y activadores utilizados en el ensayo de fosforilación.

Reactivo	Concentración utilizada ( $\mu\text{M}$ )	Función
Cloruro de queleritrina	1	Inhibe selectivamente la cinasa C
Estaurosporina	1	Inhibidor de amplio rango de proteínas cinasas de Ser/Thr
Bisindolilmaleimida I	0.1	Inhibidor de la cinasa C
PMA	1	Activador de la cinasa C

Todo este procedimiento debe hacerse con mucha precaución, ya que se está trabajando con radiactividad, por lo tanto, se necesitan condiciones de trabajo que permitan hacer el trabajo con seguridad; después de sacar el gel de la cámara, todos los componentes de la cámara deben de colocarse en una cubeta con agua y jabón y deben dejarse toda la noche; al día siguiente, se enjuaga perfectamente la cámara y, posteriormente se utiliza el aparato para medir la cantidad de radiactividad presente, en este caso, se utilizó un detector Geiger-Müller, con él se observa la cantidad de radiactividad presente en la cámara, y si ésta no es alta, se procede a realizar el experimento siguiente

#### 4) Cargado, separación y tinción de las proteínas en el gel.

Cargar geles con la cantidad de proteína determinada, en algunos experimentos se varió la cantidad de proteína para encontrar una cantidad en donde las bandas obtenidas en el gel y en la autoradiografía se observaran de una manera nítida, y que la cantidad

de proteína fuera suficiente para que al momento de realizar la autoradiografía se pudiera apreciar de una manera correcta el resultado del ensayo de fosforilación.

Las muestras de proteína se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS según se describió en el punto V de esta sección. Cuando las muestras procedían del ensayo de fosforilación el gel fue teñido según se detalla a continuación.

Primero el gel se deja en solución fijadora durante media hora, luego se lava y se vierte a una solución de azul de Coomassie para su tinción durante otros treinta minutos y, finalmente, el gel después de ser nuevamente lavado, se deja en solución desteñidora durante toda la noche.

El gel se deja incubando toda la noche con glicerol al 1% en agua para evitar que el gel se rompa, ya que al realizar la autoradiografía el gel se expone a condiciones muy drásticas como es el estar varios días en un ultracongelador.

Al día siguiente se realiza la autoradiografía del gel.

### 5) Autoradiografía

- a) Sacar el gel de la solución desteñidora y enjuagar con agua destilada.
- b) Se coloca el gel con mucha precaución sobre una película fotográfica que ya no sea de utilidad, esto se hace cuidando de que tenga siempre suficiente agua para evitar que el gel se rompa.
- c) Se cubre el gel con plástico del tipo "ega pack" evitando que quede alguna burbuja de aire, ya que pueden salir manchas a la hora de sacar la radiografía.
- d) Se monta el gel sobre un cassette para exposición.

- e) En el cuarto oscuro se colocan dos hojas de papel fotográfico, por encima del gel montado y luego se cierra el cassette cuidando que quede herméticamente cerrado para evitar que la película se vea. Se coloca el cassette en una bolsa negra y se lleva al ultracongelador Revco ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), para que el gel se exponga por uno o varios días, dependiendo de la radiactividad que tengan las muestras, esto puede estimarse de manera gruesa con el Geiger-Müller antes de iniciar la exposición.
- f) Pasado el tiempo deseado, se saca el cassette del Revco y se permite que éste alcance la temperatura ambiente.
- g) Después de que el cassette llegó a la temperatura ambiente, en el cuarto oscuro se saca solamente una de las placas fotográficas y se cierra perfectamente el cassette dejando la otra placa sobre el gel. La placa fotográfica obtenida se coloca en la solución reveladora hasta que comience a observarse la aparición de las bandas de color oscuro sobre la placa. Una vez observada, se coloca la placa en una cubeta con agua y después se pasa la placa a la solución fijadora, se quita de ahí hasta que presente un color oscuro y pasado este tiempo, se vuelve a colocar la placa en agua para enjuagarla.
- h) La placa se suspende para permitir que se seque por completo.
- i) Si las bandas ya se observan de una manera nítida, entonces, se sigue el mismo procedimiento con la otra placa que quedó dentro del cassette, si no es así, se guarda de nuevo el cassette dentro del Revco ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) y se deja exponer por un lapso mayor de tiempo.

- j) Para la asignación de los pesos moleculares a las bandas observadas en la autoradiografía, se sobrepuso la placa fotográfica sobre el gel y se marcaron las bandas correspondientes a los pesos moleculares de los estándares que se encontraban preteñidos, esto se hizo con la ayuda de un marcador.

### **VIII.- Medición de hidrólisis de ATP**

Se midió la hidrólisis del ATP para evaluar la pureza de las vesículas de membranas plasmáticas, ya que puede tener diferentes grados de enriquecimiento por contaminación de otras membranas intracelulares, y lo que se desea es tener predominantemente membranas plasmáticas para observar el efecto de la fumonisina B<sub>1</sub>.

Para saber si las vesículas de membrana plasmática son las que se encuentran con mayor abundancia, se mide una actividad enzimática típica de estas membranas que es la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, para ello se mide la hidrólisis de ATP en presencia de vanadato, un inhibidor específico de esta enzima, también se incluye en el ensayo los inhibidores de la ATPasa mitocondrial (NaN<sub>3</sub>) y de la ATPasa del tonoplasto (KNO<sub>3</sub>), ya que éstas pueden contaminar la preparación y contribuir a la hidrólisis de ATP. Se añaden 5 µg de proteína membranal a un medio de reacción que contiene lo que se indica en la Tabla XI y tal como se describe en la Tabla XII, se deja que la reacción proceda en un tiempo de 1 hora a una temperatura de 30°C (la reacción de hidrólisis de ATP es lineal en estas condiciones de tiempo, temperatura y cantidad de proteína). La reacción se termina por la adición de SDS a una concentración final del 12%. Posteriormente se procedió a determinar uno de los productos de esta reacción que es el Pi.

Los reactivos utilizados en la medición de la hidrólisis del ATP son los siguientes.

Tabla XI. Concentraciones de las soluciones stock y finales para medir la actividad de la hidrólisis de ATP.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN DEL STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
Sacarosa	250mM	250mM
MOPS/BTP pH 7.0	20mM	20mM
CCCP	1000 $\mu$ M	7 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	300mM	10mM
ATP/BTP pH 7.0	300mM	10mM
BRU	1%	0.015%

#### Determinación de Pi

Este se realizó de acuerdo al procedimiento de González et al. (1990). Los reactivos utilizados fueron:

Reactivo B:C, lo constituyen dos reactivos, el ácido ascórbico al 12% el cual se prepara en HCl 1N y el molibdato de amonio al 2% el cual se prepara también en HCl 1N, estos reactivos se preparan por separado y se agregan en proporción 1:1 al momento de realizar el experimento, ya que el reactivo es estable solamente por un lapso corto de tiempo.

Reactivo E, está constituido por tres reactivos, los cuales quedan a la concentración final indicada; ácido acético al 2%, meta arsenito de sodio al 2% y citrato de sodio al 2%.

Los reactivos y su secuencia de adición seguidos para la medición de la hidrólisis del ATP y la subsecuente determinación de Pi están expresados en la Tabla XII. Se debe también realizar una curva patrón con diferentes concentraciones de fosfato inorgánico para poder interpolar los valores de absorbancia obtenidos en el experimento. La curva patrón se realiza de la siguiente manera (Tabla XII).

Tabla XII.- Curva patrón de fosfato inorgánico.

H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Pi [mM] ( $\mu$ L)	SDS 24% ( $\mu$ L)	BC ( $\mu$ L)	Incubar 3-10'	Reactivo E ( $\mu$ L)	Incubar 20'	Leer 850nm	Abs
150	—	150	300		450			
150	—	√	√		√			
140	+ 10	√	√		√			
130	+ 20	√	√		√			
120	+ 30	√	√		√			
110	+ 40	√	√		√			
90	+ 60	√	√		√			
70	+ 80	√	√		√			

A las muestras se les da el mismo tratamiento que a la curva patrón.

Tabla XIII. - Procedimiento para medir la hidrólisis de ATP con fosfato liberado.

TUBO	Me- dio de hidró- lisis ( $\mu$ L)	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 5mM ( $\mu$ L)	KNO <sub>3</sub> 1M ( $\mu$ L)	NaN <sub>3</sub> 100 mM ( $\mu$ L)	Protei- na VMP ( $\mu$ g)	30°C / 1h	SDS 24%	Reac. BC	Incubar 3-10'	React. E	Inc. 20'	Leer Abs. 850nm
1	150				5 $\mu$ g *		150	300		450		
2	150				✓		✓	✓		✓		
3	150				✓		✓	✓		✓		
4	145.5	4.5			✓		✓	✓		✓		
5	145.5	4.5			✓		✓	✓		✓		
6	145.5	4.5			✓		✓	✓		✓		
7	140		10		✓		✓	✓		✓		
8	140		10		✓		✓	✓		✓		
9	140		10		✓		✓	✓		✓		
10	147			3	✓		✓	✓		✓		
11	147			3	✓		✓	✓		✓		
12	147			3	✓		✓	✓		✓		
13	150				✓		✓	✓		✓		
14	150				✓		✓	✓		✓		
15	150				✓		✓	✓		✓		

\*A los tubos 13, 14 y 15, se les adiciona primero el SDS y luego la proteína, para que funcionen como tiempo cero

## **RESULTADOS:**

### **1) Obtención de la fracción microsomal.**

Inicialmente obtuvimos la fracción microsomal de los embriones de maíz embebidos como se explicó en Materiales y Métodos punto II y se determinó la cantidad de proteína obtenida. Se partió de 4 gramos de embriones, obteniéndose 13.05 mg de proteína membranar en un volumen de 900  $\mu\text{L}$ , con una concentración de 14.502 mg/mL.

### **2) Tratamiento de precipitación de la proteína.**

Se realizó la separación de la parte proteica de la preparación microsomal con precipitaciones con diferentes proporciones de la mezcla etanol:acetona (1:1) expresadas en relaciones volumen a volumen. Esto se hizo para lograr una mejor resolución electroforética de las proteínas membranales al remover algunos compuestos como lípidos o polímeros, que podrían persistir en la fracción membranar después de su purificación y con ello, afectar su movilidad electroforética. Los tratamientos efectuados dieron los rendimientos que se indican en la Tabla XIII.

Como puede observarse, se probaron diferentes cantidades de proteína, y diferentes relaciones proteína/solvente, para determinar si estos eran parámetros que afectarían la cantidad de la proteína recuperada después de su precipitación, ya que éstos son factores que resultan determinantes en nuestro caso, pues las cantidades de membranas plasmáticas que obtenemos son muy reducidas.



**Tabla XIV.- Precipitación de proteínas membranales de fracciones microsomales de embriones de maíz.** Se ensayaron varias condiciones que incluyeron diferentes cantidades iniciales de proteína membranal y varias relaciones de proteína-solvente en términos de la relación volumen/volumen, determinándose la recuperación de la proteína en cada condición.

Muestra inicial (mg)	Volumen de Muestra inicial ( $\mu\text{L}$ )	Relación Proteína/solvente (v/v)	Cantidad final obtenida (mg)	Concentración inicial (mg/mL)	Concentración final (mg/mL)	Recuperación %
1.55	100	1:1	0.83	15.5	4.15	53.5
1.55	100	1:2	1.53	15.5	7.65	98.7
0.77	50	1:1	0.20	7.7	1.0	25.9
0.77	50	1:2	0.38	7.7	1.9	49.3
0.39	25	1:1	0.024	3.9	0.12	6.15
0.39	25	1:2	0.14	3.9	0.7	35.9

Se observó que el mejor tratamiento de precipitación era aquel en el que se partió de 1.55 mg de proteína con una relación muestra/solvente (v:v) 1:2, pues éstas fueron las condiciones en donde la proteína precipitada fue recuperada totalmente. En esta condición también se obtuvo la muestra recuperada con la mayor concentración de proteína, si bien ésta fue alrededor de la mitad de la concentración de proteína inicial, es decir, antes de la precipitación. El aspecto de concentración de proteína es importante en este trabajo, pues se necesita ajustar al volumen máximo de los pozos del gel. Por ello se decidió emplear este tratamiento de la muestra para los experimentos posteriores que consistieron en la preparación de geles para observar el patrón electroforético que presentaban las proteínas de los microsomas del maíz variedad H-355. También se quería observar si existía una buena resolución en las bandas obtenidas.

Se realizaron varios geles en donde se aplicó la muestra con el tratamiento que había presentado un mejor porcentaje de recuperación, se aplicó también la otra muestra que

partía de una cantidad inicial de 1.55 mg, pero con una relación muestra/solvente (v/v) 1:1 y además se agregó una tercera muestra o muestra control, que era aquella que no había sido precipitada previamente (Fig. 15).

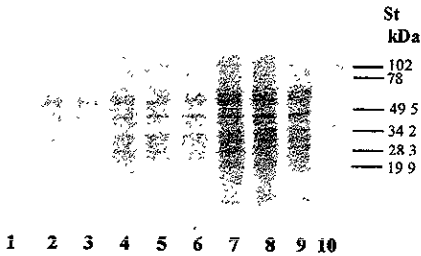


Fig. 15. Patrón electroforético de las fracciones microsomales en geles de poliacrilamida-SDS tratadas con y sin la mezcla acetona/etanol a la proteína. Después de la precipitación de la proteína se realizó un gel de poliacrilamida-SDS en donde los carriles 1, 2 y 3 tenían 12.4  $\mu\text{g}$  de la muestra control, los carriles 4, 5 y 6 tenían 12.6  $\mu\text{g}$  de la muestra de 1.5 mg que recibió el tratamiento de precipitación de la proteína con una relación muestra/solvente (v/v) 1:2; en los carriles 7, 8 y 9 se colocaron 12.5  $\mu\text{g}$  de la muestra de 1.5 mg que recibió el tratamiento de precipitación de la proteína con una relación muestra/solvente 1:1; finalmente el carril 10 tenía 6.3  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular. El gel se corrió 1 hora a 35 V y dos horas a 60 V. El tiempo de tinción del gel fue de 4 horas.

La semejanza entre las bandas de proteínas control (carriles 1, 2 y 3) y las sometidas a precipitación (carriles 4, 5, 6, 7, 8 y 9) pusieron en evidencia que el patrón electroforético de las proteínas no cambiaba por el tratamiento de precipitación de la proteína y que por lo tanto, este procedimiento era confiable, pues no producía una pérdida selectiva de alguna de las bandas de proteína. Además, encontramos que las bandas de proteínas presentaban una resolución adecuada sin ser tan intensas como las observadas con una relación muestra/solvente 1:1, ya que en este caso las bandas no tenían una buena separación debido a su intensidad.

### 3. Optimización de las condiciones de electroforesis en membranas plasmáticas.

Se procedió a purificar las vesículas de membrana plasmática, ya que se deseaba observar el patrón electroforético de las proteínas que se encuentran en la membrana plasmática para poder determinar su posible fosforilación. También se deseaba

determinar la cantidad de proteína mínima necesaria para aplicar al gel, obteniendo todavía una buena resolución en las bandas, ya que la cantidad de membranas plasmáticas que se obtiene es pequeña.

Se añadieron al gel tres cantidades de proteína de las membranas plasmáticas aisladas, 7.5, 15 y 22.5  $\mu\text{g}$  (Fig. 16).

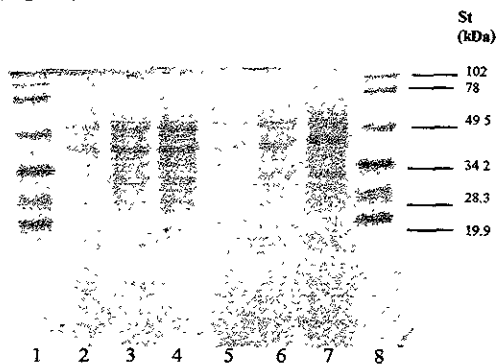


Fig. 16. Optimización de condiciones de electroforesis en proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS. Los carriles 1 y 8 se cargaron con 10  $\mu\text{L}$  de estándar de peso molecular, los carriles 2 y 5 se cargaron con 7.5  $\mu\text{g}$  de proteína, los carriles 3 y 6 se cargaron con 15  $\mu\text{g}$  de proteína y finalmente, los carriles 4 y 7 se cargaron con 22.5  $\mu\text{g}$  de proteína. El gel se corrió 1 hora a 35V y 3.5 horas a 60 V. El tiempo de tinción fue de 4 horas. Los carriles 5-7 son muestras de otra preparación.

Se determinó que la mejor cantidad de proteína a agregar era de 15  $\mu\text{g}$ , ya que con ésta se observaban las bandas de las proteínas con una buena nitidez y no tan difusas como cuando se agregaban 7.5  $\mu\text{g}$  que revelaban bandas demasiado tenues. Estos resultados indicaron que con estas condiciones se obtiene una buena resolución electroforética en las bandas de proteínas de membrana plasmática en un rango de 7.5 - 22.5  $\mu\text{g}$  de proteína aplicada al gel.

#### 4. Ensayos de fosforilación.

Ya que se tenían determinadas las condiciones electroforéticas de separación de las proteínas de membrana de los embriones de maíz, se prosiguió a realizar una serie de

ensayos de fosforilación en donde se variaban diferentes condiciones dependiendo del experimento.

### I. Fosforilación de proteínas de la membrana plasmática por cinasas endógenas

**en ausencia y presencia de calcio.** El primer ensayo de fosforilación consistió en probar si existía una actividad de cinasas que utilizaran el  $AT^{32}P$  en ausencia de una exposición de las membranas a la  $FB_1$ . Para ello, se incubaron vesículas de membrana plasmática en presencia de  $16 \mu M$   $AT^{32}P$  en presencia de 0, 2, 10 y 20  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$  durante una hora, según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (Fig. 17).

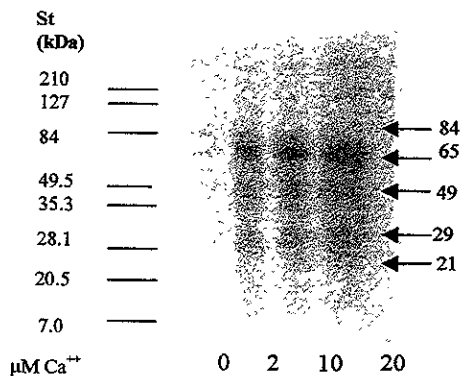


Fig.17.- Fosforilación de cinasas endógenas de la membrana plasmática en presencia y ausencia de calcio. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, se cargaron los carriles 2 y 9 con 6.25  $\mu g$  de estándares de peso molecular, el carril 4 se cargó con la muestra sin calcio, el carril 5 se cargó con la proteína fosforilada en presencia de 2  $\mu M$  de calcio, el carril 6 se cargó con la proteína fosforilada en presencia de 10  $\mu M$  de calcio; finalmente, el carril 7 se cargó con la muestra de proteína en presencia de una concentración de 20  $\mu M$  de calcio. En todos los carriles se aplicaron 25  $\mu g$  de proteína. El gel se corrió 1 hora a 35V y 2.5 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 0.5 horas. Al gel se le realizó la autoradiografía con un tiempo de exposición de 7 días.

Los resultados de la Fig. 17 muestran que existía una actividad de cinasas en las membranas plasmáticas de los embriones de maíz, previa al contacto de éstas con la  $FB_1$  además se observó que existía fosforilación estimulada por calcio en las bandas de aproximadamente 65, 49 29 y 21 kDa, existiendo otra fosforilación que parecía no ser tan dependiente de calcio (banda de 84 kDa), ya que dicha banda presenta una mayor

intensidad en aquel carril al que no se le agregó calcio, y aunque también se presenta en las muestras a las que se les agregó calcio, tiene una menor intensidad.

El experimento anterior muestra que existe una fosforilación de proteínas de membrana de las vesículas de membrana plasmática en embriones de maíz variedad H-355, a las cuales no se les había agregado la Fumonisina B<sub>1</sub> y muestra también que la fosforilación de algunas de estas proteínas es estimulada por calcio, mientras que otras no lo son.

**II. Efecto de la orientación membranal en la fosforilación de las proteínas de membrana plasmática.** El siguiente experimento a realizar fue el tratar una parte de las membranas con Brij N° 58 al 0.015%, debido a que al momento de obtener las vesículas de membrana plasmática, algunas de éstas pueden contener los sitios de las proteínas inaccesibles a las cinasas y con los sitios mismos de las cinasas inaccesibles al ATP, por lo tanto, si se exponen las vesículas al AT<sup>32</sup>P no pueden ser fosforiladas sus proteínas. En cambio, si utilizamos un detergente, como el Brij N° 58, inducimos la permeabilización de las vesículas de membrana plasmática y permitimos de esta manera que el AT<sup>32</sup>P pueda ser utilizado por las cinasas y éstas a su vez, puedan ser capaces de fosforilar a las proteínas. El experimento de fosforilación se realizó añadiendo Brij No. 58 a la incubación con AT<sup>32</sup>P según se describió en Materiales y Métodos. Las muestras se aplicaron a un gel y se sometieron a electroforesis. La autoradiografía del gel se observa en la Fig. 18.

En la misma figura se muestra el gel teñido con coomassie, donde se puede apreciar que los carriles están cargados con la misma cantidad de proteína, el cual es un control útil para asegurar que las diferentes intensidades de las bandas observadas en la

autoradiografía se deben al efecto de la fosforilación según la condición experimental usada y que no son un artefacto producido por la cantidad de proteína cargada al gel.

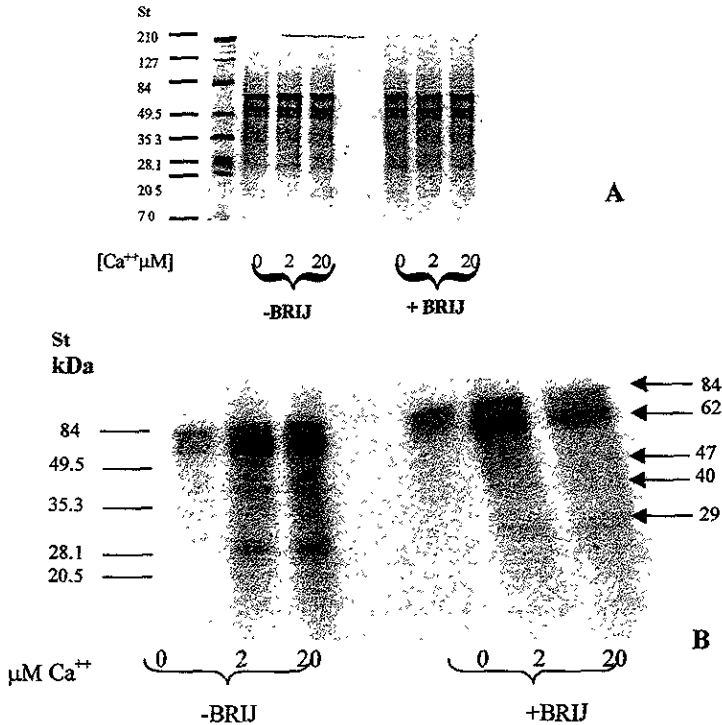


Fig. 18. Ensayo de fosforilación de proteínas de membrana plasmática en presencia de Brij No. 58. Se agregaron muestras de proteínas fosforiladas en presencia y ausencia de Brij al 0.015%. Se realizó un gel de poliácridamida-SDS, los carriles 2 y 10 contenían 6.25  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular, los carriles 3 - 5 son las muestras sin Brij con concentraciones de 0, 2 y 20  $\mu\text{M}$  de calcio respectivamente, los carriles 7-9 son las muestras con Brij No.58 al 0.015%, con concentraciones de 0, 2 y 20  $\mu\text{M}$  de calcio respectivamente. El gel se corrió 1 hora a 35V y 3 horas a 60V, el tiempo de tinción fue de 30 minutos. Posteriormente se realizó la autoradiografía y el tiempo de exposición fue de 15 días. La figura A muestra el gel teñido con azul de coomassie y la figura B muestra la autoradiografía realizada al gel.

Se observó que había la misma fosforilación de proteínas en ambas muestras (con y sin Brij); y que la fosforilación de estas proteínas aumentaba en presencia de calcio en las bandas de 62, 47, 40, 29 y 21 kDa, corroborando los datos de la Fig. 17, al igual que

la banda de aproximadamente 84 kDa de peso molecular, cuya fosforilación no era afectada por calcio, ya que se presentaba con una mayor intensidad en las muestras que no tienen calcio.

Se observó que el Brij No. 58 no tuvo mucho efecto en la fosforilación de nuestras vesículas de membrana plasmática, ya que las bandas se apreciaban casi con la misma intensidad con y sin el detergente, esto lo podemos atribuir a que la mayor parte de nuestras vesículas se encuentran con los sitios activos de las cinasas accesibles al sustrato. Aunque este comportamiento fue observado, se decidió realizar los siguientes experimentos con Brij para que todas nuestras vesículas estuvieran con los sitios activos de las cinasas disponibles y asegurar de esta manera la mayor expresión de fosforilación en nuestros experimentos.

En la misma figura se muestra el gel teñido con coomassie, en donde se puede apreciar que los carriles están cargados con la misma cantidad de proteína y que asegura que las diferentes intensidades de las bandas observadas en la autoradiografía se deben al efecto de los tratamientos en la fosforilación y no son un artefacto producido por la cantidad de proteína cargada al gel.

**III. Efecto de la FB<sub>1</sub> en la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática.** En los siguientes experimentos se agregó la toxina (FB<sub>1</sub>) para determinar si la fosforilación de las proteínas se veía afectada al agregar dicha toxina. Para ello, se incluyó la FB<sub>1</sub> a una concentración final de 10  $\mu$ M en el medio de ensayo de fosforilación como se indicó en Materiales y Métodos. Se realizó el gel y posteriormente la autoradiografía (Figs. 19 B, C). Los resultados se muestran en la Fig. 19.

En la misma figura se muestra el gel teñido con coomasie, en donde se puede apreciar que los carriles están cargados con aproximadamente la misma cantidad de proteína.

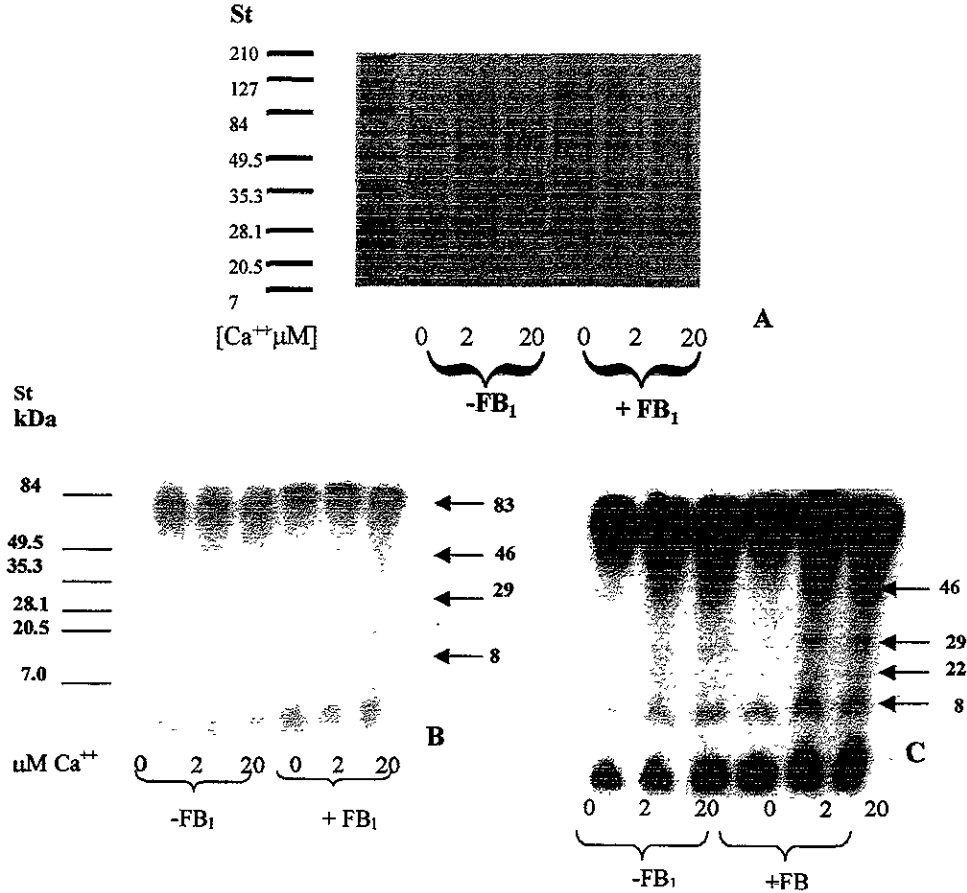


Fig. 19. Ensayo de fosforilación en presencia y ausencia de FB<sub>1</sub>. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, los carriles 2 y 9 se cargaron con 6.25 μg del estándar de peso molecular, los carriles 3-5 son las muestras sin FB<sub>1</sub> con concentraciones de 0, 2 y 20 μM de calcio respectivamente, los carriles 6-8 son las muestras con una concentración de 10 μM de FB<sub>1</sub> y con concentraciones de 0, 2 y 20 μM de calcio respectivamente. Todos los pozos se cargaron con 25 μg de proteína y todas las muestras contenían Brij No. 58 al 0.015%. El gel se dejó correr 1 hora a 35V, 3 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 30 min. Se realizó la autoradiografía. La figura A es el gel teñido con azul de coomasie, la figura B es la autoradiografía del gel con un tiempo de exposición de 7 días en donde se observa mejor la banda de 83 kDa, finalmente, la figura C es la autoradiografía del gel con un tiempo de exposición de 15 días en donde se aprecian mejor las bandas de 46, 29, 22 y 8 kDa.



Al revelar la autoradiografía (Figs. 19 B, C) se observó que en presencia de la fumonisina B<sub>1</sub> las membranas presentaban unas bandas de proteína fosforiladas con mayor intensidad que aquellas membranas que no contenían fumonisina, dichas bandas se encontraban cerca de los 46, 29 y 8 kDa de peso molecular. También se observó que aquellas membranas que fueron expuestas a una mayor concentración de calcio presentaban unas bandas con una fosforilación más alta, lo que concordaba con los experimentos anteriores.

**IV. Efecto del tiempo de reacción con la FB<sub>1</sub> en la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática.** En los siguientes experimentos se agregó la toxina (FB<sub>1</sub>) a diferentes tiempos para determinar si diferentes tiempos de exposición de las membranas plasmáticas a la fumonisina producían un cambio en el patrón de fosforilación de las proteínas membranales. Se realizó la curva de tiempo con y sin fumonisina y los tiempos elegidos fueron: 5, 10, 15 y 20 minutos de exposición respectivamente. Se realizó el gel y posteriormente la autoradiografía. Los resultados se muestran en la Fig. 20 . En la misma figura se muestra el gel teñido con coomassie como control de cargado de proteína y donde se puede apreciar que los carriles están cargados con aproximadamente la misma cantidad de proteína.

En este experimento se observó que existía una fosforilación de proteínas en las bandas de 85, 63, 30, 21 y 8 kDa respectivamente, cuyas bandas se apreciaban con una buena resolución en la autoradiografía, se observó también que en la banda cercana a los 28 kDa la fosforilación se ve aumentada en presencia de 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> y se observó un efecto similar con la banda cercana a los 21 kDa. Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa entre el tiempo de exposición a la FB<sub>1</sub> y el grado de

fosforilación. Se decidió utilizar un tiempo de reacción de 10 min. de la muestra con y sin toxina con el  $AT^{32}P$ , ya que con este tiempo se apreciaba el proceso de fosforilación de las proteínas de una manera en la cual se pudiera observar claramente, sin ser un tiempo largo de incubación.

**V. Efecto de la concentración de ATP en la fosforilación de proteínas de las vesículas de membrana plasmática en embriones de maíz variedad H-355.** En los siguientes experimentos se decidió observar el efecto de la concentración de ATP en la fosforilación; lo que se deseaba era determinar si había una concentración óptima de ATP en la que se observaran nítidas las bandas en la autoradiografía para apreciar de una manera correcta el proceso de fosforilación sin que el tiempo de exposición fuera muy prolongado y que se lograran observar todas las bandas posibles de fosforilar y no sólo las que se fosforilaran con una menor concentración de ATP. Se realizaron geles en donde las concentraciones de  $AT-^{32}P$  elegidas fueron: 8, 12, 16 y 20  $\mu M$ . Se colocaron muestras con y sin la toxina (Fig. 21).

En la misma figura se muestra el gel teñido con coomassie en donde se puede apreciar que todos los carriles fueron cargados con la misma cantidad de proteína, lo cual apoya la interpretación de que las diferentes intensidades de las bandas observadas en la autoradiografía se deben a los tratamientos experimentales durante la fosforilación y no son un artefacto producido por la cantidad de proteína cargada al gel.

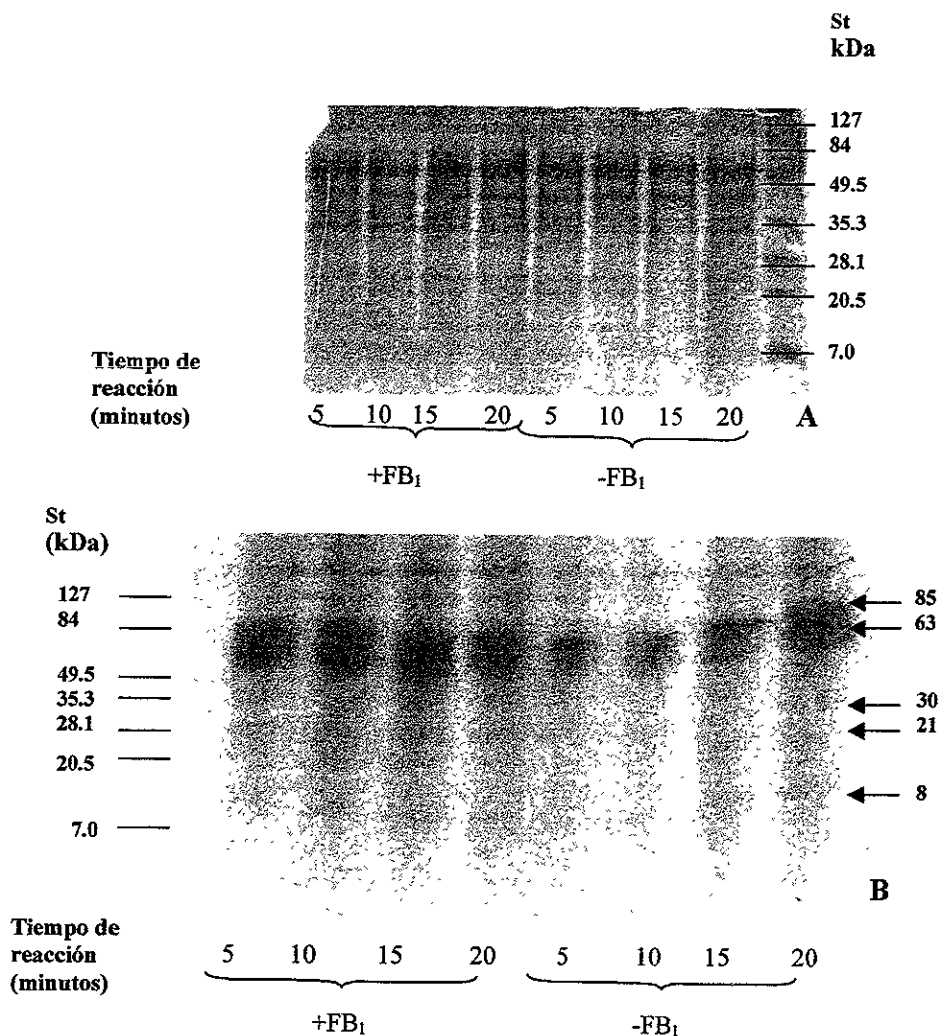


Fig. 20. Efecto del tiempo de incubación con la fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, los carriles 1 y 10 se cargaron con 6.25  $\mu$ g del estándar de peso molecular, los carriles 2-5 son las muestras con 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> con tiempos de incubación de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente, los carriles 6-9 son las muestras sin la toxina, con tiempos de incubación de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Todas las muestras tenían una concentración de 10  $\mu$ M de calcio, 0.015% de Brij No. 58. Todos los pozos se cargaron con 25  $\mu$ g de proteína. El gel se dejó correr 1 hora a 35V, 3 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 30 min. La figura A es el gel teñido con azul de coomasie, la figura B es la autoradiografía del gel con un tiempo de exposición de 7 días.

Con este experimento se encontró que al aumentar la concentración de ATP, la intensidad de las bandas en la autoradiografía aumentó. Se observaron bandas de aproximadamente 85, 46, 29, 18 y 8 kDa, se observó también que las bandas de las muestras que se pusieron en contacto con la toxina presentaban una mayor intensidad que aquellas bandas de las muestras que no estuvieron en contacto con la toxina, principalmente las bandas de 29 y 18 kDa, y la banda de 85 kDa cuando menos a tiempos de exposición prolongados. La concentración de  $AT^{32}P$  elegida para el resto de los experimentos fue de 16  $\mu M$ .

**VI. Efecto de las diferentes concentraciones de Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas.** Se deseaba observar el efecto de diferentes concentraciones de la toxina en la fosforilación de proteínas de membrana, para esto, se dejó reaccionar a las muestras con diferentes concentraciones de FB<sub>1</sub>, las cuales fueron: 0, 1, 2, 4, 6, 10, 20 y 30  $\mu M$ . Los resultados se observan en la Fig. 22. En la misma figura se muestra el gel teñido con coomasie donde se puede apreciar que los carriles están cargados con aproximadamente la misma cantidad de proteína.

Con estos experimentos se observó que al aumentar la concentración de la fumonisina, aumenta la fosforilación de las proteínas de 29 y 18 kDa. Observamos también que existe una fosforilación de proteínas en las bandas de 85, 65, 48, y 9 kDa respectivamente.

## VII. Efecto de los inhibidores o activadores de cinasas de proteínas.

Se deseaba conocer el efecto de algunos inhibidores y activadores de cinasas sobre la fosforilación que observamos que producía la FB<sub>1</sub>, reportados en la literatura (Lau et al. 1998, Takashi et al. 1994, Moon-Hwan et al. 1995). Suponíamos que el efecto que estábamos observando se debía a la presencia de cinasas de proteínas, ya que habíamos encontrado un patrón específico de fosforilación de proteínas membranales dependiente de la concentración de AT-<sup>32</sup>P, que cambiaba también en función de las concentraciones de calcio y FB<sub>1</sub>, por ende, deseábamos saber el efecto de algunos inhibidores de cinasas y de un activador (Ver Material y Métodos punto VII) para tener más información sobre el o los tipos de cinasas que estaban participando en nuestras reacciones de fosforilación (Figs. 23 y 24). Como en todos los experimentos, se muestra el gel teñido con coomassie en donde se puede apreciar que los carriles están cargados con aproximadamente la misma cantidad de proteína, control necesario para asegurar que las diferentes intensidades de las bandas observadas en la autoradiografía se deben al efecto de la fosforilación y no son un artefacto producido por la cantidad de proteína cargada al gel. De los experimentos anteriores se observó que la actividad de fosforilación parece corresponder en su mayoría a cinasas que fosforilan residuos de serina / treonina, ya que al agregar la estaurosporina tenemos una inhibición casi completa de la fosforilación de las proteínas, ya que se observa una disminución importante en la intensidad de las bandas (Fig. 24).

Se observa también que al agregar PMA a una concentración de 1 μM, la intensidad de las bandas aumenta, lo cual quiere decir que alguna o algunas de las cinasas que participan

en éste proceso de fosforilación, son cinasas de proteínas tipo C, esto se ve muy claro con la banda de  $\approx 30$ kDa.

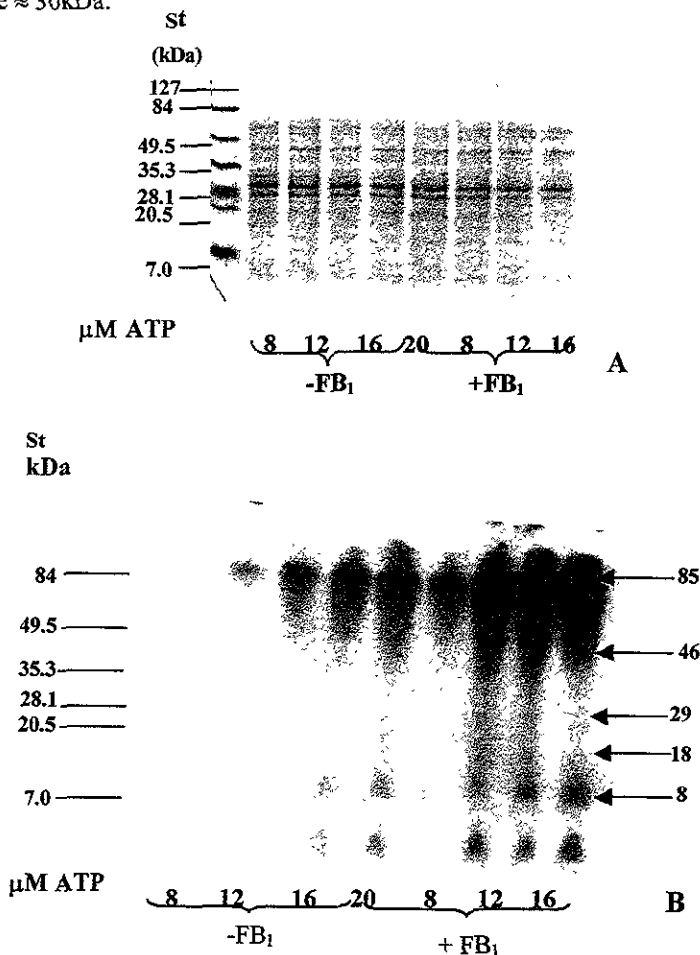


Fig. 21. Efecto de la concentración de  $AT^{32}P$  y de la fumonisina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, los carriles 1 y 10 se cargaron con 6.25  $\mu$ g del estándar de peso molecular. Los carriles 2-5 tienen membranas sin FB<sub>1</sub> y con concentraciones de ATP de 8, 12, 16 y 20  $\mu$ M respectivamente. Los carriles 6-9 tienen membranas incubadas con 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> y concentraciones de ATP de 8, 12, 16 y 20  $\mu$ M de ATP respectivamente. Todas las muestras tenían una concentración de 10  $\mu$ M de calcio, 0.015% de Brij No. 58 y todas tenían un tiempo de reacción de 10'. Todos los pozos se cargaron con 25  $\mu$ g de proteína. El gel se dejó correr 1 hora a 35V, 3 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 30 min. La figura A es el gel teñido con azul de coomasie, la figura B es la autoradiografía del gel con un tiempo de exposición de 7 días.

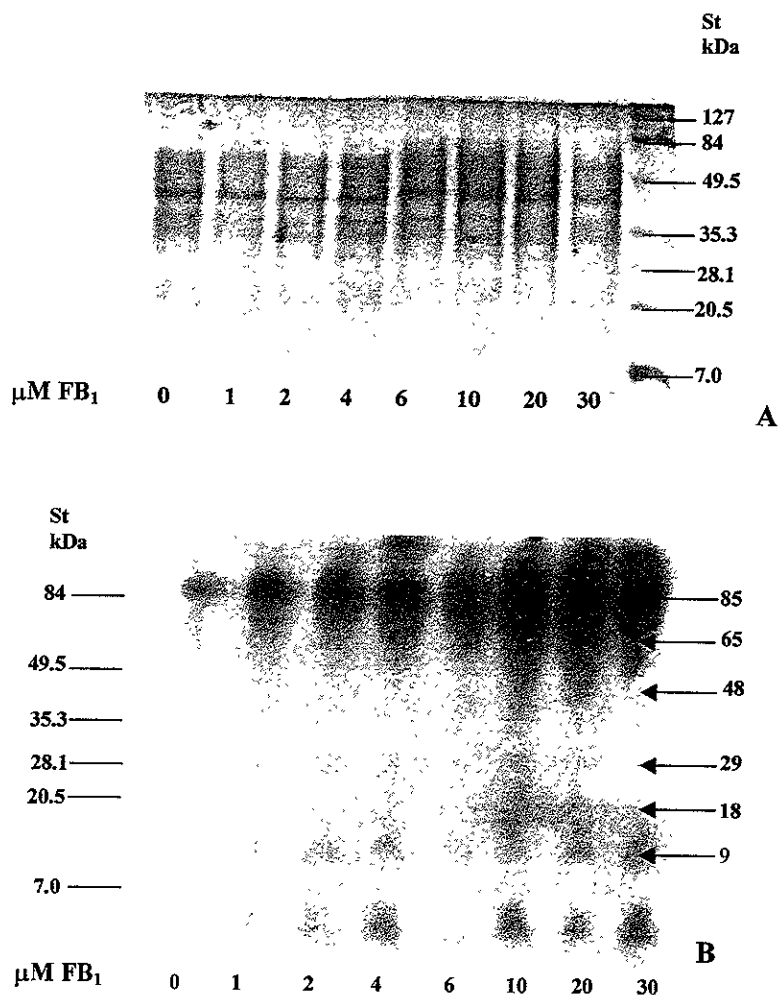
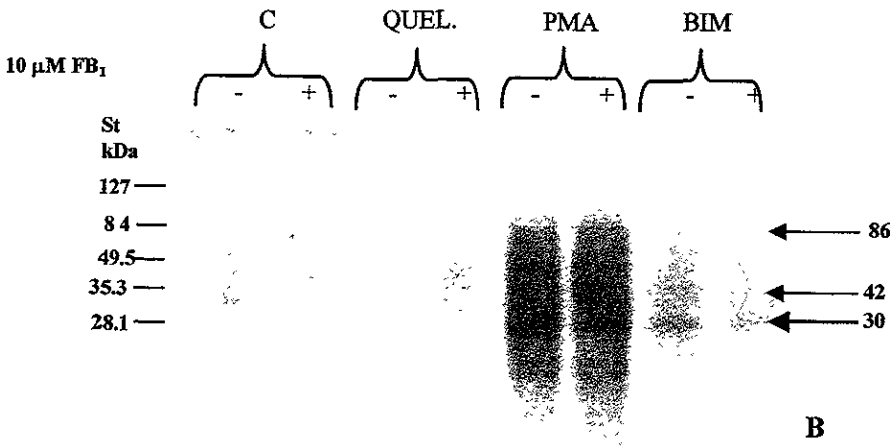
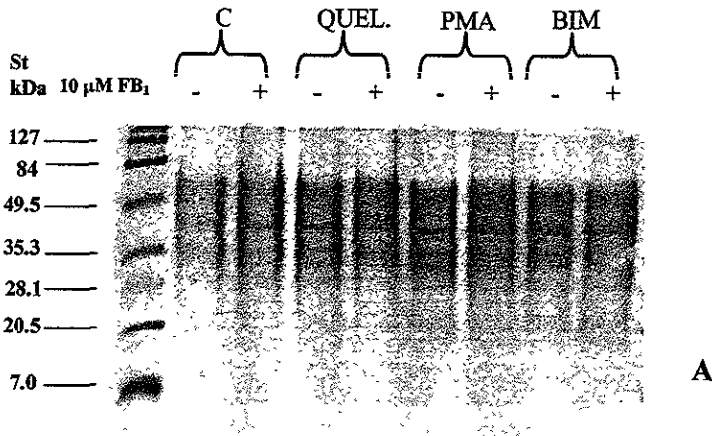


Fig. 22.- Efecto de la concentración de Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, los carriles 1 y 10 se cargaron con 6.25  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular, el carril 2 es la muestra sin FB<sub>1</sub>, los carriles 3-9 tienen membranas incubadas con 0, 1, 2, 4, 6, 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$  de FB<sub>1</sub> respectivamente. Todas las muestras tenían una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de calcio, 0.015% de Brij No. 58 y todas tenían una concentración de AT<sup>32</sup>P de 16  $\mu\text{M}$ . Todos los pozos se cargaron con 25  $\mu\text{g}$  de proteína. El gel se dejó correr 1 hora a 35V, 3 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 30 min. La figura A es el gel teñido con azul de coomasie, la figura B es la autoradiografía del gel con un tiempo de exposición de 7 días.

Al agregar cloruro de queleritrina  $1\mu\text{M}$  y bisindolilmaleimida  $0.1\mu\text{M}$ , se observó que no había ningún cambio en el patrón de fosforilación, lo cual puede deberse a que las concentraciones de estos inhibidores no son las óptimas para la inhibición de estas cinasas que están participando o que no son tan específicos para las cinasas de tipo C como el activador.





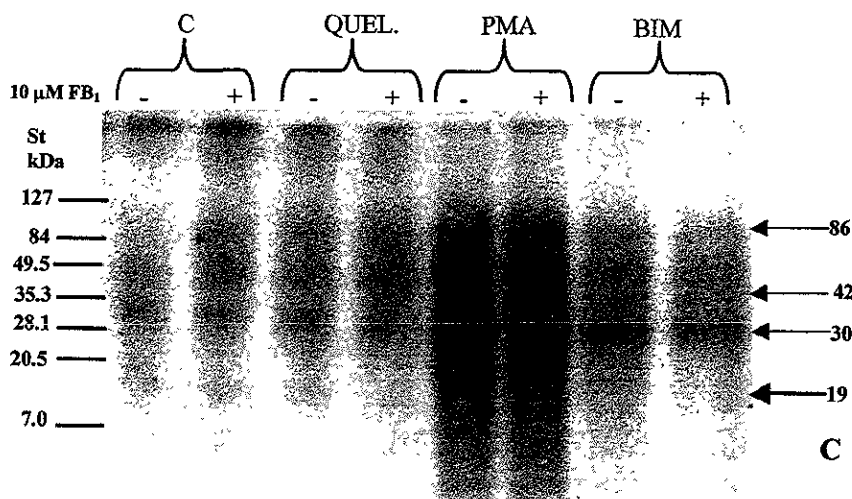


Fig. 23. Efecto de distintos inhibidores y activadores sobre la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, los carriles 1 y 10 se cargaron con 6.25  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular, los carriles 2, 4, 6 y 8 son las muestras sin  $\text{FB}_{1}$ , son las muestras control, con cloruro de quelitrina 1  $\mu\text{M}$ , PMA 1  $\mu\text{M}$  y bisindolilmaleimida 0.1  $\mu\text{M}$ , los carriles 3, 5, 7 y 9 son las muestras con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_{1}$ , son las muestras con cloruro de quelitrina 1  $\mu\text{M}$ , PMA 1  $\mu\text{M}$  y bisindolilmaleimida 0.1  $\mu\text{M}$ . Todas las muestras tenían una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de calcio, 0.015% de Brij No. 58 y todas tenían una concentración de  $\text{AT}^{32}\text{P}$  de 16  $\mu\text{M}$ . Todos los pozos se cargaron con 25  $\mu\text{g}$  de proteína. El gel se dejó correr 1 hora a 35V, 3 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 30 min. La figura A es el gel teñido con azul de coomasie, la figura B es la autoradiografía del gel con un tiempo de exposición de 7 días en donde se muestra la banda de aproximadamente 30k Da, y la figura C es la misma autoradiografía en la que se observa más claramente la desaparición de la banda de aproximadamente 19 kDa y tiene un tiempo de exposición de 15 días.

Se observó también que el patrón de fosforilación se veía disminuido en gran proporción al agregarle estaurosporina a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ ; la estaurosporina es un inhibidor de amplio rango de proteínas cinasas de Ser/Thr, por ende, se puede decir que la mayoría de las proteínas cinasas que participan en este proceso de fosforilación son proteínas que fosforilan en residuos de serina o treonina, este efecto se ve acentuado en la banda de  $\approx 20$  kDa que desaparece totalmente al agregársele la estaurosporina,

también desaparece al agregar bisindolilmaleimida 1  $\mu\text{M}$  que es un inhibidor de cinasa C, por lo que podríamos decir que se trataba de una proteína fosforilada por una cinasa C, sin embargo, no se inhibió por el cloruro de queleritrina, el cual es selectivo para la cinasa C, quizás se necesitaba una mayor concentración de cloruro de queleritrina para observar la inhibición.

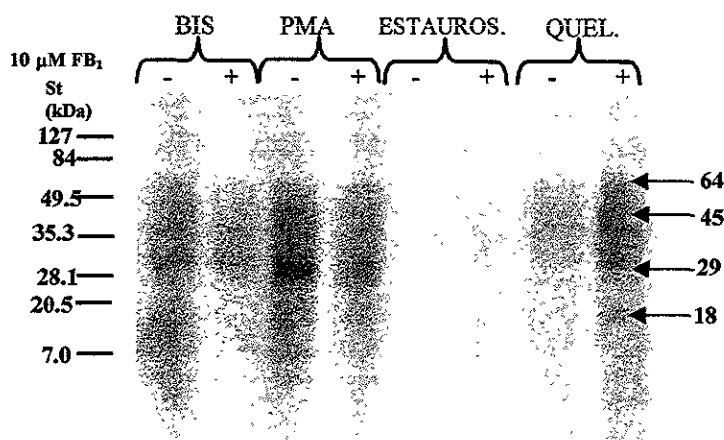


Fig. 24. Efecto de la estaurosporina sobre la fosforilación de proteínas de membrana plasmática. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en *Materiales y Métodos*. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, los carriles 1 y 10 se cargaron con 6.25  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular, los carriles 2, 4, 6 y 8 son las muestras sin  $\text{FB}_1$ , con 0.1  $\mu\text{M}$  de bisindolilmaleimida, 1  $\mu\text{M}$  de PMA, 1  $\mu\text{M}$  de estaurosporina y 1  $\mu\text{M}$  de cloruro de queleritrina respectivamente. Los carriles 3, 5, 7 y 9 son las muestras incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ , con 0.1  $\mu\text{M}$  de bisindolilmaleimida, 1  $\mu\text{M}$  de PMA, 1  $\mu\text{M}$  de estaurosporina y 1  $\mu\text{M}$  de cloruro de queleritrina respectivamente. Todas las muestras tenían una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de calcio, 0.015% de Brij No. 58 y todas tenían una concentración de  $\text{AT}^{32}\text{P}$  de 16  $\mu\text{M}$ . Todos los pozos se cargaron con 25  $\mu\text{g}$  de proteína. El gel se dejó correr 1 hora a 35V, 3 horas a 60V. El tiempo de tinción fue de 30 min. Se realizó la autoradiografía; el tiempo de exposición fue de 15 días.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron diversos ensayos cuyo propósito fue el de encontrar el patrón de fosforilación de proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz en germinación y el efecto que producía en dicha fosforilación una toxina fúngica como lo es la FB<sub>1</sub>.

Se encontró una fosforilación por cinasas endógenas, una independiente de Ca<sup>++</sup> que es capaz de fosforilar la banda de 85 kDa y, la mayoría, estimulada por Ca<sup>++</sup> produciendo la fosforilación de las bandas de 67, 46, 40, 32 y 28 kDa, ver Fig.17. Se observó que la intensidad de las bandas aumentaba conforme aumentaba la concentración de calcio, la cual se varió entre 0 y 20 µM.

Por la literatura se sabe que hay varias cinasas de proteínas que requieren de Ca<sup>++</sup> para su función (Boyer y Krebs 1986, Ranjeva et al. 1984, Verhey et al. 1993, Xing et al. 1996). También se tiene conocimiento de procesos de fosforilación en proteínas de la membrana plasmática de plantas (Lino et al. 1998, Suzuki et al. 1992, Verhey et al. 1993, Xing et al. 1996).

En el ensayo realizado con Brij 58 al 0.015% no se encontraron diferencias significativas en la intensidad de las bandas de las muestras a las que se les había agregado el detergente, con respecto a aquellas a las que no se les había agregado el Brij. Se conservó el patrón de bandas en donde se observó la fosforilación independiente de Ca<sup>++</sup> de la banda de 87 kDa y de las bandas estimuladas por éste (bandas de aproximadamente 62, 47, 29, 21 y 8 kDa). El que no se hallan encontrado diferencias con respecto a las muestras con y sin Brij puede deberse a que la mayoría de muestras vesículas se encontraban tanto con los sitios activos de las cinasas accesibles al AT<sup>32</sup>P como con los sitios activos de las proteínas accesibles a las

cinastas, ésto lo suponemos, ya que de lo contrario, se hubieran encontrado diferencias significativas con el detergente.

Al realizar el experimento en el que se agregaba la FB<sub>1</sub> a las vesículas de membrana plasmática, se observó que la FB<sub>1</sub> estimulaba la fosforilación de las proteínas de las VMP (Fig. 19), ya que las muestras que se habían puesto en contacto con la toxina presentaban una mayor intensidad en las bandas de proteína que se observaron en la autoradiografía; se observó también, como ya se había visto, que a mayor concentración de Ca<sup>++</sup> la intensidad de algunas bandas aumentaba. Se observó una mayor intensidad en las bandas que ya estaban presentes, más no la aparición de nuevas bandas, lo que quiere decir que la FB<sub>1</sub> solo estimula la fosforilación de proteínas que anteriormente ya estaban fosforiladas, quizás uniendo al PO<sub>4</sub> en sitios de esas mismas proteínas que antes no estaban fosforilados, o bien, estimulando a las fosfatasa para defosforilar ciertos sitios y permitiendo a su vez, que las cinastas fosforilen al agregárseles AT-<sup>32</sup>P exógeno. Lo anterior se confirma con el experimento en el cual se agregaron diferentes concentraciones de la toxina (ver Fig. 22). En dicho experimento se observa que conforme se aumenta la concentración de FB<sub>1</sub>, la intensidad de las bandas fosforiladas se ve aumentada, lo cual quiere decir que la FB<sub>1</sub> sí está induciendo una mayor fosforilación, en dicho experimento se aprecia este efecto en las bandas de 88, 65, 48, 29, 18 y 9 kDa.

Este efecto podría explicarse porque al haber contacto entre la toxina y la membrana plasmática, se lleven a cabo una serie de interacciones entre el metabolito secundario producido por el patógeno y la membrana plasmática de las células del huésped, dando como resultado el que se desencadenen algunos mecanismos de señales, uno de los cuales, sería la activación de cinastas de proteínas. Al ser activadas, éstas comenzarían a fosforilar proteínas de la membrana plasmática o a ellas mismas, inclusive. Este proceso sería

estimulado por calcio a concentraciones micromolares. La fosforilación de estas proteínas desencadenaría otro tipo de acciones en la célula, podría, por ejemplo, activar alguna vía metabólica o la síntesis de algún compuesto que fuera necesario en ese momento para contrarrestar el ataque del patógeno. Quizás también, apagarían alguna señal que estuviese prendida, como por ejemplo, la desactivación de la vía de síntesis de algún otro compuesto innecesario en ese momento, etc. Obviamente, al realizar los experimentos con vesículas de membrana plasmática, ésto no sucedería, ya que tenemos las vesículas aisladas y no se encuentra toda la maquinaria celular. En nuestro sistema, las cinasas tendrían el magnesio exógeno como cofactor para sus reacciones de fosforilación y dispondrían del calcio que se les agrega en concentraciones controladas de calcio libre. No sabemos qué otros procesos están implicados, como por ejemplo, la participación de fosfatasas, ni la acción de la FB<sub>1</sub> en otros posibles blancos celulares, un experimento que resultaría interesante es el de observar el efecto de la adición de FB<sub>1</sub> *in vivo*, agregando la toxina a los embriones en germinación para entonces extraer las vesículas de membrana plasmática a las que se les realizaran los ensayos de fosforilación y comparar el número y peso molecular de las bandas fosforiladas encontradas en esos experimentos.

Se tiene conocimiento de que algunas toxinas desencadenan procesos de fosforilación (Bidway and Takemoto 1987, Schaller and Sussman 1988). Nuestros datos indican que la FB<sub>1</sub> también puede ser capaz de desencadenar procesos de fosforilación, a nivel de las proteínas de la membrana plasmática.

Se observó también que la fosforilación no depende del tiempo de reacción de las membranas con el AT<sup>32</sup>P, por lo menos, cuando éste va de 0-20 minutos, si dependiera del tiempo de reacción, esperaríamos que la intensidad de las bandas se viera aumentada con respecto al tiempo; los resultados indican que 5 min. son suficientes para que se fosforilen

todos los sitios posibles y no es necesario dejar más tiempo la reacción; quizás si se dejara más tiempo, se podrían llevar a cabo procesos de defosforilación que permitieran una posterior fosforilación *de novo* o procesos de fosforilación que fueran dependientes de tiempos más largos y que no necesariamente dependen del mismo tipo de cinasas que actúan a tiempos cortos (ver Fig. 20).

Al aumentar la concentración de ATP se observó un aumento en la intensidad de las bandas, ésto es lo esperado, ya que tenemos más sustrato marcado que puede saturar los sitios activos de las cinasas, las cuales pueden tener constantes de asociación para el sustrato mayores de  $1\mu\text{M}$ . La concentración de  $\text{AT}^{32}\text{P}$  elegida fue de  $16\mu\text{M}$  debido a que con esta concentración la intensidad de las bandas se observa muy bien sin aumentar demasiado, de otra manera, las bandas que se fosforilan más se observarían como manchones y no como bandas aisladas. Observamos también, que aquellas muestras a las cuales se les había agregado fumonisina  $\text{B}_1$ , presentaban también un aumento en la fosforilación (ver Fig. 21).

El marcaje de proteínas observado puede explicarse por la acción de cinasas membranales endógenas pues estamos trabajando con una preparación subcelular ausente de factores citoplásmicos. Al agregar la estaurosporina a una concentración final de  $1\mu\text{M}$ , la fosforilación se ve reducida sin inhibirse totalmente. La estaurosporina es un inhibidor de amplio rango de cinasas de proteínas que reaccionan con residuos de serina-treonina, lo que quiere decir que en la fosforilación de proteínas de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz, participan cinasas de proteínas en residuos de Ser/Thr. Lo anterior concuerda con los datos de la literatura, ya que se sabe que en plantas la fosforilación ocurre más abundantemente en residuos de Ser y Thr, que en Tyr (Trojanek et al. 1996).

Es posible que en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz intervengan también una o varias proteínas cinasas de tipo C, ya que al agregar PMA a una concentración de  $2 \mu\text{M}$  se aumenta la intensidad de las bandas; el PMA es un activador de cinasas tipo C, por lo tanto, podemos sugerir que en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática intervienen también una o varias cinasas de proteínas de tipo C y aunque no se puede determinar específicamente el número de cinasas, lo que si apoya la información anterior y que nos sugiere que efectivamente se trate de cinasas de tipo C, es el hecho de que la mayoría de las cinasas de tipo C son dependientes de calcio y las fosforilaciones que se encontraron en estos experimentos lo son, ciertamente (aunque no para la banda de 85kDa). Se deben realizar más experimentos sobre esto, para corroborar lo anterior y posteriormente, identificar las cinasas participantes en dicho proceso de fosforilación. También sería de suma importancia el realizar experimentos para identificar a las proteínas que son sustratos de esas cinasas, ya que de esta manera tendríamos una idea mucho más completa de el probable mecanismo de señalización que se estaría presentando en nuestras membranas en estudio.

Con respecto a la acción del cloruro de queleritrina y la bisindolilmaleimida, éstas parecen no afectar el patrón de fosforilación, ya que la intensidad de las bandas no se ve modificada en las muestras a las que se les agregó cloruro de queleritrina a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  y bisindolilmaleimida a una concentración de  $0.1 \mu\text{M}$ . Esto no es consistente con los resultados anteriores, ya que ambos compuestos son inhibidores de cinasas tipo C y, como se había observado un aumento en la fosforilación de las muestras a las que se les había agregado PMA, se esperaba que hubiera una inhibición en la fosforilación de las muestras a las que se les había agregado cloruro de queleritrina y

bisindolilmalimida respectivamente. Ésto no sucedió y podría deberse a que las cinasas de la preparación no se inhiben por las concentraciones utilizadas aunque estas concentraciones si se encuentran en el intervalo de concentraciones reportadas en la literatura. Si aumentáramos la concentración de los inhibidores se podría evaluar esta posibilidad. Por otro lado, puede ser que los inhibidores no sean tan específicos como el activador (ver Figs. 23 y 24). Un problema técnico en el conjunto de experimentos realizados con los inhibidores de cinasas en este trabajo, fue el de que hubo menor fosforilación de las bandas en general, a pesar de que se hicieron varias repeticiones, ésto contribuye a no definir claramente los efectos de los compuestos utilizados y por tanto, la identificación de las cinasas no es muy precisa.

En todos los geles se observa que el patrón electroforético obtenido con la tinción de azul de coomasie que consta de alrededor de 15 bandas, no es el mismo que el observado en las autoradiografías que se compone de cerca de 6 bandas, esto se debe a que no todas las proteínas presentes en las membranas plasmáticas de embriones de maíz se fosforilan bajo estas condiciones; es por eso que se observan muchas mas bandas en el gel teñido con azul de coomasie a comparación con las bandas observadas en las autoradiografías, ya que en el gel se encuentran todas las proteínas presentes en nuestra muestra y en la autoradiografía sólo las fosforiladas. Por otra parte, las intensidades de las bandas observadas con azul de coomassie no corresponden a las intensidades de las bandas que se ven en la autoradiografía, es decir, una banda más fosforilada no necesariamente es la banda mas teñida en el gel, lo cual es congruente porque aunque haya una mayor cantidad de una proteína en particular, no necesariamente quiere decir que es la proteína que más se va a fosforilar.



## CONCLUSIONES

### CONCLUSIÓN GENERAL

La toxina Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) producida por el hongo *Fusarium moniliforme*, estimula la fosforilación de proteínas de aproximadamente 85, 50, 28, 20 y 8 kDa de la membrana plasmática de embriones de maíz en germinación.

### CONCLUSIONES PARTICULARES

- 1) Existe fosforilación de proteínas de membrana plasmática por cinasas endógenas, una independiente de calcio en la proteína de aproximadamente 85 kDa y, la mayoría estimulada por Ca<sup>++</sup> en proteínas de aproximadamente 67, 46, 40, 32 y 28 kDa.
- 2) La FB<sub>1</sub> induce el aumento de los procesos de fosforilación a nivel de membrana plasmática, principalmente en las proteínas de 28 y 20 kDa.
- 3) La fosforilación no depende del tiempo de reacción de las membranas con el AT<sup>32</sup>P, cuando éste va de 0-20 min.
- 4) Al aumentar la concentración de ATP, aumenta la reacción de la fosforilación de proteínas.
- 5) En la fosforilación de proteínas de membrana de embriones de maíz, participan cinasas de proteínas que fosforilan en residuos de Ser/Thr.
- 6) Existe una posible intervención de una o varias cinasas de tipo C.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### LIBROS

#### BIOLOGÍA AMBIENTAL

Barrington E.

Editorial Omega.

1ª Edición, Barcelona 1983.

#### THE ENZYMES

Boyer Paul, Krebs Edwin.

Vol. XVII. Control by Phosphorylation, part A.

3ª edición. Academic Press. UK, 1986.

#### MOLECULAR PLANT PATHOLOGY

A Practical Approach Vol.I

Gurr, McPherson, Bowies

The Practical Approach Series. IRL Press.

Oxford University Press, 1992.

#### GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS

A practical approach.

Hames B.D. and Rickwood D.

The Practical Approach Series.

Oxford University Press, 1990.

#### FUNGAL-PLANT INTERACTIONS

Isaac Susan

Chapman Hall

1<sup>st</sup> edition, UK. 1991.

#### THE PLANT PLASMA

STRUCTURE, FUNCTION AND MOLECULAR BIOLOGY

Larsson, C & Møller I M.

Springer - Verlag

Germany, 1990.

#### MOLECULAR BIOLOGY OF MEMBRANES

Structure and Function

Pretty, H

Plenum Press, USA 1993.

**BIOLOGY OF PLANTS**

Raven P, Evert R.  
5a edición. USA 1992.

**METHODS IN ENZYMOLOGY**

Sidney P. Colowick y Nathan O. Kaplan.  
Vol 148. Plant Cell Membranes.  
Academic Press, INC  
UK 1987.

**BIOQUIMICA**

Stryer Lubert  
3ª edición. España 1993.  
Editorial Reverté. Tomos I y II.

**CALCIUM AND CELL FUNCTION**

Cheung Wal  
Vol IV  
Academic Press.  
1983, USA.

**PROTEIN KINASES**

Woodgett, James.  
IRL Press, Oxford University Press.  
U.K. 1994

**REVISTAS**

Abo-El-Saad M and Wu R (1995) A rice membrane calcium-dependet protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol.* 108: 787-793.

Alberts JF, Gelderblom WCA., Thiel PG, Marasas WFO, Van Schalkwyk DJ and Behrend Y (1990) Effects of temperature and incubation period on production of Fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Env. Microbiol.* 56:1729-1733.

Baskin T and Wilson J (1997) Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol.* 113: 493-502.

Bidway AP and Takemoto JY (1987) Bacterial phytotoxin, syringomicin induces a protein kinase-mediated phosphorylation of red beet plasma membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6755-6759.

Blowers D and Trewavas A (1989) Rapid cycling of autophosphorylation of a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin regulated plasma mebrane located protein kinase from pea. *Plant Physiol.* 90: 1279-1285.

Desikan R, Hancock J, Coffey M and Neill S (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* 382: 213-7.

Desjardins A and Hohn T (1997) Mycotoxins in plant pathogenesis. *MPMI* 10: 147-152.

Doehlert D, Knutson C, Vesonder R. (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B<sub>1</sub> on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127: 117-121.

Ellis J and Jones D (1998) Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Plant Biol.* 1: 288-293.

Famulski K and Paterson M (1999) Defective regulation of Ca<sup>++</sup>/ calmodulin-dependent protein kinase II in  $\gamma$ -irradiated ataxia telangiectasia fibroblasts. *FEBS Lett.* 453: 183-6.

Gavilanes Ruiz M. y García Rubio O. (1995) Bombas iónicas impulsadas por ATP en las membranas plasmáticas de animales y plantas. *Mensaje Bioquímico*.XXII Taller de Actualización de Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM 19: 193-208

González de la Vara L and Medina G (1990) Phosphorylation by inorganic phosphate of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from red beet (*Beta vulgaris L.*). *Plant Physiol.* 94:1522-1527.

Hammond-Kosack, Kim E and Jones J (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.

Hers I, Tavaré J and Denton R (1999) The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. *FEBS Lett.* 460:433-6.

Huang Y, Zhang A, Lau C and Chen Z (1998) Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechuc derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63: 275-283.

Iwata Y, Kuriyama M, Nakakita M, Kojima H, Ohto M and Nakamura K (1998) Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. *Plant Cell Physiol.* 39: 1176-1183.

Jackson A and Taylor C (1996) Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *The Plant Cell* 8: 1651-1668.

Kedera CJ, Plattner RD and Desjardins AE (1999) Incidence of *Fusarium* spp. and levels of Fumonisin B<sub>1</sub> in maize in Western Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 41-44.

Knogge W (1996) Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722.

Lino B, Baizabal-Aguirre V and González de la Vara L (1998) The plasma-membrane  $H^+$ -ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 204: 352-359.

Merril A (1994) Sphingosine and other long-chain bases that alter cell behavior. *Currents Topics in Membranes* 40: 361-386.

Mun-Hwan P and Quae chae (1990) intracellular protein phosphorylation in oat (*Avena sativa* L.) protoplasts by phytochrome action: involvement of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 1185-1190.

Nelson P, Desjardins A and Plattner R (1993) Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 233-252.

Ranjeva R and Boudet M (1982) Phosphorylation of proteins in plants: Regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 73-93

Ranjeva R, Graziana A, Ranty B, Cavalié G and Boudet M (1984) Phosphorylation of proteins in plants: A step in the integration of extra and intracellular stimuli?. *Physiol. Veg.* 22: 365-377.

Schaller GE, Sussman MR (1988) Phosphorylation of the plasma-membrane  $H^+$ -ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173:509-518.

Scheel Dierk. Resistance response physiology and signal transduction. *Plant Biology*, 1: 305-310.

Shiina T, Niishi A, Toyoshima Y and Bogorad L (1997) identification of promoter elements involved in the cytosolic  $Ca^{++}$  mediated photoregulation of maize cab-m1 expression. *Plant Physiol.* 115: 477-83.

Suzuki Y, Wang Y and Takemoto J (1992) Syringomicin-stimulated phosphorylation of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from red beet storage tissue. *Plant Physiol.* 99: 1314-1320.

Takashi N, Watara T, Miho K, Yoshikiyo O, Setsuko S, Yasoo F and Ushio K (1994) Purification and characterization of protein kinase C from higher plant, *Brassica campestris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 311-318.

Trojanek J, Scoble EKP, Musyńska G, Engström L (1996) Tyrosine phosphorylation in proteins of maize seedlings. *Plant Physiol.* 111: 857-865.

Van der Hoeven P, Siderius M, Korthout H, Drabkin A and De Boer A (1996) A calcium and free fatty acid-modulated protein kinase as putative effector of the fusicoccin 14-3-3 receptor. *Plant Physiol.* 111: 857-65.

Vera-Estrella R, Bronwyn J, Higgins VJ and Blumwald E (1994) Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host-plasma membrane  $H^+$ -ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* 104: 209-215

Vera-Estrella R, Higgins VJ and Blumwald E (1994) Plant defense response to fungal pathogens. II. G-Protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiol.* 106: 97-102

Verhey S, Gaiser JC and Lomax T (1993) Protein kinases in Zucchini. Characterization of calcium-requiring plasma membrane kinases. *Plant Physiol.* 103: 413-419.

Walton J (1996) Host-selective toxins: Agents of compatibility. *The Plant Cell* 8: 1723-1733.

Waring M, Drappatz J, Weichel O, Seimetz P, Sari E, Bockmann I, Kempter U, Valeva A and Klein J (1999) modulation of neuronal phospholipase D activity under depolarizing conditions. *FEBS Lett.* 464: 21-27.

Xing T, Higgins V and Blumwald B (1996) Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *The Plant Cell* 8: 555-564.

Zhang X and Chollet R (1997) Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a  $Ca^{++}$  dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 410: 126-130.