

00551

2



296586

**CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE p33 y p36, DOS
PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR, CON LA MEMBRANA
PLASMÁTICA DE *Phaseolus vulgaris*.**

Tesis para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas.

Marina E. Battaglia Rossi.



Instituto de Biotecnología.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO.

MÉXICO, 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Quiero agradecer a Alejandra Covarrubias por darme la posibilidad de realizar esta tesis en su laboratorio, por su apoyo y sus enseñanzas.

A mi comité tutorial de tesis; a la Dra Ivonne Rosenstein, al Dr Federico Sánchez y al Dr Gustavo Pedraza.

A mis compañeros del laboratorio: Wendy, Sonia, Adriana, María de la Paz, Rosy, Pepe, Pancho, Erika, Isadora.

A Patricia Rueda por su ayuda con el manejo del cultivo de células en suspensión.

A Rosario Vera por su colaboración en los experimentos de medición de actividad ATPasa.

A Jose Luis Citla por el cuidado de las plantas de frijol.

ABREVIATURAS.

+/- ABA	ácido absísico, mezcla de isómeros.
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato.
BSA	seroalbúmina bovina.
DTT	DL-ditioneitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido N,N,N',N' - etilenglicol-bis(β-aminoetileter) tetraacético
.MES	ácido 2-[N- morfolino] etano sulfónico
NBT	cloruro de p- Nitro blue tetrazolio
PBS	(phosphate buffered saline solution) solución salina de fosfatos.
pl	punto isoeléctrico
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVP	polyvinylpyrrolidone
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
SDS	dodecil sulfato de sodio
TBS	solución buffer de Tris.

INDICE

INTRODUCCION.	1
LA PARED CELULAR EN LAS CÉLULAS VEGETALES.	
Función	2
Etapas de formación de la pared.	2
Composición de la pared primaria vegetal.	3
COMPUESTOS QUE FORMAN LA PARED PRIMARIA.	
POLISACÁRIDOS.	
Celulosa	4
Hemicelulosas y pectinas.	5
PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR.	
Enzimas de la pared celular.	8
Proteínas estructurales de la pared celular.	8
Proteínas ricas en Hidroxiprolina (HRGPs).	9
Proteínas ricas en Prolina (PRPs).	10
Proteínas ricas en Glicina (GRPs).	13
Proteínas Arabinogalactanas (AGPs).	14
PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA PARED CELULAR	
Proteínas asociadas a la pared celular con actividad de cinasa (WAKs).	16
INTERACCIONES ENTRE LA PARED CELULAR Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	17
Estructuras en la pared celular.	
Plasmodesmos	17
Cambios en el estado hídrico de las células vegetales.	18

Modelos que explican los sitios de adhesión que se observan durante la plasmólisis.	19
Proteínas de la pared celular que interaccionan con la membrana plasmática	20
Extensinas.	20
Proteínas ricas en glicina (GRPs).	21
Proteínas ricas en prolina (PRPs).	22
DÉFICIT HÍDRICO	
Mecanismos para sobrevivir el déficit hídrico.	23
ABA: Hormona que interviene en la respuesta al estrés.	24
ANTECEDENTES.	26
HIPOTESIS.	26
OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES.	26
RESULTADOS.	27
1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL.	28
1.1. Presencia de p33/p36 en el cultivo celular.	28
1.2. Efecto del tratamiento con ABA sobre p33/p36 en el cultivo celular de frijol.	30
2. INTERACCIÓN DE P33 Y P36 CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA <i>IN VITRO</i>.	
2.1. Optimización de la inmunoprecipitación.	33
2.2. Las inmunoprecipitaciones muestran que las proteínas p33 y p36 interaccionan con otras proteínas <i>in vitro</i> .	35
2.3. El patrón de proteínas que inmunoprecipita junto a p33 y p36 a partir de tejidos de plántulas sometidas a condiciones de estrés hídrico es ligeramente diferente si lo comparamos con el de riego. En hoja el patrón de proteínas del complejo que inmunoprecipita	36

<i>in vitro</i> , es diferente al de que se observa en la plántula y se modifica por tratamientos de sequía.	
2.4. p33/p36 se detectan en fracciones de membrana plasmática.	42
2.5. Las fracciones de p33 y p36 que se mantienen asociadas a la membrana plasmática, permiten una asociación de proteínas diferente <i>in vitro</i> .	42
2.6. El complejo que inmunoprecipita es dependiente de la cantidad de extracto total y no de la fracción microsomal.	44
2.7. El complejo que inmunoprecipita <i>in vitro</i> , es dependiente no sólo de p33 y p36, sino de otro factor presente en el extracto proteico total.	46
DISCUSIÓN.	49
MATERIALES Y MÉTODOS.	56
BIBLIOGRAFÍA.	68

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Presencia de las proteínas p33 y p36 en el cultivo celular.	29
FIGURA 2: Comparación entre el patrón proteico de la semilla inmadura y el medio de cultivo de células en suspensión.	29
FIGURA 3: Cinética de tratamiento con ABA a un cultivo celular de frijol en suspensión.	31
FIGURA 4: Inmunoprecipitación de p33/p36 marcadas con biotina utilizando distintas diluciones de suero de conejo anti p33/p36.	34
FIGURA 5: Proteínas inmunoprecipitadas a partir de extractos marcados con biotina.	39

FIGURA 6: El patrón proteico que inmunoprecipita a partir de tejido sometido a estrés hídrico es ligeramente diferente al que se obtiene de tejido en condiciones de riego óptimo.	40
FIGURA 7: Inmunoprecipitaciones realizadas con extractos de hojas de plantas de frijol sometidas a condiciones de riego óptimo y sequía.	41
FIGURA 8: Presencia de p33/36 en la membrana plasmática de plántulas de frijol, sometidas a estrés hídrico.	43
FIGURA 9: La inmunoprecipitación de la fracción membranal, sin el agregado de extracto proteico total muestra un patrón de proteínas diferente.	45
FIGURA 10: Inmunoprecipitación incubando extracto proteico total y fracción microsomal marcada con biotina de plántulas sometidas a estrés hídrico.	47
FIGURA 11: Inmunoprecipitación realizada con extracto proteico total y con el fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de ese mismo extracto, junto con fracción de microsomas totales biotinilados de plántulas crecidas en condiciones de estrés hídrico.	49

INTRODUCCIÓN.

LA PARED CELULAR EN LAS CÉLULAS VEGETALES.

Función.

La pared celular vegetal distingue a las células vegetales de las animales. Su función principal es proveer a la célula de forma y de soporte mecánico, lo cual le permite resistir la presión de turgencia celular. Además cumple un papel central en los procesos de crecimiento y de desarrollo, así como en el reconocimiento celular, en la interacción célula-célula y en las respuestas de defensa [Reiter, 1994].

Etapas de formación de la pared.

La formación de la pared celular en plantas superiores tiene lugar en tres etapas: la formación de la placa celular durante la división celular, el crecimiento en extensión y el crecimiento secundario. La placa celular es una estructura formada en las etapas finales de la división celular, por la fusión de vesículas derivadas del aparato de Golgi. El crecimiento de la placa celular se produce a partir de una estructura denominada fragmoplasto, el cual contiene actina, miosina y microtúbulos. Se ha propuesto que el fragmoplasto probablemente guía la expansión de la nueva pared y ayuda a su construcción. Al mismo tiempo hay un movimiento de vesículas del aparato de Golgi, que depositan proteínas y carbohidratos para formar la nueva pared. El crecimiento se produce desde el centro de la célula en división hasta conectar esta placa a la pared celular de la célula madre. Las membranas de la placa celular se fusionan con la membrana plasmática materna para completar la separación celular.

La pared celular que se forma durante el crecimiento de la célula se denomina **pared primaria**, la cual puede alcanzar un grosor de 100–200 nm. Durante el desarrollo celular la arquitectura de la pared celular se modifica de forma ordenada, reflejando cambios en las proporciones de sus componentes estructurales. Sólo algunos tipos celulares continúan la síntesis de pared celular cuando alcanzan su tamaño celular definitivo, estos tipos celulares forman la **pared secundaria** por dentro de la pared primaria. Ésta difiere de la primaria en composición y en grosor. La celulosa puede llegar a constituir el 90% de su peso seco. En algunos tejidos, como en el xilema, la lignina se incorpora contribuyendo así a la función mecánica de soporte en la planta. En tanto que el entrecruzamiento de lignina y celulosa le confiere rigidez a la pared. En algunos casos, las células que

sintetizan pared secundaria pierden el protoplasto y sólo permanece la pared celular como elemento funcional, tal es el caso de los elementos de los vasos del xilema [Reiter, 1994].

Composición de la pared primaria vegetal.

La pared celular es una compleja red de celulosa, hemicelulosas, pectinas, proteínas, agua y iones (como el calcio y el boro). Esta composición varía durante el desarrollo y durante la exposición a estreses bióticos y abióticos [Showalter, 1993]. La estructura fibrilar está formada por microfibrillas de celulosa, las cuales están embebidas en una matriz polisacárida compleja, altamente hidratada y menos ordenada que la fibrilar, que cuenta además, con pequeñas cantidades de proteínas estructurales. La pared primaria es variable en grosor y en morfología. Algunas son de arquitectura muy simple, de 100 nm de ancho, como las paredes primarias de tejidos de cebolla. Otras son más complejas, gruesas y con múltiples capas.

La pared celular primaria de plantas en crecimiento esta compuesta por: 30% celulosa, 30% hemicelulosa, 35% pectinas y entre 1-5% de proteínas por peso seco. Las gramíneas se desvían de esta proporción, aumentando la proporción de hemicelulosas (55%), y disminuyendo las pectinas (10%) [Brett, Waldron, 1996].

La celulosa constituye el elemento que determina la fuerza y es la base estructural de la pared. Las hemicelulosas se unen estrechamente a la superficie de la celulosa, uniendo o cubriendo a las microfibrillas de celulosa. Las pectinas forman un gel en el cual se embebe la red de celulosa-hemicelulosa. Se ha propuesto que previenen la agregación y el colapso de la red de celulosa, lo cual le permitiría a la pared resistir la fuerza que genera la turgencia y por otro lado, podrían participar en la modulación de la porosidad de la pared [Carpita, Gibeaut, 1993]. Sin embargo, el componente de pared más abundante es el agua, ya que constituye alrededor de las dos terceras partes de la masa total de la pared en aquellos tejidos que se encuentran en crecimiento. El mayor porcentaje de agua (75-80%) se localiza en la fase de la matriz de la pared, lo cual sugiere que esta fase tiene propiedades de un hidrogel denso [Cosgrove, 1997]. La deshidratación de la matriz de la pared, que pudiera ocurrir por situaciones de déficit de agua, podría jugar un papel directo en la inhibición del crecimiento [Cosgrove, 1997]

COMPUESTOS QUE FORMAN LA PARED PRIMARIA.

POLISACÁRIDOS.

CELULOSA.

La celulosa está compuesta de cadenas lineales de $\beta(1\rightarrow4)$ D-glucosa, formadas por 2000 a 25000 monómeros. Todos los grupos hidroxilos de la glucosa participan en los enlaces hidrógenos entre las cadenas de glucosa, lo cual genera una estructura cristalina o semicristalina. En las paredes vegetales aproximadamente 36 cadenas individuales de $\beta(1\rightarrow4)$ D-glucosa cristalizan para formar una microfibrilla [Taylor *et al.*, 2000] y llegan a alcanzar un diámetro de 5 a 30 nm [Varner, Lin, 1989]. Esta estructura microfibrilar determina las propiedades en la celulosa, como son su alta fuerza tensil, su insolubilidad, su estabilidad química y el hecho de que sean resistentes al ataque enzimático [Cosgrove, 1997].

Los genes de la celulosa sintasa (*CesA*) de algodón fueron identificados a partir su similitud con las secuencias de los genes de celulosa sintasa de bacterias. A su vez, se obtuvieron dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en celulosa, *rsw1* (*radial swelling*) e *irx3* (*irregular xylem*). Los genes correspondientes a *RSW1* e *IRX3* exhiben un alto grado de similitud con los genes *CesA* de algodón y se los considera ortólogos [Richmont, Somerville, 2000]. A partir de las secuencias de *CesA* y *RSW1* se han encontrado una superfamilia de al menos 41 genes de tipo *CesA* en el genoma de *Arabidopsis*. Basados en la predicción de la secuencia de proteínas se los puede agrupar en 7 familias: la familia de los *CesA* (donde están *RSW1* e *IRX3*) y seis familias de genes relacionados denominados de tipo celulosa sintasa pero sin función conocida. Todos ellos parecen ser proteínas integrales de membrana, aunque es posible que muchos de ellos sintetizen polisacáridos no celulósicos, entonces su ubicación no estaría en la membrana plasmática, sino asociada al aparato de Golgi [Richmont, Somerville, 2000]. La celulosa es el único polímero de la pared celular de plantas superiores que se sintetiza extracelularmente, en la membrana plasmática, allí se localiza el complejo de la celulosa sintasa. Los estudios de criofractura de la membrana plasmática han mostrado estructuras con forma de roseta asociadas a los extremos de las microfibrillas, lo que ha sugerido que estas rosetas son los sitios de síntesis de celulosa.

Las mutantes *rsw1*, *irx1* e *irx3* de *Arabidopsis thaliana*, con alteraciones en los genes que codifican para la celulosa sintasa, permitieron establecer que son isoformas especializadas requeridas para la síntesis de celulosa en pared primaria (*rsw1*) y secundaria (*irx1* e *irx3*), respectivamente. La formación de la celulosa no sólo involucra la síntesis de la cadena, sino también la cristalización de múltiples cadenas para formar la microfibrilla. El análisis de la mutante *rsw1*, sugiere que ambos procesos son independientes; si la mutante se crece a altas temperaturas, se obtiene un fenotipo anormal y no se observa la formación del complejo en roseta en la membrana plasmática. Si bien presentan actividad de glucosiltransferasa, ya que se forma el polímero de $\beta(1\rightarrow4)$ D-glucosa, este polímero es una forma no cristalina, y no se obtiene la microfibrilla como tal [Arioli *et al.*, 1998]. Éstas junto con otras observaciones, sugieren que la formación de la microfibrilla de celulosa depende de la existencia del complejo en roseta en la membrana plasmática. Otra mutante *rsw2*, muestra un fenotipo similar a *rsw1*, es decir es sensible a altas temperaturas (31 °C) y muestra defectos asociados a la producción de celulosa, pero además tiene un fenotipo muy similar a la mutante *korrigan* (mutante en el gen que codifica para la enzima endo-1,4- β -glucanasa). Se ha demostrado que *KOR* y *RSW2* son alélicos [Lane *et al.*, 2001], pero además se ha sugerido que para la formación de la microfibrilla de celulosa se requiere, no sólo de la actividad de la glucosiltransferasa (celulosa sintasa), sino además de la actividad de la endo-1,4- β -glucanasa [Lane *et al.*, 2001].

En cuanto al papel que cumple el citoesqueleto en la deposición de microfibrillas de celulosa, se ha observado una fuerte correlación entre la orientación de la red de los microtúbulos corticales y las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas en la pared. Agentes que desorganizan los microtúbulos corticales conducen a la desorganización del patrón de deposición de las microfibrillas de celulosa; sin embargo, hasta el momento, no se han identificado complejos transmembranales en donde ambas estructuras se encuentren asociadas [Reiter, 1994; Cosgrove, 1997; Delmer, 1999].

HEMICELULOSAS Y PECTINAS.

Otros polisacáridos que forman parte de la pared celular corresponden a las hemicelulosas y pectinas. A diferencia de la celulosa, éstas no tienen una estructura fibrilar y por este motivo se las puede agrupar dentro de la fase de matriz de la pared

celular. Esta matriz tiene una estructura compleja, formada por polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos. Su composición varía entre la pared primaria y la secundaria, en los distintos tipos celulares y en diferentes especies. Estas variaciones implican diferencias en la proporción y también en la estructura de los polímeros [Brett, Waldron, 1996]

Las **hemicelulosas** constituyen alrededor del 25% del peso seco de la pared primaria y se caracterizan por su habilidad de asociarse estrechamente con las microfibrillas de celulosa. Las paredes celulares de las plantas contienen dos tipos de hemicelulosas: **xiloglucanos** y **xilanos** [Reiter, 1994]. Los xiloglucanos representan la hemicelulosa más importante de las dicotiledóneas, y los xilanos lo son para las monocotiledóneas.

Los xiloglucanos tienen un esqueleto de $\beta(1\rightarrow4)$ D-glucosa ramificado con unidades de D-xilosa, las cuales pueden estar modificadas por unidades de β -D-galactosil o α -L-fucosil $(1\rightarrow2)\beta$ -D-galactosil. Las primeras observaciones sugerían que los xiloglucanos y la celulosa podían asociarse por medio de enlaces de hidrógeno no covalentes. Los modelos más recientes plantean que las microfibrillas de celulosa están cubiertas sobre su superficie y entrecruzadas por cadenas de xiloglucanos, formando una red tridimensional que contribuye a dar fuerza mecánica a la pared celular [Rose, Bennett, 1999].

Los xilanos están compuestos por un esqueleto de $\beta(1\rightarrow4)$ D-xilosa ramificado por cadenas cortas unidas en la posición O2 o en O3 de residuos de L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa o combinaciones de disacáridos de ellas. En las gramíneas también se encuentran los β -glucanos. Tienen una estructura en la que alternan β -3 y β -4-D-glucosa y se cree que junto con los arabinoxilanos pueden asociarse a la celulosa lo que podría conferir una mayor resistencia a la pared [Varner, Lin, 1989].

Las **pectinas** son los polisacáridos más solubles de la pared y pueden ser extraídos con agua caliente o con quelantes de Ca^{+2} . Como las hemicelulosas, también constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos, pero se caracterizan por contener azúcares ácidos, como el ácido galacturónico [Cosgrove, 1997]. Esta característica hace que puedan interactuar con iones. Dentro del grupo de las pectinas encontramos los homogalacturonanos o ácido poligalacturónico (PGAs), los ramnogalacturonanos de tipo I (RG I) y de tipo II (RG II); éstos últimos, altamente ramificados, constituyen la fracción de las pectinas de pared que interactúan con el boro. Se ha propuesto la formación de

ésteres de borato con apiosa, que se encuentra en los RGII. Éstos serían los responsables del entrecruzamiento de los polímeros en la pared, y aportarían mayor estabilidad a la estructura de la pared [Cassab, 1998]. Las cadenas helicoidales de los PGAs pueden condensarse por entrecruzamientos con Ca^{+2} . La cantidad de Ca^{+2} en la pared celular es variable en los distintos tejidos: los meristemos tienen baja cantidad y se incrementa a medida que la célula crece y se diferencia. Las pectinas son secretadas a la pared celular como polímeros altamente metilados; una vez localizados en la pared, las metil esterasas, presentes en la pared celular, hidrolizan los grupos metilos permitiendo así su unión a Ca^{+2} [Carpita, Gibeaut, 1993]. Al parecer las pectinas podrían formar una red independiente [Reiter, 1994].

PROTEÍNAS DE PARED CELULAR

ENZIMAS DE PARED CELULAR.

Numerosas enzimas están asociadas a la pared celular. Algunas de ellas pueden modificar a los polisacáridos de la pared celular, por ejemplo: metil esterasas, pectinasas, endoglucanasas, xiloglucan endotransglicolasas y expansinas. Otras pueden actuar sobre la pared celular de patógenos potenciales, como las quitinasas, las $\beta(1 \rightarrow 3)$ glucanasas y otras pueden modificar algunos sustratos en la pared, como las invertasas, peroxidasas, fosfatasas y deshidrogenasas. La función de muchas de estas enzimas aún no ha sido determinada, pero podrían estar relacionadas a numerosos procesos, como la modificación de la pared, el transporte de metabolitos y la señalización celular. Otras como las expansinas participan en la elongación de la pared celular. Esta lista de enzimas sugiere que la pared celular es un compartimento metabólicamente activo. Además se ha propuesto que los pequeños flujos de material a través de la membrana plasmática podrían alterar el pH de la pared, el potencial redox, la concentración de H_2O_2 , y otras condiciones, las cuales podrían modular la actividad de las enzimas de la pared [Cosgrove, 1997], así como, promover ciertas reacciones no enzimáticas.

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE LA PARED CELULAR.

Las proteínas estructurales localizadas en la pared celular son ubicuas y relativamente abundantes en las plantas terrestres y en las algas verdes. Constituyen el 10% de la pared celular [Wyatt *et al.*, 1992]. Son usualmente ricas en uno o dos aminoácidos y se caracterizan por tener dominios característicos y altamente repetitivos. Pueden estar poco o muy glicosiladas [Cassab, 1998]. Se dividen en cinco grupos o familias: glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, también conocidas como extensinas (HRGPs), proteínas ricas en prolina (PRPs), proteínas arabinogalactanas (AGPs), proteínas ricas en glicina (GRPs), y proteínas quiméricas que contienen dominios de extensinas. Existen otras proteínas de pared celular que no están clasificadas dentro de estos grupos, como las proteínas ricas en prolina, treonina y glicina, las tioninas ricas en cisteína y las proteínas ricas en histidina y triptófano, entre otras [Showalter, 1993; Cassab, 1998].

Se ha propuesto que las proteínas estructurales formarían una red independiente dentro de la matriz extracelular la cual aumentaría la fuerza mecánica de la pared celular, aunque es posible que se asocien a polisacáridos de la pared. Estas proteínas son

secretadas hacia la pared como monómeros, allí pueden mantenerse solubles o eventualmente podrían ser insolubilizadas como respuesta al desarrollo o a señales ambientales. La naturaleza de los entrecruzamientos que insolubilizan a las proteínas aún no se conoce pero las evidencias indican que podría estar involucrada una reacción mediada por peroxidasas, las cuales podrían producir enlaces intermoleculares de isoditrosina [Fry, 1986; Bradley *et al.*, 1992; Bernhardt, Tierney, 2000].

PROTEÍNAS RICAS EN HIDROXIPROLINA (HRGPs).

Estas proteínas son abundantes en las dicotiledóneas, aunque también se han encontrado en gimnospermas y en algas verdes. Son ricas en hidroxiprolina y serina, aunque pueden tener valina, tirosina, lisina e histidina. Se caracterizan por la presencia del motivo (Ser-Hyp₄)_n. Muchos de los residuos de hidroxiprolina están glicosilados con uno a cuatro residuos de arabinosa y algunas de las serinas suelen estar glicosiladas con galactosa. Son proteínas básicas, debido al alto contenido de lisinas [Showalter, 1993]. Las extensinas forman parte de este grupo y han sido las más estudiadas. En general, su expresión se regula durante el desarrollo de la planta. En el caso del frijol, se ha encontrado que sus genes se encuentran regulados transcripcionalmente en respuesta a daño, infección por patógenos y elicitores. En cuanto a la especificidad de su expresión, ésta varía de acuerdo a la planta, al tipo celular y al tejido. [Showalter, 1993]. En soja la proteína se encuentra en las capas externas de la cubierta de semillas, y en el córtex de los nódulos de la raíz. Estudios de inmunolocalización, tissue-printing e hibridación *in situ* han revelado que las extensinas se localizan preferencialmente en células de esclerénquima y del cambium, aunque también están asociadas con los tejidos del xilema y floema secundarios [Cassab, 1998].

Las extensinas se insolubilizan en la pared celular. Todavía no se conoce como se produce este proceso, aunque se proponen distintos tipos de reacciones que podrían dar lugar al entrecruzamiento intermolecular o entre moléculas de extensina y carbohidratos de pared celular. En el primer caso, se ha demostrado *in vitro* que las peroxidasas podrían llevar a cabo el entrecruzamiento de moléculas de extensina por medio del enlace covalente entre dos residuos de tirosina [Cooper, Varner, 1984; Fry, 1986; Everdeen, 1988]. También se ha propuesto que las extensinas pueden interactuar con las pectinas, ya que se ha observado la unión covalente entre pectinas (fracción RGI) y extensinas. Se ha reportado también que la deficiencia de boro en nódulos de raíz afecta la

insolubilización de glicoproteínas ricas en Hyp. El boro está asociado a la fracción RGII de pectinas, mientras que las extensinas lo están a la fracción RGI, lo cual sugiere que ambas fracciones deben estar presentes en la pared para que las extensinas se insolubilizan [Cassab, 1998]. Otra posible forma de entrecruzamiento podría producirse por la peroxidación de extensinas. Este proceso podría producirse por la exposición a especies reactivas de oxígeno. La formación de hidroperóxidos podría fácilmente iniciar reacciones en aminoácidos como Val, Pro y Lys. La capacidad de las extensinas, al igual que de las PRPs, de insolubilizarse en la pared celular se ha propuesto como un mecanismo de defensa, sirviendo de protección a la célula contra el ataque de patógenos, elicitación o daño mecánico. La acumulación de extensinas en la pared se ha sugerido que actúa como una barrera física o también podría inmovilizar a los patógenos al unirse a sus superficies. Además de su participación en la defensa de la planta frente al ataque de patógenos y daño, se ha propuesto un papel significativo durante el desarrollo [Cassab, 1998]. También se ha propuesto que las extensinas son capaces de interactuar con proteína(s) de membrana y estabilizar a los microtúbulos corticales [Akashi, Shibaoka, 1990 y 1991].

PROTEÍNAS RICAS EN PROLINA (PRPs).

Estas proteínas se consideraron durante mucho tiempo como un subgrupo dentro de las HRGPs; sin embargo, a pesar de su contenido en hidroxiprolina, las secuencias de los repetidos en la proteína son muy diferentes. Son proteínas básicas que se caracterizan por tener cantidades equimolares de prolina e hidroxiprolina y a diferencia de las extensinas se encuentran poco glicosiladas [Showalter, 1993].

Las primeras caracterizaciones se realizaron en plántulas de soja, estos estudios identificaron tres subgrupos dentro de la familia de PRPs, cada uno de ellos se caracteriza por la presencia de una secuencia representativa. Sin embargo, con el transcurso del tiempo se han encontrado proteínas ricas en prolina en distintas especies, que presentan otros motivos repetitivos distintos de los que se encuentran en soja.

Hong *et al.*, en 1987, reportó el aislamiento y caracterización del primer gen de soja que codificaba para una PRP, al cual llamó SbPRP1 [Hong *et al.*, 1987]. La secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen muestra una estructura proteica altamente repetitiva, que consiste en la presencia del pentámero PPVYK. Estudios posteriores demostraron que este gen pertenece a una pequeña familia génica representada por tres

genes (SbPRP1, SbPRP2 y SbPRP3) [Hong *et al.*, 1987; Hong *et al.*, 1990]. La expresión de esta familia génica en soja, está altamente regulada durante el desarrollo: además muestran patrones de expresión específicos de tipos celulares y tejidos específicos.

SbPRP1 se caracteriza por presentar la repetición PPVYK. Estudios de expresión del mRNA, muestran que PRP1 es la forma que más se expresa en la raíz, en las zonas maduras del hipocótilo de plántulas de 4-5 días. También se expresa en la cubierta de las semillas durante las etapas tempranas del desarrollo de la misma. En plantas de 3 semanas, su expresión se encuentra sólo en la raíz [Hong *et al.*, 1989]. En cuanto a la especificidad por tejido, hibridaciones *in situ* mostraron que SbPRP1 se expresa en tejidos vasculares (xilema y floema) del hipocótilo y en células de la epidermis de las zonas de elongación y madura del hipocótilo [Wyatt *et al.*, 1992]. También se expresa en esclereidas de la cubierta de las semillas. No se detectó expresión del mRNA en hojas maduras, ni tampoco en tallo [Wyatt *et al.*, 1992].

SbPRP2 se caracteriza por la presencia de la secuencia PPVYK y PPVEK. En plántulas de 4 días el mRNA de PRP2 se expresa en las zonas apicales y de elongación del hipocótilo y también en las raíces. En plantas de 3 semanas su expresión se encuentra en el tallo y en hojas que han terminado su expansión. También se expresa en raíces, pero mucho menos que PRP1. PRP2 se expresa en la cubierta de semillas y en los cotiledones [Hong *et al.*, 1989]. Hibridaciones *in situ* para localizar el mRNA de PRP2 mostraron que en plántulas de 4 días se localiza en el floema del hipocótilo de plántulas, en las células parenquimáticas del córtex y de la médula, y en epidermis [Wyatt *et al.*, 1992]. También se expresa en los integumentos de la cubierta de las semillas y en la capa de aleurona. En hojas de plantas de 3 semanas se encuentra expresión del mensajero en células del esclerénquima que cubren los haces vasculares y su expresión es evidente sobre la vena media [Wyatt *et al.*, 1992].

SbPRP3 lleva la secuencia repetitiva PPVYK. En plántulas de 4 días se expresa en todo el hipocótilo y en los cotiledones, no se detecta su expresión en las raíces. También se expresa en etapas tempranas del desarrollo de la semilla. En plantas de 3 semanas, es la PRP mayoritaria de las hojas y del tallo y no se detecta su expresión en raíces [Hong *et al.*, 1989]. Hibridaciones *in situ* muestran la expresión del mensajero en la región de elongación del hipocótilo de plántulas asociada a las capas internas del córtex y en las zonas maduras del hipocótilo se restringe su expresión al córtex, la médula y los haces

vasculares. En hojas de planta adulta se observó la expresión en epidermis adaxial [Wyatt *et al.*, 1992].

En maíz, se ha caracterizado el primer gen de PRP con dominios PPYV y PPTPRPS. Se diferencia de los genes de dicotiledóneas en que presentan un C-terminal hidrofóbico, con varios residuos de Cys. Se ha identificado un solo gen, por lo cual se cree que en monocotiledóneas no hay familias génicas como en las dicotiledóneas [José-Estanyol *et al.*; 1992].

Recientemente, en *Arabidopsis thaliana* se caracterizaron cuatro genes que codifican para proteínas ricas en prolina, que contienen dominios repetitivos diferentes a los reportados [Fowler *et al.*, 2000; Bernhardt, Tierney, 2000]. En el caso de las AtPRP1 y AtPRP3, presentan el péptido señal y el N-terminal consiste en repeticiones de la secuencia KPTLSPPVYT (13 repeticiones para AtPRP1 y 5 para AtPRP3); el C-terminal de ambas proteínas es rico en P y K. En AtPRP2 y AtPRP4 encontraron dos secuencias ricas en prolina diferentes. En este caso la estructura primaria consiste en el péptido señal, seguido por un dominio único no repetitivo y luego un dominio básico con repeticiones ricas en prolina. AtPRP2 contiene 9 copias del motivo PIYKPPV, mientras que AtPRP4 tiene 8 copias del dominio PPPKIEHPPVPVYK. Además ambas proteínas presentan 4 y 6 copias respectivamente del motivo KKPCPP. En cuanto a su expresión se observó que está modulada durante el desarrollo de la planta. Los mRNAs de AtPRP1 y AtPRP3 se detectaron exclusivamente en raíz. AtPRP3 muestra una alta expresión en pelos radiculares., mientras que los mRNA de AtPRP2 y AtPRP4 se acumulan en las hojas de la roseta y en las hojas caulinares, en los tallos y en los tejidos florales [Fowler, 2000].

Una característica descrita en las plántulas de frijol y de soja es que elicitores y daño, causan que las proteínas tipo PRP solubles ya no se detecten en la pared celular. Se cree que esto se produce por un mecanismo oxidativo de entrecruzamiento ya que, *in vitro*, el tratamiento con H₂O₂ y glutatión inducen la desaparición de la proteína soluble. Este fenómeno se inhibe por el tratamiento con catalasa y ácido ascórbico [Bradley *et al.*, 1992].

En frijol, se ha descrito la inducción de dos proteínas pertenecientes a la familia de las PRPs, por déficit hídrico y por tratamiento con ABA (ácido abscísico). Tienen un peso molecular en geles desnaturalizantes, de 33 y 36 kDa. Además están relacionadas antigénicamente [Covarrubias *et al.*, 1995]. Estas proteínas son capaces de interactuar con la membrana plasmática, en ensayos con protoplastos y microsomas de membrana

plasmática. Esta unión puede ser competida por el péptido RGD y también por fibronectina [García-Gómez *et al.*, 2000]. Además se han aislado genes con alta homología a PRP1 y PRP2 de soja a partir de bibliotecas de cDNA de plántulas de frijol sometidas a estrés hídrico y tratamiento con ABA [Colmenero-Flores *et al.*, 1995].

PROTEÍNAS RICAS EN GLICINA (GRPs).

Las GRPs son proteínas que tienen un contenido muy alto de glicina, el cual puede ser mayor al 60% del total de aminoácidos. La secuencia consenso es (Gly-X)_n, siendo X generalmente una glicina, aunque también puede ser alanina o serina. Se las encuentra en dicotiledóneas y en monocotiledóneas, pero no en gimnospermas; aunque la presencia de proteínas con secuencias ricas en glicina ha sido reportada en distintos organismos. Las GRPs no sólo han sido descritas en la pared celular; dependiendo de su función se localizan en el citosol, el núcleo o la cubierta del polen. Todas se caracterizan por la presencia de secuencias ricas en glicina. La expresión génica de las GRPs, se modula por fitohormonas; por estreses abióticos: como la sequía, el frío. El daño, la luz, el ritmo circadiano, así como también el ataque de patógenos y el tratamiento con ácido salicílico modulan la expresión de las GRPs [Sachetto-Martins *et al.*; 2000]. Al parecer tienen un papel importante en el desarrollo del tejido vascular, así como del nódulo y de las flores. En nódulos de *Vicia faba*, se ha identificado un gen, el *VfENOD-GRP3*, que se expresa en las etapas tempranas del desarrollo del nódulo y que codifica para una proteína de pared del tipo GRP. Esta proteína es la primera del tipo GRP, específica del nódulo. También se han relacionado al proceso de reparación por daño y en la tolerancia al congelamiento. En frijol se han descrito dos GRPs, una de ellas, GRP1.8 se localiza en el sistema vascular, específicamente en la pared primaria no lignificada del protoxilema. Se propone que podrían participar en un mecanismo de reparación de la pared celular durante el proceso de diferenciación del protoxilema. En este proceso se produce la muerte del tejido, así como la modificación de la pared celular para posibilitar la elongación de este tejido; bajo estas condiciones se observa la secreción de GRPs hacia la pared celular. El aumento de proteínas estructurales se cree que conduciría a modificar las propiedades físicas y químicas de la pared [Ryser *et al.*, 1997]. La nodulina ENOD-GRP3 de *Vicia faba*, se caracteriza por la presencia de un péptido señal en el N-terminal. El C-terminal tiene 31% de glicina, dispuestas en repeticiones Gly-X, donde X es Gly, Glu o Gln [Cassab, 1998]. También se ha propuesto que estas proteínas se insolubilizan en la pared celular aunque

no se conoce el mecanismo por el cual este proceso se lleva a cabo. Sin embargo, se ha sugerido que esto podría ocurrir por transglutaminación, ya que contienen altos niveles de Glu. El hecho de que estas proteínas puedan extraerse con agua caliente, sugiere que pueden asociarse a polisacáridos de la pared por enlaces no iónicos [Cassab, 1998].

Recientemente se ha caracterizado, mediante un experimento de dos híbridos, la interacción entre una de las GRPs de *Arabidopsis thaliana*, la GRP3, con el dominio extracelular de la proteína de membrana plasmática WAK1 (Wall Associated Kinase 1). La interacción es dependiente del extremo C-terminal de la GRP3, el cual lleva varios residuos de cisteínas. Ambas proteínas forman parte de un complejo proteico de 500 kDa, en el cual se encuentra además la proteína KAPP, una fosfatasa que también se ha asociado a otros receptores de tipo RLK (Receptor Like protein Kinase). La expresión de los mRNAs de ambas proteínas aumenta por el tratamiento con ácido salicílico, al igual que proteínas del tipo PR [Park *et al.*, 2001]

PROTEÍNAS ARABINOGALACTANAS (AGPs).

Las AGPs constituyen una extensa familia de proteoglicanos, ampliamente distribuida en el reino vegetal, las cuales han sido implicadas en numerosos procesos asociados con el crecimiento y el desarrollo, incluyendo la embriogénesis y la proliferación celular. Contienen menos del 10% de proteína, la cual está compuesta de prolina, hidroxiprolina, alanina, serina y treonina. Son proteoglicanos complejos, de 60 a 300 kDa, donde más del 90% está formado por polisacáridos ramificados, cadenas de (β 1 \rightarrow 3)D-galactopiranosas con cadenas laterales de (β 1 \rightarrow 6)D-galactopiranosas, sustituidas por arabinosas [Oxley, Bacic, 1999; Majewska Sawka, Nothnagel, 2000]. Hay dos tipos de AGPs, las clásicas, que se caracterizan por tener un N-terminal con la señal de secreción, una región central de tamaño variable, rica en prolina, hidroxiprolina, alanina y serina y un dominio hidrofóbico en el C-terminal. Las AGPs no clásicas no tienen un dominio estructural común y se diferencian por la presencia de un C-terminal hidrofílico, muy variable y rico en cisteínas.

Se ha demostrado que en dos AGPs pertenecientes al grupo de las clásicas, NaAGP1 de *Nicotiana glauca* y PcAGP1 de *Pyrus communis* las regiones hidrofóbicas del C-terminal son reemplazadas por un anclaje a membrana de tipo glucosilinositol fosfato (GPI). Al parecer esta modificación podría encontrarse en todas las AGPs clásicas [Oxley, Bacic, 1999]. Se ha propuesto que las AGPs pueden liberarse de la membrana plasmática por la

actividad de una fosfolipasa. Trabajos realizados con cultivos celulares de *Pyrus communis*, muestran que la forma secretada al medio de cultivo es la más abundante y sólo una pequeña cantidad (1/500) se mantiene unida a la membrana por un corto tiempo, lo cual implica que el recambio de la proteína es muy alto [Oxley, Bacic, 1999]. En *Arabidopsis* se han aislado 15 genes que codifican para proteínas de las AGPs clásicas, de éstos se han purificado y caracterizado 7 proteínas, todas ellas presentan el anclaje de tipo GPI y varían en el tamaño de la parte proteica [Schultz *et al.*, 2000].

Estudios de inmunolocalización en tomate, determinaron que las AGPs están localizadas en diferentes órganos y tejidos, en los espacios intercelulares, en la pared celular, en la membrana plasmática y en ciertas vesículas citoplasmáticas [Gao *et al.*, 1999],

El papel preciso que juegan los anclajes de GPI no se conoce. Podrían estar involucrados en vías de transducción, por interacción con otras proteínas de unión a membrana. Además su actividad como molécula señalizadora podría estar regulada por la actividad de la fosfolipasa [Majewska Sawka, Nothnagel, 2000]. Las AGPs también podrían estar involucradas en la adhesión celular. *AtAGP8* codifica para una proteína de tipo AGP, distinta a las ya descritas. Posee la secuencia señal y el anclaje de GPI en el C-terminal; sin embargo la proteína posee 4 dominios que no se encuentran en las otras AGPs, dos de ellos podrían estar asociados con adhesión celular, ya que son homólogos a los dominios β -Ig-H3/ fasciclina [Schultz *et al.*, 2000]. Este dominio se ha descrito en animales, insectos, algas y bacterias; y se cree que está involucrado en adhesión celular. Proteínas con dominios β -Ig-H3/fasciclina parecen tener roles especiales en el desarrollo, como las proteínas de adhesión celular del alga *Volvox* asociadas con el desarrollo embrionario y las fasciclinas de *Drosophila* involucradas en el desarrollo neuronal [Schultz *et al.*, 2000].

PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

WAKs : PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA PARED CELULAR CON ACTIVIDAD CINASA.

Este grupo de proteínas fue descrito en *Arabidopsis thaliana*, en donde se aislaron 5 genes que presentan la estructura de una proteína del tipo RLK (receptor-like protein kinase): tienen un dominio citoplasmático de serina/treonina cinasa, un dominio transmembranal y una región extracitoplasmática con varias repeticiones características del factor de crecimiento epidérmico (EGF), seguida por el péptido señal. La región extracitoplasmática puede presentar regiones con alta identidad a tenascina, colágeno o neurexina, todas ellas proteínas de matriz extracelular animal [He *et al.*, 1999]. El N-terminal de la proteína está estrechamente ligado a la pared celular, tal es así que para separar la proteína de la pared se requiere hervir en 2% SDS y DTT o tratar el tejido con pectinasas. Al mismo tiempo es posible inmunodetectar a la proteína en fracciones membranales. Esta característica sugiere que estas proteínas podrían mantener una continuidad física entre la pared celular y el citoplasma. Además tienen actividad cinasa citoplásmica, por lo cual podrían mediar señales hacia el citoplasma desde la pared celular [He *et al.*, 1996]. El análisis de mRNAs muestra que la expresión de estas WAKs son órgano-específicas. Esto se corroboró con el análisis de las regiones promotoras, donde se muestra que WAK1 y WAK2 se expresan en meristemos de raíz y de tallo; en hojas en expansión, como respuesta a daño y al tratamiento con INA (análogo al ácido salicílico y necesario para desencadenar la respuesta sistémica adquirida) [Wagner, Kohorn, 2001]. Los resultados obtenidos con plantas en las que se expresa el gen en antisentido, muestran una leve reducción en el tamaño foliar, con lo cual los autores sugieren su relación con el proceso de expansión celular. El hecho de que las WAKs estén asociadas a las pectinas ha sugerido que esta interacción sería importante para regular la expansión celular [Wagner, Kohorn, 2001]. Recientemente se encontró que el dominio extracelular de la WAK1 es capaz de interactuar en forma específica con la GRP3, una de las 8 formas de GRPs presentes en *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se demuestra que el C-terminal de la GRP3 es esencial para la interacción y que el reconocimiento entre la GRP3 y WAK1 depende de las cisteínas que presenta el C-terminal de la GRP3. Además ambas proteínas se encuentran formando parte de un complejo proteico de 500 kDa asociadas a la proteína KAPP, fosfatasa asociada a otras RLKs [Park, 2001]. Se postula que este complejo está asociado con la respuesta a

patógenos, ya que la expresión de ambas proteínas se inducen con el tratamiento con ácido salicílico al igual que la proteína PR1, la cual también se ha asociado con esta respuesta [Park, 2001].

INTERACCIONES ENTRE LA PARED CELULAR Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Como vimos anteriormente, la pared celular es una estructura altamente compleja, la cual no sólo cumple una función mecánica para la célula vegetal y la planta, sino que a la vez es un compartimento metabólicamente activo. Hasta el momento, pocos son los modelos de pared celular que consideran su interacción con la membrana plasmática.

Sin embargo, los primeros intentos de integrar los datos conocidos describen las moléculas que interaccionan en ambos compartimentos [Kohorn, 2000]. Éstas se pueden agrupar en aquellas que presentan dominios en pared celular y en membrana plasmática, como las AGPs y las WAKs. Aquellas que interaccionan específicamente con la membrana plasmática como es el caso de las PRPs y las HRGPs. Y por último las enzimas o complejos enzimáticos que estando en la membrana plasmática tienen su sustrato en la pared celular, tal es el caso de la $\beta(1\rightarrow4)$ endoglucanasa o el complejo de la celulosa sintasa; en este último caso la interacción se produce con su producto, el polímero que se está sintetizando.

Otro tipo de interacción se observa cuando hay cambios en el estado hídrico de la célula, por ejemplo, durante la plasmólisis, cuando la célula está en un medio hipertónico que provoca la salida de agua de la célula. En estas condiciones, se observan sitios de adhesión entre la pared y la membrana plasmática.

Veremos algunas de estas interacciones, en particular, aquellas en las que intervienen las proteínas estructurales de pared celular. También es importante destacar la presencia de estructuras en la pared celular que conectan por vía apoplasto dos células contiguas; éstos son los plasmodesmos y se requiere hablar de ellos para establecer las diferencias que se pudieran observar entre los sitios de adhesión y los plasmodesmos.

Estructuras en la pared celular.

Plasmodesmos.

Los plasmodesmos son canales que atraviesan la pared celular vegetal, uniendo el citoplasma de células adyacentes y facilitando la comunicación entre las células, por la vía

simplástica. Se forman durante dos etapas del desarrollo: los primarios durante la citocinesis, y los secundarios se forman en la pared celular de cualquier célula, permitiendo que la célula incremente potencialmente el tráfico entre dos células, al generar conexiones entre dos células que no se relacionaron durante la citocinesis. En plantas superiores, todas las células embrionarias están conectadas en una simple unidad simplástica. A medida que la planta se desarrolla, se generan zonas con distinto grado de comunicación por la vía simplástica: por ejemplo, los estomas están aislados simplásticamente y en otros tejidos se regula el número y la disposición de los plasmodesmos [Crawford, Zambryski, 1999].

Los plasmodesmos están formados por espacios, membranas y proteínas. Las membranas limitan el canal y por los espacios se produce el transporte. Las membranas tienen dos orígenes: la membrana plasmática define el límite externo del canal, mientras que por el centro del plasmodesmo existe una estructura membranal (desmotúbulo) que se forma a partir del retículo endoplásmico. El espacio definido entre el desmotúbulo y la membrana plasmática es el conducto por donde se realiza el transporte de moléculas. La regulación del transporte está dada por elementos contráctiles, como actina y miosina y otras moléculas que están reguladas por Ca^{+2} , y por fosforilación-defosforilación [Zambryski, Crawford, 2000].

Cambios en el estado hídrico de las células vegetales.

La interacción física entre la pared celular y la membrana plasmática se ha observado en numerosas ocasiones, pero es importante establecer los cambios detectados de acuerdo al estado hídrico de la célula. Cuando el tejido se encuentra en condiciones hídricas normales, se observa por microscopía, que la membrana plasmática se encuentra en íntimo contacto con la pared celular, y se asume que se debe a la presión de turgencia celular. El caso contrario se observa cuando una célula está en un medio hipertónico. En estas condiciones se ha descrito un fenómeno que se denomina plasmólisis o pérdida de turgencia celular, en el cual la célula pierde agua y el protoplasto se retrae, separándose de la pared celular. La membrana plasmática sólo se mantiene unida a la pared celular por algunos puntos o zonas, formando hebras y una reticulación particular que se denominan hebras y reticulación de Hechtian. En ambas estructuras es posible encontrar hebras de protoplasto y algunos organelos, como mitocondrias. El tratamiento del tejido con drogas que desorganizan microtúbulos o microfilamentos de actina, no evita la

formación de las hebras cuando el tejido es plasmolizado, lo cual sugiere que no hay elementos del citoesqueleto, como microtúbulos o microfilamentos de actina, involucrados en la formación de estas hebras y además la adhesión entre la membrana y la pared celular permanece intacta durante el tratamiento [Lang-Pauluzzi, 2000]. Estos puntos de unión entre las hebras de Hechtian y la pared celular se denominaron sitios de adhesión. Al parecer estos sitios de adhesión son diferentes a los plasmodesmos: la epidermis de cebolla se caracteriza por tener plasmodesmos sólo en las caras anticlinales de la célula y no en las periclinales, sin embargo, cuando se somete al tejido a condiciones de plasmólisis, se observa la formación de hebras de Hechtian en todas las caras celulares [Pont Lezica *et al.*, 1993]. En otros estudios se ha observado que los plasmodesmos mantienen la continuidad física entre dos células contiguas durante la plasmólisis, a pesar de que se interrumpe la continuidad funcional. Cuando la célula vuelve a las condiciones hídricas normales, se establece el movimiento a través del plasmodesmo. Esto muestra que durante la plasmólisis, quizás dependiendo del tejido, algunos de los contactos que se observan en membrana plasmática, podrían partir de los plasmodesmos [Oparka, 1994].

Modelos que explican los sitios de adhesión que se observan en la plasmólisis.

A partir de estos experimentos, se ha propuesto que los sitios de adhesión que se observan durante la plasmólisis podrían tener complejos proteicos similares a las integrinas que se encuentran en células animales [Pont Lezica *et al.*, 1993]. Sin embargo, hasta el momento no se han aislado los componentes de estos sitios de adhesión.

Durante muchos años se ha buscado en plantas, la presencia de integrinas y de proteínas de matriz extracelular similares a las que se encuentran en animales. El uso de anticuerpos contra integrinas permitió identificar proteínas en *Fucus*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* y *Chara*. Sin embargo, no se han identificado ni caracterizado ninguna de ellas. El uso de anticuerpos heterólogos para la identificación de proteínas no ha sido muy exitoso, prueba de esto es que varias de las proteínas detectadas no pertenecen a un complejo de integrinas, tal es el caso del factor de elongación de la traducción 1- α , que se identificó como una fibronectina, la fosfoglicerato mutasa la cual se identificó inicialmente como una proteína de tipo vitronectina y una proteína que muestra homología con la VAP-33, proteína de tráfico detectada con el anticuerpo dirigido contra la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}/\beta\text{5}$ [Canut *et al.*, 1998]. A pesar de estos intentos frustrados, el modelo

se mantiene ya que se ha encontrado que el uso del péptido RGD disminuye el número de uniones entre la pared celular y la membrana plasmática durante la plasmólisis. El péptido RGD se identificó como una secuencia presente en proteínas de matriz extracelular animal que interactúa específicamente con integrinas. La unión *in vitro* entre un péptido sintético conteniendo varias repeticiones de RGD con la membrana plasmática de *Arabidopsis*, muestra una cinética de saturación similar a la de un receptor, con valores de Kd entre 1 y 50 nM, similares a los encontrados en células animales. Esto sugiere que la membrana plasmática de plantas contiene sitios de unión para RGD, pero al parecer, tanto el receptor como las proteínas de pared celular no tienen homología con el sistema de integrinas de animales [Canut *et al.*, 1998]. Otros autores afirman que esto es lo esperado, debido a las diferencias en carbohidratos entre los dos reinos. Probablemente la similitud no se observe extracelularmente sino en los dominios citoplásmicos [Kohorn, 2000].

Proteínas de la pared celular que interactúan con la membrana plasmática.

Se ha descrito la interacción de varios tipos de proteínas de pared celular con la membrana plasmática. Las primeras que se describieron fueron las extensinas [Pont Lezica *et al.*, 1993]. Luego se encontraron las AGPs [Oxley, Bacic, 1999], que poseen dominios estructurales en ambos compartimentos y más recientemente, se ha reportado la interacción de las PRPs con la membrana plasmática de células vegetales [García-Gómez, 2000].

Extensinas.

Las primeras observaciones sobre la interacción de las extensinas con la membrana plasmática fueron hechas en cultivos celulares de tabaco [Akashi, Shibaoka, 1990 y 1991]. En este sistema se estudió el efecto del congelamiento sobre protoplastos. Encontraron que los microtúbulos corticales de protoplastos eran sensibles al congelamiento, es decir que el tratamiento provocaba la desorganización de los mismos. Sin embargo, si se regeneraba la pared celular de los protoplastos antes del tratamiento, esto no ocurría: los microtúbulos corticales se estabilizaban y ya no había degradación. Lo mismo se encontró cuando el experimento se realizó con protoplastos, pero agregando al medio de cultivo poli-L-lisina o extensinas, proteínas que también son policatiónicas. Este grupo propuso que existe un factor transmembranal que conecta los microtúbulos

corticales con la pared celular y de esta forma los estabiliza frente al congelamiento. Posteriormente, sugirieron la naturaleza proteica del factor, ya que haciendo tratamientos con tripsina, se logró revertir la protección que genera la extensina [Akashi, Shibaoka, 1990 y 1991].

Otro grupo, tratando de localizar proteínas en los sitios de adhesión entre pared celular y la membrana plasmática durante la plasmólisis, inmunodetectaron la presencia de extensinas en estos sitios de adhesión. Al parecer en células de tabaco se observa una redistribución de la extensina en la pared celular, que coincide con los sitios de adhesión.

Para reforzar la idea de que sólo la extensina esta interactuando con puntos específicos en la membrana plasmática analizaron la presencia de extensina en protoplastos y encontraron una distribución similar de la señal [Pont Lezica *et al.*, 1993].

Proteínas ricas en glicina (GRPs).

Recientemente se ha reportado la interacción de la GRP3 de *Arabidopsis thaliana*, con una proteína de membrana plasmática, WAK1. WAK1 es una proteína transmembranal que pertenece al grupo de las RLKs (receptor-like proteins). Las RLKs son proteínas receptoras de membrana plasmática que están ampliamente distribuidas en las plantas. Dentro de las RLKs podemos encontrar distintas subfamilias: SRKs (S-receptor-like kinases) determinantes de la auto incompatibilidad femenina en *Brassica*, las LRR (leucine rich repeats). Las RLKs con dominios LRRs que regulan procesos de desarrollo como es el caso de CLAVATA1, ERECTA, HAESA, el receptor para brasinoesteroides BRI1, los genes de resistencia a bacterias patógenas de arroz Xa21, etc. Las WAKs pertenecen a otro subgrupo de receptores con actividad cinasa. Sus características estructurales ya las hemos mencionado anteriormente. WAK1 interactúa con la proteína de pared celular AtGRP3, y esta unión es esencial para la formación de un complejo multimérico de 500 kDa *in vivo*; en este complejo se han detectado tres componentes: WAK1 (en una forma de alto peso molecular), GRP3 y KAPP (Kinase Associated Protein Phosphatase). KAPP se ha detectado asociada a varios receptores del tipo RLK y se ha sugerido que su actividad de defosforilación anularía la señal que recibe el receptor. Se observó que la proteína AtGRP3 induce la expresión de *PR-1* (pathogen related gene) y regula la expresión de *Wak1* y *ATGRP3*. Se propone que la interacción entre ambas proteínas estaría involucrada con la respuesta a patógenos [Park, 2001].

PRPs

En nuestro laboratorio se describieron las primeras PRPs, capaces de interactuar con la membrana plasmática. Estas proteínas son componentes de la pared celular de frijol. Se expresan en plántulas de frijol y su expresión se localiza principalmente en hipocótilo y epicótilo. Se denominaron p33 y p36 por sus pesos moleculares en geles desnaturizantes. Estas proteínas se inducen y se acumulan en forma soluble en la pared celular cuando se somete a las plántulas de frijol a déficit hídrico o al tratamiento con ABA. Ambas proteínas están glicosiladas y la de-glicosilación de ambas no provoca un cambio en el movimiento electroforético, por lo que se propone que el porcentaje de glicosilación de ambas proteínas es muy bajo. Otra característica de p33 y p36 es que están relacionadas antigénicamente [Covarrubias *et al.*, 1995], ambas tienen el decámero característico de las PRPs (PRP2 de soja), POVKPOVEK. Estudios recientes demostraron que ambas proteínas son capaces de interactuar con la membrana plasmática de protoplastos de frijol y con fracciones microsómicas de membrana plasmática. Además esta interacción se ve acentuada por la presencia de cationes divalentes en el medio de cultivo (Ca^{+2} ó Mg^{+2}). Ensayos de unión muestran que las proteínas podrían unirse a otra de membrana plasmática de 80 kDa y que esta unión es capaz de ser competida por la secuencia RGD y fibronectina. Debido a que no se conocen las secuencias completas de p33 y p36, no se sabe si en realidad alguna de ellas pudiera presentar la secuencia RGD en su estructura primaria o terciaria [García-Gómez *et al.*, 2000].

DÉFICIT HÍDRICO.

Mecanismos para sobrevivir al déficit hídrico.

Las plantas han desarrollado una variedad de mecanismos que les posibilita crecer y reproducirse en condiciones adversas, como son el déficit hídrico, las bajas temperaturas, la salinidad del suelo, anoxia, etc. Las plantas toleran estas condiciones de estrés cuando generan mecanismos de resistencia. Los mecanismos de resistencia permiten el ajuste de organismos individuales en respuesta a cambios del ambiente, alterando su homeostasis para adaptarse a las nuevas condiciones del medio. Los estreses inducen cambios en el metabolismo y en el desarrollo, los cuales se atribuyen parcialmente a un patrón alterado de la expresión génica. La respuesta se inicia cuando la planta reconoce el estrés a nivel celular y responde al mismo. Como respuesta al estrés algunos genes se expresan más fuertemente, otros se expresan de novo, mientras que otros son reprimidos.

El déficit hídrico, provocado por la sequía, se produce en las plantas cuando el aporte de agua desde el suelo, es menor que su tasa de transpiración. Desde el punto de vista agronómico es una de las causas de mayor pérdida de productividad de un cultivo. Las plantas responden al déficit hídrico a distintos niveles: morfológico, fisiológico, celular y metabólico. Las respuestas dependen de la duración y la severidad del estrés, del genotipo de la planta, del estado de desarrollo, del órgano y del tipo celular en cuestión. Las distintas especies responden de forma diferente al estrés, dependiendo de su resistencia al déficit hídrico.

Las plantas que resisten el déficit hídrico pueden evitar el déficit interno de agua a través de mecanismos que promueven la toma de agua, que retardan la pérdida, o toleran la deshidratación del protoplasma. Los cambios en la expresión génica son una parte importante en la habilidad de la planta para responder al ambiente, aunque muchas respuestas metabólicas o fisiológicas iniciales al estrés podrían no requerir de cambios en la expresión génica. El crecimiento celular parece ser la respuesta más sensible al déficit hídrico, ya que es un proceso que depende de la turgencia celular, y en condiciones de estrés disminuye la presión de turgencia a medida que la célula pierde agua. Esto se ve reflejado en la disminución de la expansión en las hojas, no así en la raíz donde se ha detectado un mayor crecimiento. El déficit hídrico disminuye la conductancia estomática (debido al cierre de estomas) y la tasa fotosintética. Una característica del déficit hídrico es la disminución en la tasa total de síntesis de proteínas. A pesar de esto, la planta

induce mecanismos para resistir al estrés: cambios en el metabolismo primario como son la inducción de enzimas relacionadas al metabolismo de azúcares. Como parte del proceso de ajuste osmótico celular, se sintetizan solutos compatibles como: prolina, betainas, manitol, pinitol, etc. La regulación del flujo de agua es muy importante y en este proceso se han involucrado proteínas como la RD28, una acuaporina que se induce en respuesta al déficit hídrico. También se expresan genes que codifican para proteínas de embriogénesis tardía (LEAs), las cuales se caracterizan por su expresión en las últimas etapas del desarrollo de la semilla. Estas proteínas se caracterizan por ser altamente hidrofílicas y se propone que podrían proteger estructuras celulares o proteínas, minimizando los efectos de la sequía.

ABA: Hormona que interviene en la respuesta al estrés.

La sequía y la alta salinidad causan en las plantas un aumento en los niveles de ABA, la aplicación exógena de ABA también induce un número de genes que responden a deshidratación y también a frío. El ABA es una fitohormona que se relaciona con estreses abióticos, aunque cumple un papel fundamental en las últimas etapas del desarrollo de la semilla y en la dormancia. El ABA participa en varias de las respuestas al estrés hídrico, como son el cierre estomático y la inducción de la expresión génica. El uso de mutantes en la biosíntesis de ABA, y en la percepción de la hormona ha permitido el estudio de la regulación de los genes dependientes e independientes de ABA, así como de los elementos involucrados en cada vía de señalización.

En lo que corresponde a nuestro tema de estudio, se ha observado que las proteínas p33 y p36 se acumulan como respuesta al déficit hídrico y al tratamiento por ABA, lo que sugiere que la expresión de estos genes está regulada por factores de estrés, a través de vías de transducción de señales dependientes de ABA.

ANTECEDENTES.

OBJETIVO GENERAL.

OBJETIVOS PARTICULARES.

ANTECEDENTES

Como ya lo destacamos, p33 y p36 son proteínas que pertenecen a la fracción soluble de la pared celular de plántulas de frijol. Son proteínas básicas, con un alto contenido de prolina y pertenecen al grupo de las proteína ricas en prolina, PRPs. Se caracterizan por presentar la repetición del decámero POVKKPOVEK, típico de las PRPs del grupo 2 de soja. Son glicoproteínas, pero el contenido de azúcares no es muy importante, lo cual también es una característica del grupo de las PRPs. No se inducen por el ataque de patógenos, pero no sabemos si se insolubilizan como respuesta a patógenos o daño. Trabajos de otros grupos [Bradley, 1992], han establecido la desaparición de proteínas solubles, pertenecientes al grupo de las PRPs, como respuesta al ataque de patógeno.

Una de las características de p33 y p36, es que ambas proteínas se inducen y se mantienen solubles, por el tratamiento de las plántulas con déficit hídrico y con la fitohormona ABA. Ambas proteínas son capaces de interactuar de forma específica con la membrana plasmática. Esto se ha demostrado con el uso de protoplastos y de microsomas de membrana plasmática. Además la interacción entre p33 y p36 con la membrana plasmática puede ser competida por el péptido RGD y por fibronectina [García-Gómez *et al.*, 2000].

HIPÓTESIS

Las proteínas p33 y p36 de la fracción soluble de la pared celular son capaces de interactuar con la membrana plasmática. Esta interacción podría ayudar a mantener la integridad y/o estabilizar a la membrana frente a condiciones de estrés como el que se produce durante el déficit hídrico y/o, al mismo tiempo, generar una señal para la célula.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar parcialmente la interacción entre p33/p36 y la membrana plasmática.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Establecer el sistema experimental para realizar los estudios de interacción.
2. Establecer cual/es son las proteínas que interactúan con p33/p36. Establecer si existen cambios en la interacción como consecuencia del déficit hídrico.

RESULTADOS.

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL.

Iniciamos la caracterización de un sistema experimental que permitiera el estudio *in vivo* de la interacción entre la pared celular con la membrana plasmática. Para ésto se utilizó un cultivo celular de frijol en suspensión establecido en el laboratorio del Dr. Mario Rocha. Este cultivo proviene de callos formados a partir de cotiledones de semillas inmaduras. Los callos se disgregaron para iniciar el cultivo y se incubaron con agitación constante, para mantener las células en suspensión.

Este cultivo se caracterizó para determinar la presencia de p33 y p36 en el cultivo celular en condiciones normales de crecimiento y, además para establecer si estas proteínas se inducen en condiciones de estrés al igual que se observa en la plántula de frijol.

Presencia de p33/p36 en el cultivo celular.

Trabajos anteriores reportaron la secreción específica de proteínas de pared celular al medio de cultivo, ya sea en condiciones normales de crecimiento o como respuesta al tratamiento con sales o al someter al cultivo a condiciones de estrés osmótico [Baldwin, 1993; Esaka, 1995]. De acuerdo con estos antecedentes, se buscó la presencia de p33/p36 en extractos totales de células en suspensión, así como en los extractos proteicos totales de los medios de cultivo.

Inicialmente analizamos el cultivo celular en condiciones de crecimiento normales, sin tratamientos de estrés. El análisis por inmunodetección de extractos proteicos totales de células de frijol mostró la presencia de las proteínas p33 y p36 [FIGURA 1]. A diferencia de los tejidos vegetativos de las plántulas, las células en cultivo mostraron niveles detectables de p33 y p36 sin la imposición del estrés.

Analizando los extractos totales proteicos de los medios de cultivo celulares detectamos la presencia de p36 [FIGURA 1C, carril 2], aunque la cantidad de p36 que se observa es muy baja. Una particularidad del cultivo es que encontramos una mayor proporción de p36 [FIGURA 1C, carril 1], a diferencia de lo que se observa en la plántula, de donde se extraen solubles ambas proteínas en la misma proporción. Esta característica podría ser propia del cultivo celular o bien ser el patrón proteico característico del tejido que dió origen al cultivo. Para analizar esta diferencia se hizo un extracto proteico total de semilla entera inmadura. En la FIGURA 2 se muestra una inmunodetección utilizando el suero

anti p33/36 de extractos de semillas inmaduras. Como se puede observar las semillas inmaduras también presentan una mayor proporción de p36 con respecto a p33 [FIGURA 2, carril 1].

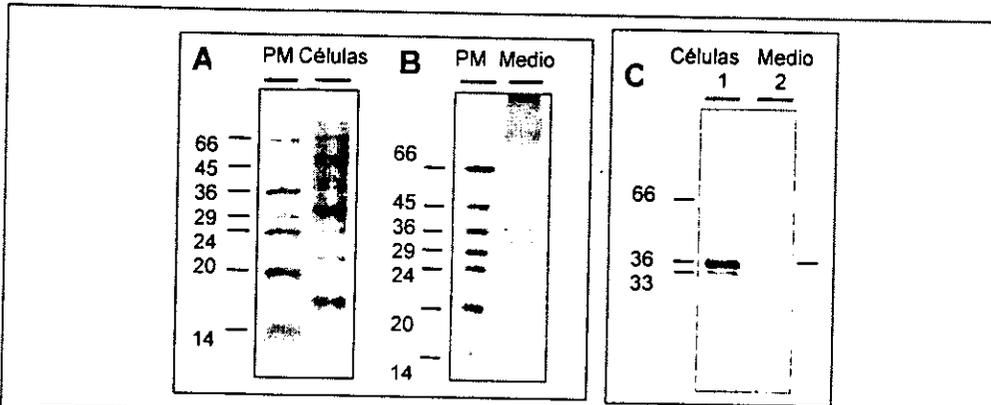


Figura 1: Presencia de las proteínas p33 y p36 en el cultivo celular.

Panel A: Separación de extractos proteicos totales de células de frijol en geles de SDS-PAGE al 15% y tinción de Coomasie Blue.

Panel B: Separación de extractos proteicos totales del medio de cultivo de las células en suspensión, en geles de SDS-PAGE al 15% y tinción de Coomasie Blue.

Panel C: Inmunodetección de p33 y p36 en extractos de proteínas totales de las células en suspensión y del medio de cultivo. Se utilizó suero de conejo conteniendo anticuerpos anti-p33/p36. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 15 %.

PM: marcadores de peso molecular.

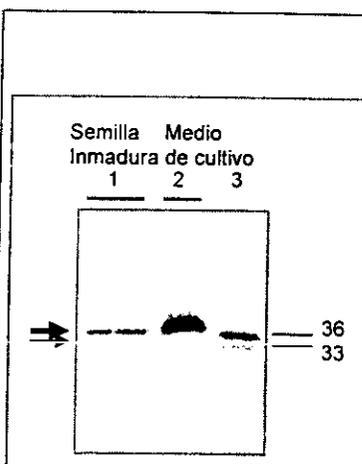


Figura 2: Comparación entre el patrón proteico de la semilla inmadura y el medio de cultivo de células en suspensión.

Separación de proteínas en gel de SDS-PAGE al 15% e inmunodetección de p33/p36.

Carril 1: Extractos totales de semillas inmaduras de frijol.

Carril 2: medios de cultivo de células en suspensión bajo tratamiento de NaCl 150 mM.

Carril 3: Proteínas p33/36 purificadas de plántulas de frijol bajo tratamiento de déficit hídrico.

Efecto del tratamiento con ABA sobre p33/p36 en el cultivo celular de frijol.

La fitohormona ABA se ha descrito como mediadora de muchos procesos de respuesta al déficit hídrico. En plántulas de frijol se observó la acumulación de p33 y p36 no sólo por déficit hídrico, sino también por el tratamiento con ABA [Covarrubias *et al.*, 1995]; ésto sugirió que la inducción y la acumulación de estas proteínas en respuesta a estrés o durante el desarrollo esta mediada por ABA.

Con la finalidad de evaluar la posibilidad de inducir a p33/p36 en los cultivos celulares sin necesidad de imponer una condición de estrés utilizando altas concentraciones de sales u osmolitos, nos preguntamos si tratamientos con ABA de las células en suspensión eran capaces de inducir la acumulación de estas proteínas.

Evaluamos la inducción de p33/p36 agregando al medio de cultivo 10 μ M de ABA y manteniendo los controles en medio de cultivo normal. Las muestras se colectaron a distintos tiempos y se obtuvieron extractos de proteínas totales, en los cuales se analizó la presencia de p33/p36 por inmunodetección.

Como se muestra en la FIGURA 3, los cultivos tratados con ABA no muestran diferencias en la cantidad de p33/p36 con respecto a los controles sin ABA, en ninguna de las muestras tomadas a diferentes tiempos de cultivo. Nuevamente, encontramos que la proporción de p36 es mayor a la de p33, aún bajo el tratamiento con ABA. Al analizar los extractos proteicos totales de los medios de cultivo [FIGURA 3B] sólo se alcanza a detectar una pequeña cantidad de p36, pero no se observa la acumulación de p33/p36 en el medio de cultivo de células tratadas. Cabe hacer notar que se observó una acumulación progresiva de p36 a lo largo del tiempo del cultivo probablemente inducida por el estado del cultivo [FIGURA 3A]. Estos resultados sugieren que en este sistema, la acumulación de p33/p36 no es sensible a la presencia de ABA en el medio.

Una pregunta obligada es si estas proteínas se acumulan en las células en cultivo en respuesta a condiciones de estrés osmótico. Para contestarla los cultivos celulares se sometieron a tratamientos con altas concentraciones de NaCl (150 mM) para inducir hiperósmosis. En estas condiciones, debido a la gran variabilidad en la respuesta del cultivo de células, no logramos obtener resultados confiables en cuanto a los efectos de este tratamiento sobre los niveles de p33/p36, ni en las células ni en el medio de cultivo.

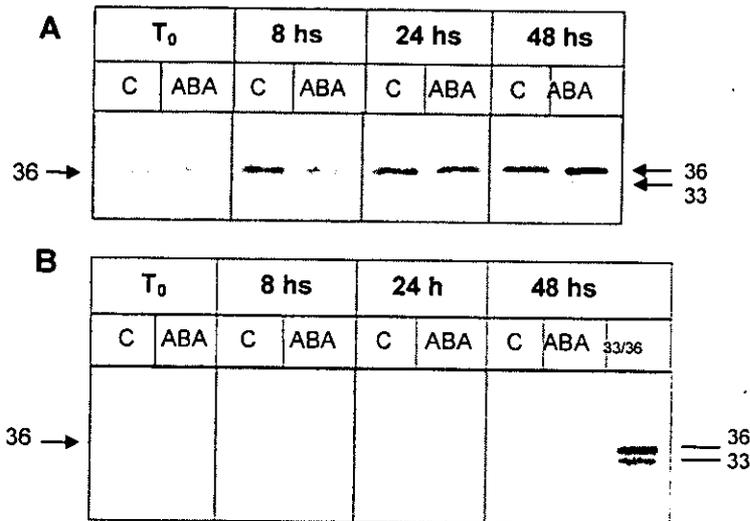


Figura 3: Cinética de tratamiento con ABA a un cultivo celular de frijol en suspensión. En todos los tiempos se compara con el control sin ABA.

Separación de los extractos proteicos totales en un gel de SDS-PAGE al 12% e inmunodetección de p33/p36 utilizando suero de conejo anti-p33/p36.

En **A** se muestra la inmunodetección de p33/p36 en los extractos proteicos totales de células y, en **B** se muestra la inmunodetección sobre los extractos proteicos totales del medio de cultivo.

En todos los casos C corresponde a los controles sin tratamiento y ABA a los cultivos tratados con una concentración final de 10 μ M de ABA.

En todos los carriles se sembró igual cantidad de proteína.

En el panel **A** se observa la posición de p33 y p36 y en el panel **B**, se muestran ambas proteínas purificadas.

2. INTERACCIÓN DE p33/p36 CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA *in vitro*.

Resultados anteriores obtenidos en el laboratorio [García-Gómez *et al.*, 2000], establecieron la interacción de las proteínas p33/36 con la membrana plasmática. En este trabajo estamos interesados en estudiar la interacción en condiciones de estrés hídrico. En estas condiciones p33/36 se inducen en plántulas de frijol, 50 veces con respecto al control en condiciones de riego óptimo. Esto nos motivó a preguntarnos si este aumento en la cantidad de proteína soluble que se observa en la pared celular se ve reflejado también en la interacción con la membrana plasmática o no. Nuestra hipótesis considera que este aumento en la cantidad de proteína de pared podría modificar la interacción con la membrana plasmática. Esta modificación en la interacción podría deberse a una modificación en la asociación con otras proteínas de la membrana plasmática (o asociadas), en la afinidad por la interacción, en la cantidad de proteínas que interaccionan, o el caso contrario, que no hubiera ningún tipo de modificación como consecuencia del aumento de las proteínas en pared celular que se produce durante el déficit hídrico.

Si bien no evaluamos todas las posibilidades antes mencionadas, pensamos que una de las formas de abordar el estudio de la interacción era estableciendo cuáles eran las proteínas que se asocian a p33 y p36 en condiciones de riego, cuáles de ellas se encuentran en la fracción de la membrana plasmática o están asociadas a ella y si existe una modificación en el patrón de proteínas como consecuencia del déficit hídrico. Para ésto recurrimos a la técnica de la inmunoprecipitación. Esta técnica es utilizada para aislar un antígeno mediante el uso de su anticuerpo unido a una matriz sedimentable. Si el antígeno forma parte de un complejo proteico es muy probable que inmunoprecipite junto con las proteínas que interaccionan con él. Basándonos en esta idea, realizamos una serie de experimentos para establecer qué proteínas están interactuando con p33 y p36 y cuáles de ellas se encuentran asociadas a la fracción de la membrana plasmática. Para realizar estos experimentos contamos con un suero de conejo que contiene anticuerpos que reconocen a p33 y p36 específicamente.

2.1. Optimización de la inmunoprecipitación.

Debimos modificar el protocolo de inmunoprecipitación debido a las características bioquímicas de p33 y p36. Ambas proteínas son básicas, tienen un pI cercano a 8,2 y en general los protocolos de inmunoprecipitación se realizan a pHs de 7.5 a 8.0, por que favorecen la unión del anticuerpo a la proteína A. Para evitar la insolubilización estimamos que era conveniente realizar las inmunoprecipitaciones a un pH de 6.5. En estas condiciones encontramos que no podíamos detectar el inmunoprecipitado a menos que aumentáramos la sensibilidad de la detección.

Para aumentar la sensibilidad de la detección del inmunoprecipitado se utilizaron las proteínas marcadas con biotina. En la FIGURA 4, se observa la inmunoprecipitación con tres diluciones de suero de conejo anti p33/p36. Podemos observar que el suero es capaz de inmunoprecipitar a p33 y p36 [FIGURA 4 carriles 1 al 3], a pesar de la baja eficiencia del ensayo. En los controles, observamos que la cantidad de p33 y p36 que se obtiene con el suero preinmune [FIGURA 4 carriles 4 al 6] es igual a la cantidad de proteína que se une a la proteína A agarosa sola, sin el agregado de anticuerpo [FIGURA 4 carril 7], por lo tanto no es debido a que el suero preinmune reconozca a p33 y p36, sino que una porción de estas proteínas se asocian a la matriz de proteínaA agarosa inespecíficamente. Paralelamente realizamos un ensayo de tipo Western utilizando p33/36 purificadas, incubando con el suero preinmune y no se observó ninguna banda. Posteriormente evitamos este pegado inespecífico modificando los lavados, pero además utilizamos como control de la inmunoprecipitación, una incubación con proteína A agarosa, además del control con el suero preinmune.

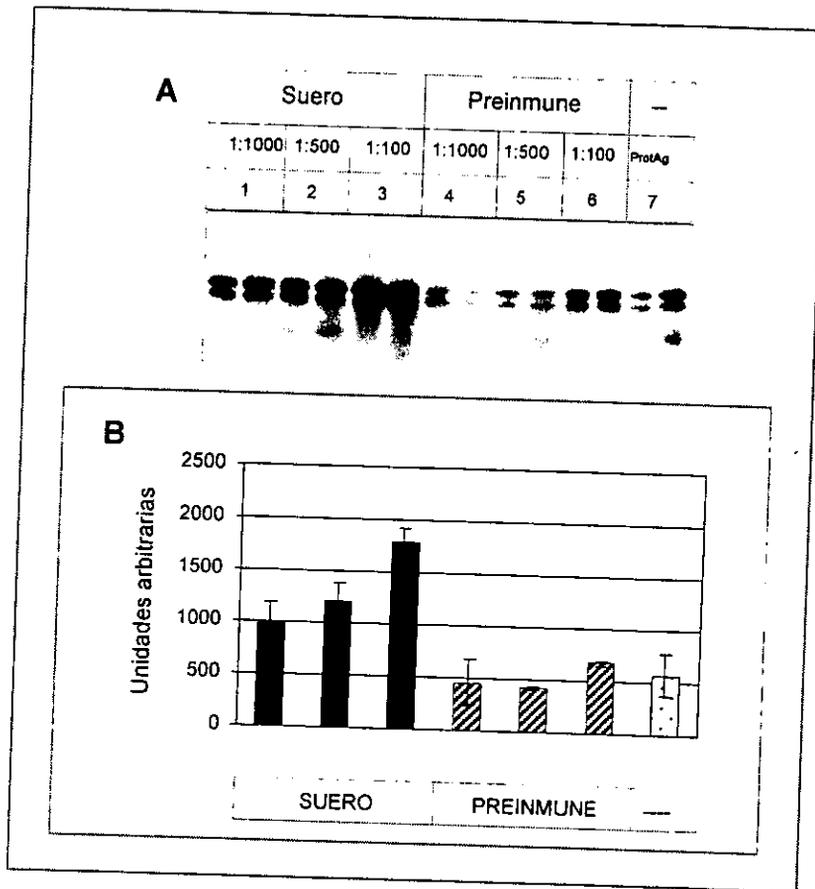


Figura 4: Inmunoprecipitación de p33/p36 marcadas con biotina utilizando distintas diluciones de suero de conejo anti p33/p36.

En A se observa la autorradiografía y en B se muestra la cuantificación de la densidad de las bandas de p33 y p36 utilizando el programa NIH image.

Las inmunoprecipitaciones se realizaron variando la dilución del anticuerpo y manteniendo constante la cantidad de antígeno (p33 y p36) para inmunoprecipitar.

La cantidad de p33 y p36 que se observa con el uso de suero preimmune es igual al control en el cual el antígeno se incubó únicamente con Proteína A-agarosa.

2.2. Las inmunoprecipitaciones muestran que las proteínas p33 y p36 interactúan con otras proteínas *in vitro*.

Nuestro primer objetivo fue establecer cuáles eran las proteínas que interactúan con p33 y p36 en condiciones de déficit hídrico, ya que en estas condiciones se inducen p33 y p36. Como vimos en el punto anterior debíamos utilizar extractos marcados con biotina. Esto nos permitió un aumento en la sensibilidad de detección del experimento. Sin embargo, cabe hacer notar que con esta estrategia la actividad específica de cada proteína dependerá de la composición de aminoácidos y de la exposición de sus grupos aminos. Este hecho habría que tenerlo en cuenta durante el análisis de las proteínas inmunoprecipitadas.

En este experimento no solo quisimos establecer cuáles eran las proteínas que interactuaban con p33 y p36, sino además establecer si alguna de ellas estaba asociada con la fracción membranal. Para esto hicimos dos incubaciones de inmunoprecipitación:

1. Utilizamos un extracto proteico total marcado con biotina, obtenido a partir de tejido de plántulas bajo tratamiento de déficit hídrico en el cual sabemos que se inducen p33 y p36. Con esta inmunoprecipitación estaríamos observando todas las proteínas que *in vitro* interactúan con p33 y p36.
2. Utilizamos una fracción microsomal total marcada con biotina y solubilizada, de plántulas bajo tratamiento de déficit hídrico. A esta fracción le adicionamos el extracto proteico total sin marcar, el cual sólo se agregó como fuente de p33 y p36 en la incubación. En esta inmunoprecipitación estaríamos observando todas las proteínas que interactúan *in vitro* con p33 y p36 y que provienen de la fracción de microsomas totales, por lo tanto están marcadas con biotina.

Es importante destacar que todos los extractos que se marcaron con biotina se dializaron exhaustivamente para evitar la presencia de biotina libre durante la inmunoprecipitación, lo cual podría marcar al anticuerpo o a las proteínas de la fracción no marcada.

En la FIGURA 5A (carriles 1 y 2) observamos que al utilizar el extracto total marcado se observan aproximadamente 5 bandas, de las cuales dos de ellas corresponden a p33 y p36. Sin embargo, cuando se utilizan los extractos microsomales marcados con biotina

junto con el extracto proteico total no marcado FIGURA 5 A (carriles 3 y 4) se observan que todas las proteínas, excepto p36, provienen de la fracción microsomal total. En esta incubación encontramos que hay una banda que migra a la altura de 33 kDa que proviene de la fracción microsomal y que es probable que comigre con p33, FIGURA 5 A (carriles 3 y 4). Los controles, utilizando el suero preinmune (FIGURA 5 B, carriles 1 y 2) y la proteína A agarosa (FIGURA 5 B, carriles 3 y 4), no mostraron estas bandas. Si la película se expone a tiempos más largos, observamos numerosas proteínas (alrededor de 10) que forman parte del inmunoprecipitado, pero para los fines de este estudio sólo se consideraron las más abundantes (FIGURA 5 C, carriles 1, 2 y 3).

2.3. El patrón de proteínas que inmunoprecipita junto a p33 y p36 a partir de tejidos de plántulas sometidas a condiciones de estrés hídrico es ligeramente diferente si lo comparamos con el de riego.

En hoja, el patrón de proteínas del complejo que inmunoprecipita *in vitro*, es diferente al que se observa en la plántula y se modifica por tratamientos de sequía.

Uno de los objetivos del trabajo es establecer si existen diferencias en la interacción de p33 y p36 con la membrana plasmática en condiciones de estrés hídrico con respecto a una condición de riego óptimo. En condiciones de riego óptimo pueden detectarse p33 y p36 en los extractos de plántulas pero la inducción en condiciones de déficit hídrico es de 50 veces con respecto a riego.

Por medio de las inmunoprecipitaciones, nos limitaríamos a conocer si el patrón de proteínas que inmunoprecipita junto con p33 y p36 cambia debido a las condiciones de estrés; en particular, si varía el patrón de proteínas que pertenece a la membrana plasmática. Para ésto se extrajeron fracciones **microsomales totales** y fracciones enriquecidas en **membrana plasmática** de plántulas crecidas en condiciones de riego óptimo y bajo un tratamiento de dos días de déficit hídrico. En todos los casos, se marcaron y solubilizaron las fracciones membranales. Las incubaciones que se realizaron fueron las siguientes:

1. Fracción microsomal total solubilizada y marcada con biotina a la cual se le agregó un extracto proteico total sin biotinilar como fuente de p33 y p36, de plántulas crecidas en condiciones de **riego óptimo**.

2. Fracción microsomal total solubilizada y marcada con biotina a la cual se le agregó un extracto proteico total sin biotinilar como fuente de p33 y p36, de plántulas crecidas en condiciones de **déficit hídrico**.
3. Fracción enriquecida en membrana plasmática, solubilizada y marcada con biotina a la cual se le agregó un extracto proteico total sin biotinilar como fuente de p33 y p36, de plántulas crecidas en condiciones de **riego óptimo**.
4. Fracción enriquecida en membrana plasmática, solubilizada y marcada con biotina a la cual se le agregó un extracto proteico total sin biotinilar como fuente de p33 y p36, de plántulas crecidas en condiciones de **déficit hídrico**.

El resultado se observa en la FIGURA 6, donde encontramos que el patrón de bandas es similar en condiciones de riego óptimo (carriles 1 y 3) o de déficit hídrico (carriles 2 y 4). La diferencia que se observa está en la inducción de todas las bandas que inmunoprecipitan en condiciones de déficit hídrico, en particular, la banda cercana a 33 kDa que se intensifica en estas condiciones (carriles 2 y 4). Esta banda estaría comigrando con p33, ya que en el ensayo de tipo Western realizado sobre la misma membrana, no se observa la inducción en p33, como se ve en la autorradiografía; este ensayo también se realizó para establecer si estas bandas eran productos de degradación de p33 y p36. Como se observa en la FIGURA 6B, no se detectan bandas por debajo de p33 y p36, lo cual sugiere que las bandas que se detectan por marcaje con biotina no son productos de degradación de p33 y p36.

Por los antecedentes con que contamos, sabemos que p33/p36 son capaces de interactuar con la membrana plasmática de hojas de plantas adultas. Nos preguntamos si también existían diferencias en la conformación del complejo de interacción con p33/36 entre plantas adultas sometidas a tratamientos de déficit hídrico o de riego óptimo. En este caso, se utilizaron plantas de 28 días, las cuales tienen el tercer trifolio ya desarrollado. Las plantas fueron sometidas a un estrés hídrico moderado, el cual produce la pérdida moderada de la turgencia en las hojas y una pérdida en el peso fresco total del 30%. Este tratamiento no produce un incremento en la cantidad de p33 y p36 en las hojas. Como controles utilizamos plantas bajo condiciones de riego óptimo durante todo el tratamiento. En ambos casos las hojas se utilizaron como tejido para la extracción de la fracción de membrana plasmática.

Teniendo como referencia el patrón de bandas de la plántula en condiciones de déficit hídrico, observamos que en las hojas de las plantas crecidas en condiciones de riego óptimo el patrón de bandas que inmunoprecipita es similar al que obtenemos en plántulas (FIGURA 7), pero varía la abundancia de las mismas. Como se observa en la FIGURA 7 carril 2, una de las bandas que inmunoprecipita es más intensa (aprox. 33 kDa), mientras que las otras disminuyen en intensidad. En condiciones de estrés hídrico moderado, todas las bandas disminuyen en intensidad, en especial la banda de aprox. 33 kDa.

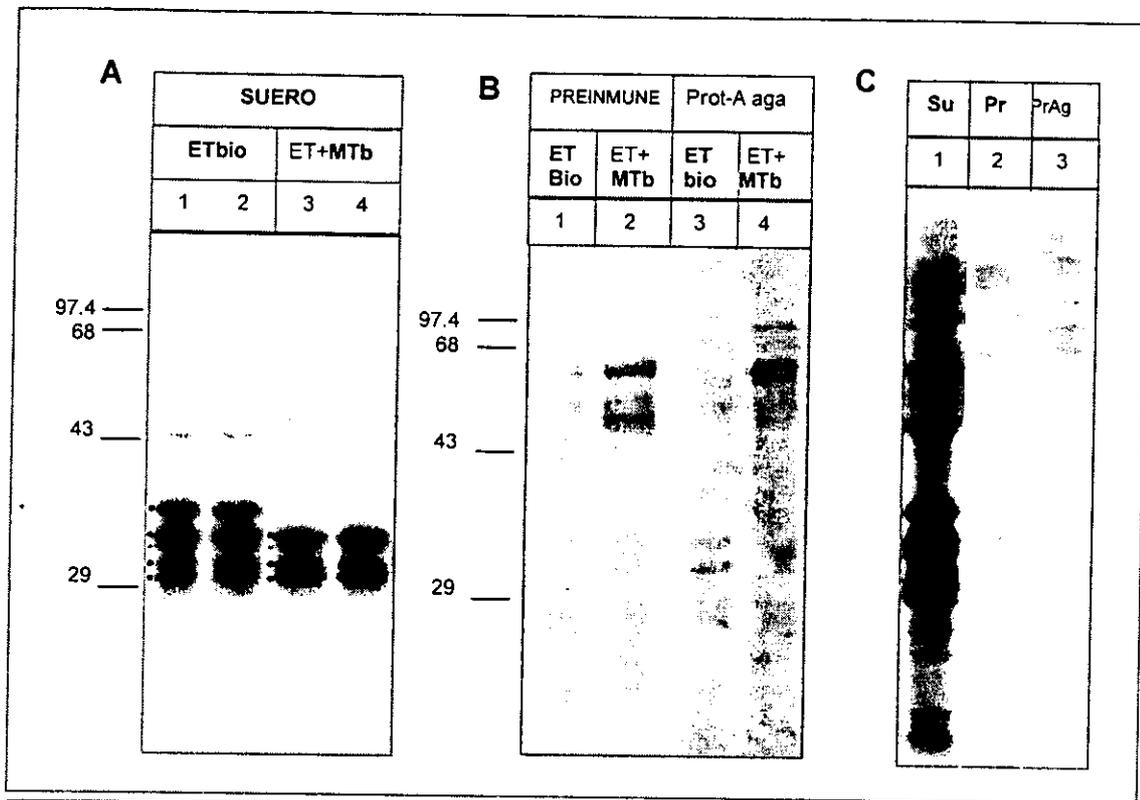


Figura 5: Proteínas inmunoprecipitadas a partir de extractos marcados con biotina.

En A, se muestran las inmunoprecipitaciones realizadas con:

- extracto proteico total marcado con biotina, de plántulas bajo condiciones de déficit hídrico (carriles duplicados 1 y 2).
- extracto proteico total + fracción microsomal marcada con biotina, de plántulas (ambos en condiciones de déficit hídrico) (carriles duplicados 3 y 4).

En B, se muestran los controles de las incubaciones anteriores, realizados con suero preimmune (carriles duplicados 1 y 2) y con proteína A agarosa (carriles duplicados 3 y 4).

ETbio : Extracto proteico total marcado con biotina de plántulas crecidas en estrés hídrico.

ET : Extracto proteico total de plántulas crecidas bajo condiciones de déficit hídrico.

MTbio : fracción microsomal total solubilizada y marcada con biotina.

SUERO: suero de conejo anti p33/36.

En C, se observa una inmunoprecipitación realizada con extracto proteico total marcado con biotina de plántulas crecidas en condiciones de déficit hídrico. En este caso el film se expuso a tiempos largos. Su: suero (carril 1), Pr: preimmune (carril 2), PrAa: proteína A agarosa (carril 3).

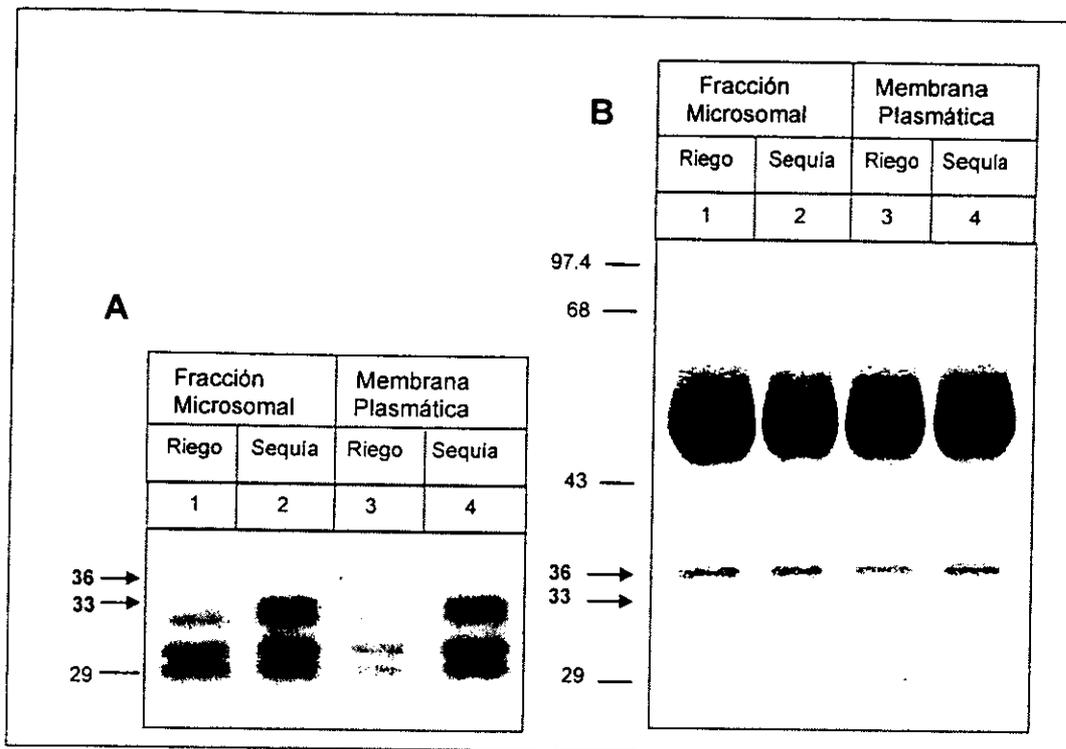


Figura 6: El patrón proteico que inmunoprecipita a partir de tejido sometido a estrés hídrico es ligeramente diferente al que se obtiene de tejido en condiciones de riego óptimo.

El inmunoprecipitado se separó en un gel de SDS-PAGE al 12%, luego se transfirió y se reveló para observar el patrón de proteínas marcadas. En todas las incubaciones la fracción marcada fue siempre la membranal, ya sea microsomal total o de membrana plasmática.

En el panel A, se observan las proteínas marcadas con biotina y el B, se muestra la misma membrana revelada por inmunodetección con el suero anti p33/36.

Carril 1: extracto proteico total de plántulas crecidas en condiciones de riego óptimo + fracción microsomal total marcada de plántulas (riego).

Carril 2: extracto proteico total de plántulas crecidas en condiciones de déficit hídrico + fracción microsomal total marcada de plántulas (déficit hídrico).

Carril 3: extracto proteico total de plántulas crecidas en condiciones de riego óptimo + fracción membrana plasmática marcada de plántulas (riego).

Carril 4: extracto proteico total de plántulas crecidas en condiciones de déficit hídrico + fracción membrana plasmática marcada de plántulas (déficit hídrico).

En ambos casos se muestra con flechas la posición de p33 y p36.

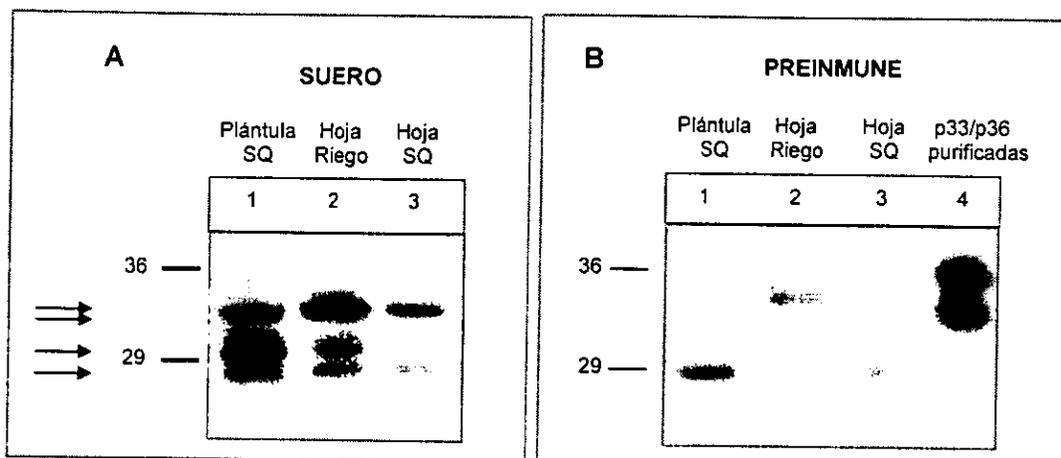


Figura 7: Inmunoprecipitaciones realizadas con extractos de hojas de plantas de frijol sometidas a condiciones de riego óptimo y sequía.

En el panel A, se muestran los resultados de las inmunoprecipitaciones realizadas con extractos proteicos totales y fracciones de membranas plasmáticas biotiniladas de hojas de plantas bajo condiciones de riego y sequía moderada.

En el carril 1 se observa la inmunoprecipitación realizada con extractos microsomales marcados, de plántulas de frijol sometidas a déficit hídrico más un extracto proteico total del mismo tejido sin marcar.

En el carril 2 se observa la inmunoprecipitación utilizando fracciones de membrana plasmática de hojas, marcadas con biotina más un extracto proteico total de hoja en condiciones de riego.

En el carril 3 se observa la misma incubación que en 2, pero utilizando tejido de hojas sometidas a un tratamiento de sequía moderada.

En el panel B, se muestran los controles de la inmunoprecipitación realizados con suero preinmune, en este caso, las incubaciones son como en A.

Las flechas indican la posición de las bandas de proteína que se observan en todas las

2.4. p33/p36 se detectan en fracciones de membrana plasmática.

Algunas proteínas descritas como proteínas de pared celular presentan dominios de membrana plasmática, como las AGPs y las WAKs. Ambas proteínas están relacionadas estructuralmente con la membrana plasmática, en el caso de las AGPs, poseen un grupo glucosilinositolfosfato (GPI) que las ancla a la membrana plasmática [Oaxley, 1999]. Las WAKs, en cambio, poseen un dominio transmembranal [He, 1999]. En ambos casos es posible detectar las proteínas tanto en la pared celular como en la membrana plasmática.

Dado que p33 y p36 son capaces de interactuar con la membrana plasmática, investigamos si era posible detectar ambas proteínas en las fracciones enriquecidas de membrana plasmática. Como se observa en la FIGURA 8B (carril 1), es posible detectar p33 y p36 en la membrana plasmática, aunque la cantidad que se detecta es variable y no es muy abundante. Como control, utilizamos un anticuerpo anti-extensina de soja (cedido por la Dra. G.Cassab) para ver si se detectaba otra proteína de pared celular asociada con las fracciones de membrana plasmática y no se observó señal (dato no mostrado).

2.5. Las fracciones de p33 y p36 que se mantienen asociadas a la membrana plasmática, permiten una asociación de proteínas diferente *in vitro*.

Anteriormente demostramos que el anticuerpo anti p33/p36 es capaz de detectar dos proteínas en las fracciones enriquecidas de membrana plasmática de pesos moleculares similares a p33 y p36, las cuales no son reconocidas por el suero preinmune. Si p33 y p36 se mantienen asociadas a la membrana plasmática, entonces deberían inmunoprecipitar junto con aquellas proteínas de membrana plasmática a las cuales estuvieran asociadas.

Para comprobarlo se hicieron las siguientes incubaciones de inmunoprecipitación:

1. Fracción microsomal total marcada con biotina y solubilizada mas un extracto proteico total sin marcar con biotina de plántulas crecidas en condiciones de déficit hídrico. De esta incubación también se realizó el control con suero preinmune.
2. Fracción microsomal total marcada con biotina y solubilizada de plántulas crecidas en condiciones de déficit hídrico.

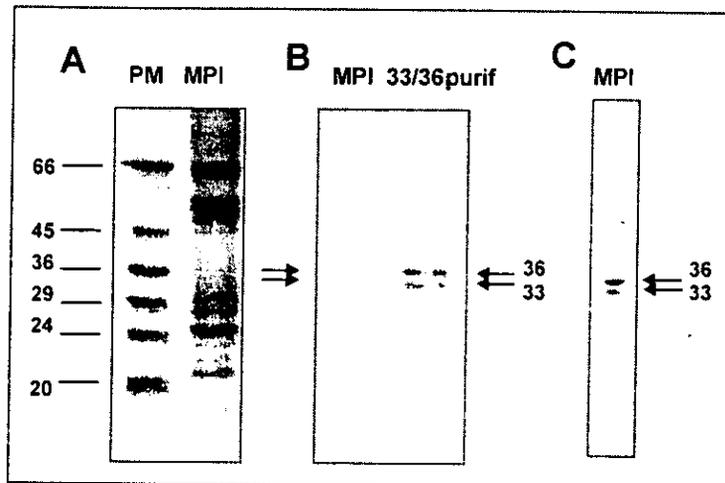


Figura 8: Presencia de p33/36 en la membrana plasmática de plántulas de frijol, sometidas a estrés hídrico.

Separación de proteínas de la fracción enriquecida en membrana plasmática en geles de SDS-PAGE al 12% (A y B).

En el panel A se observan las proteínas de membrana plasmática teñidas con Coomasie Blue.

En B, se muestra la inmunodetección utilizando el suero de conejo anti p33/36, en extractos de proteínas de membrana plasmática y el control de proteínas p33/36 purificadas. El revelado se hizo utilizando el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina.

En C se muestra la inmunodetección pero utilizando el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

En todos los casos se muestra la posición de p33 y p36.

El análisis del inmunoprecipitado de la incubación 2, con la fracción microsomal (ver FIGURA 9, carril 3), permite ver dos proteínas que comigran con p33 y p36 y que están marcadas, por lo tanto provienen del extracto microsomal, aunque la cantidad está por debajo del límite de detección por ensayos de Western. Por otro lado, observamos que existen otras dos proteínas que inmunoprecipitan y que estas proteínas tienen un peso molecular diferente si las comparamos con la incubación en la que agregamos el extracto proteico total (incubación 1). Por estos resultados podemos observar que el complejo que se forma con p33 y p36 *in vitro*, se modifica con el agregado de extracto proteico soluble total.

2.6. El complejo que inmunoprecipita es dependiente de la cantidad de extracto total y no de la fracción microsomal.

La incubación que se realiza para la inmunoprecipitación consta de dos partes: por un lado, la fracción membranal y, por otro el extracto proteico total. Por los datos anteriores sabemos que el complejo que esta inmunoprecipitando depende de la presencia del extracto proteico total, porque en ausencia de éste último obtenemos una asociación proteica diferente. Ahora nos preguntamos, de que depende la formación del complejo: de la cantidad de proteínas de la fracción membranal o de las proteínas presentes en el extracto total.

Para responder esto, se hicieron dos tipos de incubaciones: por un lado se mantuvo la concentración de la fracción membranal constante y se diluyó 1/10 la concentración de extracto proteico total ó, por otro, se mantuvo constante la concentración de extracto proteico total y se diluyó 1/10 la concentración de membrana plasmática. En ambos casos se trabajó con las fracciones membranales solubilizadas y marcadas con biotina. Como se observa en la FIGURA 10, la formación del complejo que inmunoprecipita *in vitro*, es dependiente de la cantidad de extracto total presente en la incubación, no así de la fracción microsomal, esto puede observarse por que la cantidad de proteínas que inmunoprecipitan solo disminuyen si disminuimos en 1/10 la cantidad de extracto proteico total. Esto podría explicarse por que al diluir 1/10 el extracto proteico en la incubación también estamos diluyendo la cantidad de p33/p36 para inmunoprecipitación. Sin embargo, al realizar el ensayo de tipo Western sobre la misma membrana (dato no

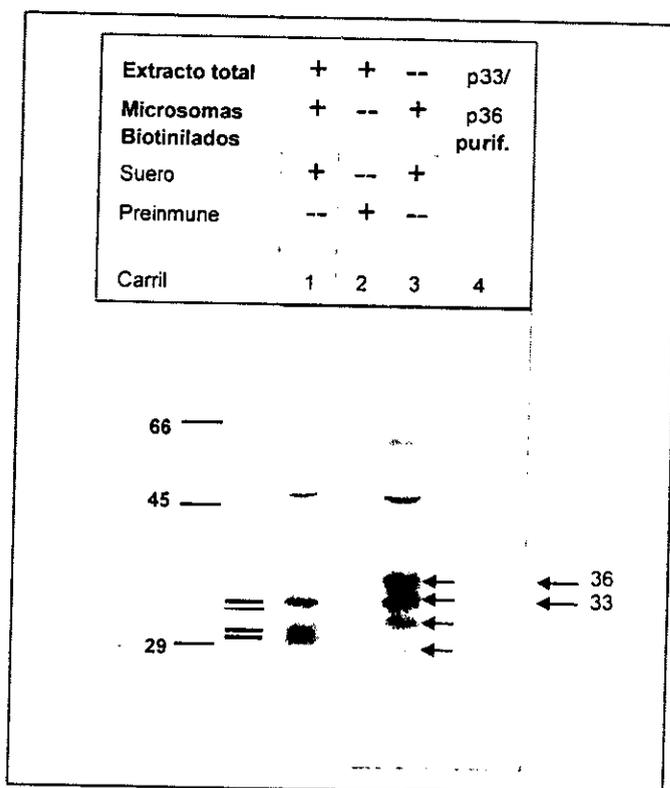


Figura 9: La inmunoprecipitación de la fracción membranal, sin el agregado de extracto proteico total muestra un patrón de proteínas diferente.

En la figura se muestra la autorradiografía de la separación del inmunoprecipitado en gel de SDS-PAGE al 12%

Carril 1: inmunoprecipitado de la incubación del extracto proteico total más una fracción de microsomas totales marcada con biotina.

Carril 2, control de la incubación 1 con suero preimmune

Carril 3, incubación utilizando la fracción microsomal marcada, sin el agregado de extracto proteico total. En el carril 4 se muestra la posición de p33/36 purificadas.

mostrado) vimos que las cantidades de p33 y p36 que inmunoprecipitan en todos los casos fue la misma, aún en la incubación en la se observa la disminución en las proteínas inmunoprecipitadas, lo cual nos sugiere que si bien esta inmunoprecipitando la misma cantidad de p33 y p36, habría una dependencia por otro factor presente en el extracto proteico total.

2.7. El complejo que inmunoprecipita *in vitro*, es dependiente no sólo de p33 y p36, sino de otro factor presente en el extracto proteico total.

El resultado anterior nos llevó a plantearnos si realmente la formación del complejo *in vitro*, es dependiente o no de otro factor adicional a p33 y p36 en el extracto proteico total. Para establecer esto se realizó un fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [30%, 40 % y 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] del extracto proteico total, obteniendo dos fracciones en las que no se detecta p33/p36 por Western Blot [30 y 80 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] (ver FIGURA 11 D, carriles 2 y 4) y otra fracción con una concentración alta de p33/p36 [40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] (FIGURA 11 D, carril 3). Estas fracciones, sin biotinilar, se dializaron y luego se utilizaron para inmunoprecipitar junto con microsomas totales marcados, provenientes de plántulas sometidas a estrés hídrico. Como se observa en la FIGURA 11 A, encontramos que al inmunoprecipitar con la fracción del 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (carril 4), disminuye la intensidad de las bandas. La fracción del 30 % (baja concentración de p33/p36) (carril 2) tiene casi la misma señal que la fracción del 40% (alta concentración de p33/p36) (carril 3). En todos los casos las bandas que se observan corresponden a las que inmunoprecipitan con el extracto total (carril 1). Se realizó la inmunodetección por ensayos de Western sobre la misma membrana y se observó que todas las incubaciones tienen concentraciones similares de p33 y p36 inmunoprecipitadas (ver FIGURA 11C), aún en la incubación con la fracción del 80%, donde la disminución en las proteínas que inmunoprecipitan con p33/p36 es notablemente menor. Esto nos sugiere que el patrón de inmunoprecipitación obtenido con el extracto total depende de otro factor presente en las fracciones del 30 y 40 %.

Este resultado sugiere que el suero anti-p33/p36 es capaz de inmunoprecipitar a ambas proteínas, pero para que se logre la inmunoprecipitación de este complejo *in vitro*, es necesaria la presencia de otro factor que proviene de la fracción soluble del extracto total.

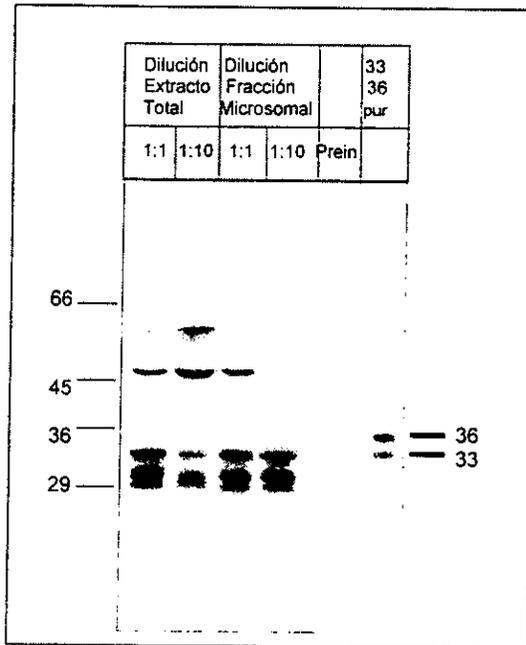


Figura 10: Inmunoprecipitación incubando extracto proteico total y fracción microsomal marcada con biotina de plántulas sometidas a estrés hídrico.

Carril 1: incubación de extracto proteico total (déficit hídrico) + fracción microsomal marcada (déficit hídrico).

Carril 2 incubación de una dilución de 1/10 del extracto proteico total (déficit hídrico) + fracción microsomal marcada (déficit hídrico).

Carril 3: incubación de extracto proteico total (déficit hídrico) + fracción microsomal marcada (déficit hídrico).

Carril 4: incubación de extracto proteico total (déficit hídrico) + una dilución 1/10 de la fracción microsomal marcada (déficit hídrico).

Carril 5: incubación igual al carril 1, pero con suero preimmune.

Carril 6: Estándar con p33/36 purificadas.

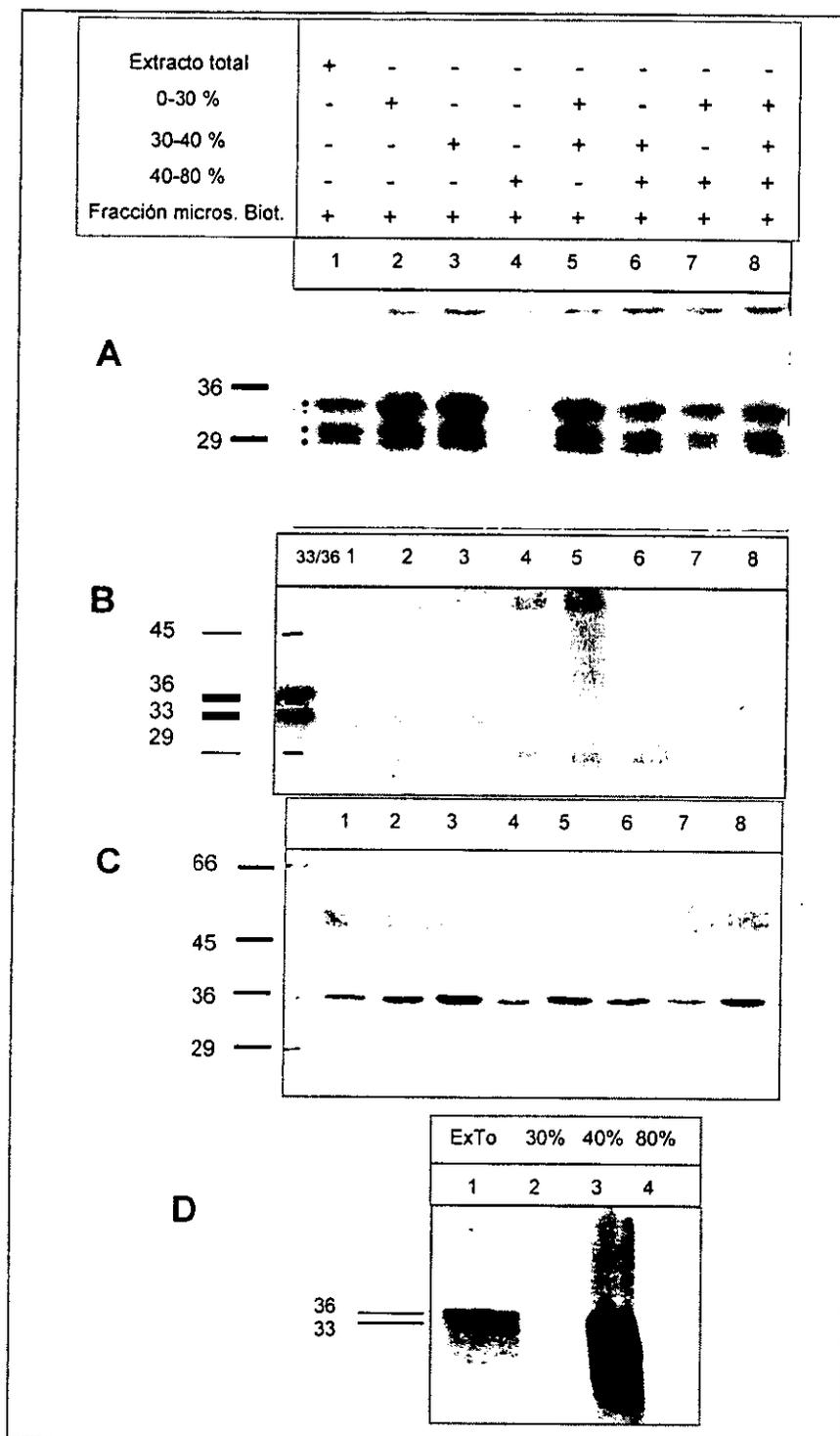


Figura 11. Inmunoprecipitación realizada con extracto proteico total y con el fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de ese mismo extracto, junto con fracción de microsomas totales biotiniliados de plántulas crecidas en condiciones de estrés hídrico.

A : resultados de la inmunoprecipitación vista por el revelado de las proteínas biotiniladas.

B : Controles: resultados de la inmunoprecipitación utilizando suero preinmune.

C : resultado de la inmunodetección de la misma membrana que en A, con suero Anti p33/36.

D : Inmunodetección de p33/36 en los extractos utilizados para la inmunoprecipitación.

2. INTERACCIÓN DE p33/p36 CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA *in vitro*.

Resultados anteriores obtenidos en el laboratorio [García-Gómez *et al.*, 2000], establecieron la interacción de las proteínas p33/36 con la membrana plasmática. En este trabajo estamos interesados en estudiar la interacción en condiciones de estrés hídrico. En estas condiciones p33/36 se inducen en plántulas de frijol, 50 veces con respecto al control en condiciones de riego óptimo. Esto nos motivó a preguntarnos si este aumento en la cantidad de proteína soluble que se observa en la pared celular se ve reflejado también en la interacción con la membrana plasmática o no. Nuestra hipótesis considera que este aumento en la cantidad de proteína de pared podría modificar la interacción con la membrana plasmática. Esta modificación en la interacción podría deberse a una modificación en la asociación con otras proteínas de la membrana plasmática (o asociadas), en la afinidad por la interacción, en la cantidad de proteínas que interaccionan, o el caso contrario, que no hubiera ningún tipo de modificación como consecuencia del aumento de las proteínas en pared celular que se produce durante el déficit hídrico.

Si bien no evaluamos todas las posibilidades antes mencionadas, pensamos que una de las formas de abordar el estudio de la interacción era estableciendo cuáles eran las proteínas que se asocian a p33 y p36 en condiciones de riego, cuáles de ellas se encuentran en la fracción de la membrana plasmática o están asociadas a ella y si existe una modificación en el patrón de proteínas como consecuencia del déficit hídrico. Para esto recurrimos a la técnica de la inmunoprecipitación. Esta técnica es utilizada para aislar un antígeno mediante el uso de su anticuerpo unido a una matriz sedimentable. Si el antígeno forma parte de un complejo proteico es muy probable que inmunoprecipite junto con las proteínas que interaccionan con él. Basándonos en esta idea, realizamos una serie de experimentos para establecer qué proteínas están interactuando con p33 y p36 y cuáles de ellas se encuentran asociadas a la fracción de la membrana plasmática. Para realizar estos experimentos contamos con un suero de conejo que contiene anticuerpos que reconocen a p33 y p36 específicamente.

DISCUSIÓN.

Discusión

Siguiendo con los estudios sobre interacción entre p33/p36 con la membrana plasmática intentamos establecer cuáles eran los cambios que se producían en la interacción como respuesta al déficit hídrico. Recordemos que una característica de estas PRPs, es que en estas condiciones se induce la cantidad de proteína soluble en la pared celular. Esta inducción llega a ser de 50 veces en proteína con respecto a su control en condiciones normales de riego [Covarrubias et al, 1995]. La pregunta que surge es cuál es la función de estas proteínas en la pared celular y cuál es el rol que tienen en su interacción con la membrana plasmática en condiciones de déficit hídrico. Si analizamos las características del grupo de proteínas PRPs vemos que, como la mayoría de las proteínas de pared celular están reguladas por desarrollo y son tejido específicas. Además se las encuentra en forma soluble en la pared celular o pueden insolubilizarse como respuesta al daño o al ataque de patógenos [Bradley, 1992]. No se conoce como se produce este proceso, aunque se propone que es por la actividad de peroxidasas [Bradley, 1992]. Estas observaciones nos indican que la proteína puede hallarse en distintas conformaciones, lo cual les permitiría modular las características estructurales de la pared celular, así como su interacción con la membrana plasmática.

Un sistema experimental como los cultivos de células en suspensión ofrecen múltiples ventajas para el análisis funcional de proteínas de la pared celular vegetal. Por ejemplo, nos permite el análisis en un sistema celular homogéneo, así como la imposición de diferentes condiciones de crecimiento y el análisis relativamente rápido después de diferentes periodos de tratamiento. Por otro lado es posible un análisis más detallado de las interacciones con la membrana plasmática. Para ello quisimos abordar el estudio de la interacción en condiciones de estrés utilizando un cultivo celular de frijol. Trabajos similares permiten detectar *in vivo*, los cambios que se producen en las células como consecuencia del estrés y las modificaciones que se observan con el agregado de proteínas o de péptidos, al medio de cultivo [Canut, 1998]. La caracterización de este cultivo celular en cuanto al comportamiento de p33/p36 nos mostró que: (1) el cultivo celular presenta una mayor proporción de p36 con respecto a p33 [FIGURA 1], siendo una característica propia del tejido del cual se partió para establecer el cultivo celular [FIGURA 2]. (2) También mostramos que p36 se excreta al medio de cultivo [FIGURA 1]. Otros grupos describieron la presencia de proteínas de pared celular en el medio de cultivo,

argumentando que la secreción de proteínas se debe a un cambio en las características de la pared celular que pudieran incrementar el recambio de componentes de pared celular [Robertson, 1997]. En otros casos se observó la secreción de proteínas al medio de cultivo durante el tratamiento con sales, en este caso se propuso que la secreción se debe a un mecanismo de adaptación de las células a altas concentraciones de sal [Esaka, 1995]. En el caso de p36, la explicación más apropiada sería la aprimera, ya que considero que las células en cultivo sufren cambios por las variaciones del mismo y, por tanto, éstos se reflejarían en la modificación de la pared celular. Bajo la hipótesis de que la acumulación de p33/p36 en la pared celular induciría una mayor interacción de la misma con la membrana plasmática, producto de una situación de estrés o de algún estadio de desarrollo, el hecho de que una alta proporción de p36 se secretara al medio de cultivo podría traducirse en una desventaja para los objetivos iniciales, ya que esto pudiera alterar su interacción con la membrana plasmática. (3) También comprobamos que no hay inducción de p33 y p36 como respuesta al tratamiento con ABA, lo cual indica que el cultivo celular no es comparable con la respuesta dependiente de ABA que se produce en la plántula. Por resultados obtenidos en nuestro y en otros laboratorios, sabemos que la concentración de ABA que utilizamos induce la expresión de genes modulados por ABA [Colmenero Flores, 1997]. Queda por explorar si este resultado es el reflejo de que su acumulación inducida por ABA en la planta es específica de tejido o de algún estado de desarrollo.

También tratamos de generar una situación de déficit hídrico mediante el uso de solutos. Utilizamos NaCl, sin embargo, los resultados que obtuvimos no mostraron una tendencia clara. Observamos una respuesta muy variable tanto en la los niveles de p36 en la célula como en el medio (datos no mostrados), que atribuimos a la variabilidad del cultivo. (4) Finalmente, observamos que la acumulación de p33/p36 se ve afectada por el tiempo de crecimiento del cultivo, p36 es más abundante en cultivos más viejos, sugiriendo que los niveles de p36 se ven afectados por el estado del cultivo.

Si bien descartamos el uso de este sistema experimental por que no se comportaba como el sistema de plántulas de frijol, creemos que es un sistema muy útil para el estudio de la interacción entre proteínas de pared celular y la membrana plasmática, en condiciones normales de crecimiento.

Dentro de las proteínas de pared celular existen algunos ejemplos de proteínas asociadas a la membrana plasmática, tal es el caso de las AGPs y de las WAKs y de otras proteínas

que mantienen una fuerte unión con la membrana plasmática. Ambos grupos de proteínas pueden ser aislados tanto en la fracción de pared celular como en la fracción de membrana plasmática. Para las AGPs la unión con la membrana plasmática se produce mediante un grupo glucoinositolfosfato [Oxley, Bacic, 1999], mientras que las WAKs además de su dominio extracelular poseen un dominio transmembranal [He, 1996]. Por otro lado, se ha observado que las extensinas permanecen adheridas a la membrana plasmática de protoplastos. Se ha reportado, además, que la incubación de protoplastos de tabaco con extensina purificada evita la desorganización de los microtúbulos corticales durante el tratamiento con frío [Akashi, Shibaoka, 1990 y 1991] y se ha sugerido que esta unión estaría dada por la interacción de las extensinas con una proteína de membrana plasmática, ya que el tratamiento de protoplastos con tripsina anula el efecto.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, previos a este trabajo, demostraron por primera vez que este tipo de proteínas PRPs (p33 y p36) son capaces de interactuar con la membrana plasmática. También se demostró que esta interacción está mediada por factores proteicos [García-Gómez et al, 2000]. En este trabajo previo también se trató de identificar aquellas proteínas de la membrana plasmática que interactúan con p33/p36 a través de un experimento de tipo unión sobre proteínas unidas a membrana de nitrocelulosa. En esta tesis se aborda nuevamente la pregunta de cuáles proteínas en la membrana plasmática interactúan con p33/p36, a través de una estrategia experimental diferente, haciendo uso de inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti p33/p36. De acuerdo con las observaciones anteriores, mis datos muestran que p33/p36 se encuentran adheridas a la membrana plasmática. El hecho de que estas proteínas se detecten en la fracción de la membrana plasmática purificada indica que esta unión es muy fuerte ya que se mantiene aún después del proceso de extracción. Como control de este experimento utilizamos un anticuerpo anti-extensina de soja (cedido por la Dra G.Cassab), para realizar un ensayo de tipo Western Blott en los extractos de membrana plasmática y no detectamos ninguna señal, lo cual nos indica que la interacción entre p33 y p36 con la membrana plasmática se mantiene, particularmente, aún después de la purificación. Si comparamos con las secuencias de PRP2 de soja, que son homólogas a las de frijol, en ellas no se encuentran dominios transmembranales ni modificaciones que hagan suponer la presencia de un anclaje a membrana lo cual estaría de acuerdo con la hipótesis que estas proteínas interactúan por reconocimiento de ligandos proteicos en la membrana plasmática.

En concordancia con esta propuesta, los resultados obtenidos de los experimentos de inmunoprecipitación muestran no solo que p33/p36 son capaces de unirse a proteínas asociadas a la membrana plasmática, sino que esta unión involucra a más de una proteína, es decir, a un complejo proteico.

Aún cuando es posible detectar proteínas en un rango amplio de peso molecular, si se consideran aquellas que mostraron una mayor señal en nuestro sistema de detección se identificaron al menos 5 proteínas que se encuentran en la fracción de membrana plasmática y que inmunoprecipitan en un complejo junto con p33/p36. Los pesos aproximados de estas proteínas están en un rango entre 33 y 28 kDa [FIGURA 5A].

Los controles que se incluyeron en estos experimentos nos permitieron descartar que estas proteínas provinieran de la degradación de p33 y/o p36, así como que fueran el resultado de una inmunoprecipitación inespecífica. También descartamos que fueran contaminantes de las fracciones no membranales, al demostrar que las únicas proteínas marcadas con biotina son las pertenecientes a la fracción de membrana plasmática. Aquí cabe recordar que aún cuando las proteínas marcadas con biotina se purifican en la fracción de membrana plasmática, éstas corresponden no sólo a proteínas integrales de membrana plasmática, sino también a proteínas asociadas a la misma. Por otro lado, resulta relevante el hecho de que los patrones de proteínas en el complejo son diferentes cuando éste se inmunoprecipita a partir de la fracción de la membrana plasmática sin agregar el extracto total de proteínas (no marcadas), a cuando se obtiene de la fracción de membrana plasmática más el extracto total de proteínas [FIGURA 9, carriles 1 Y 3].

Por un lado, estos resultados muestran que las proteínas p33/p36 que permanecen unidas a la membrana plasmática son suficientes para inmunoprecipitar en asociación con otras proteínas. Por otro, el hecho de que la adición de la fracción de proteínas totales (no marcadas) induce la inmunoprecipitación de un patrón de proteínas diferentes sugiere que existe un factor presente en el extracto proteico que es necesario para la asociación con otras proteínas. Por ello es posible suponer que la asociación que presentan p33/p36 es diferente en ambos casos.

Si comparamos las proteínas que inmunoprecipitan partiendo de tejido de plántulas que se sometieron al déficit hídrico, con respecto a las que se mantuvieron en riego óptimo, observamos el mismo patrón proteico, pero se observa la detección más intensa de una banda de proteína de aproximadamente 33 kDa que se induce en condiciones de déficit hídrico.

Una de las diferencias que encontramos al comparar el estado de plántula y la hoja es que cambia el patrón proteico [FIGURA 7A]. Se observa una mayor proporción de una proteína de aproximadamente 33 kDa y disminuye la señal de otras dos de menor peso molecular. Al mismo tiempo, observamos que el tratamiento de sequía moderada en la hoja provoca la disminución en la señal de la proteína de 33 kDa.

Si bien encontramos diferencias entre los patrones de proteínas que interactúan con p33/p36, en condiciones de riego y déficit hídrico, no podemos establecer cual es la ventaja o función en esta modificación del patrón proteico para la interacción en condiciones de estrés. Sin embargo, podemos establecer que la interacción es específica con proteínas de la membrana plasmática.

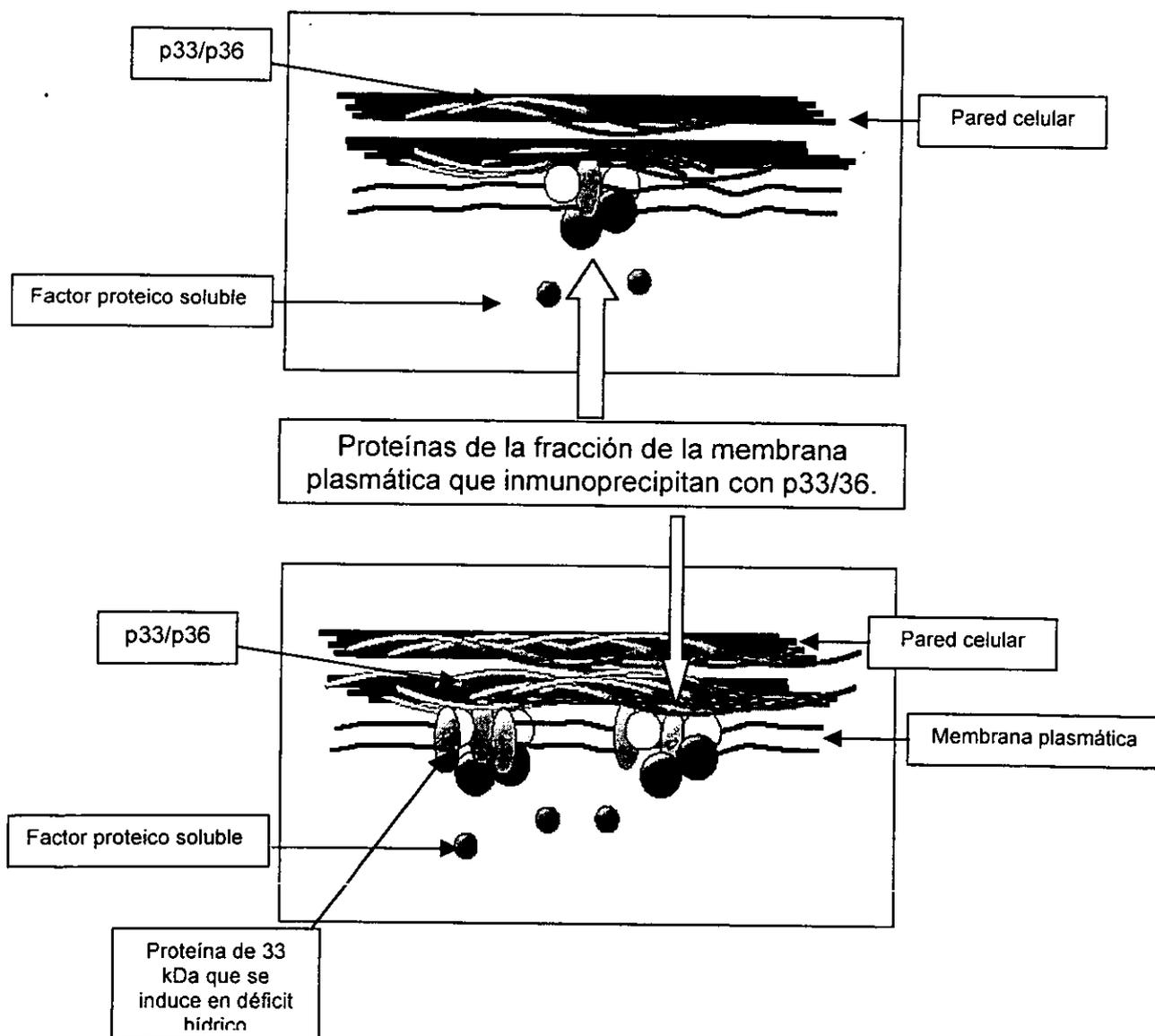
Debemos considerar otras posibilidades que pudieran estar modificando la interacción durante el estrés; entre ellas consideramos una modificación en la afinidad de la interacción entre p33/p36 con las proteínas de membrana plasmática. Para evaluar esta posibilidad tratamos de medir la afinidad en la interacción, pero encontramos que las membranas arrastran proteína asociada, lo cual podría llevar a obtener valores que no son representativos de la interacción.

También intentamos ver la interacción en experimentos de tipo Far-Western, pero encontramos que se detectaban proteínas biotiniladas naturalmente y otras con actividad peroxidasa que interferían con la observación de la interacción proteica entre p33/p36 y las proteínas de membrana plasmática.

Aunque a la fecha desconocemos la identidad de las proteínas que conforman el complejo algunas estrategias para acercarnos a ello sería el uso de anticuerpos homólogos o heterólogos contra proteínas candidatas, junto con el aislamiento del complejo en condiciones nativas. Ejemplo de esto es la purificación del complejo que forman AtGRP3, WAK1 y KAPP o la caracterización del complejo de CLV1, CLV2 y KAPP. Para esto, se requiere separar el extracto proteico total en una cromatografía de exclusión molecular e identificar los posibles candidatos mediante ensayos de Western. Los datos anteriores reportados por García-Gómez *et al.*, (2000), indican que p33/36 interactúan con la membrana plasmática a través de proteínas de tipo integrina, porque la interacción entre p33/36 es competida con el péptido RGD y fibronectina y es dependiente de Ca^{+2} . Si bien no se ha demostrado la existencia de proteínas tipo integrinas en plantas, se ha establecido que el péptido RGD es capaz de interactuar con la membrana plasmática con una cinética similar a la interacción con un receptor. Recordemos que en la matriz

extracelular de animales existe un tipo de proteínas con una estructura similar a las PRPs y son las moléculas de colágeno. El colágeno es rico en prolínas, hidroxiprolínas y glicinas, y es capaz de interactuar de forma específica con proteínas de membrana plasmática del tipo integrinas, lo cual podría sugerir una función similar para las proteínas del tipo PRP.

Con los datos que contamos podemos presentar el siguiente modelo para la interacción entre p33 y p36 en condiciones de riego y déficit hídrico (esquema 1)



MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

En el laboratorio se utiliza el frijol, *Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa (PRONASE), como sistema de estudio de la sequía en las plantas. En esta variedad se realizó la caracterización de p33/p36 [Covarrubias *et al.*, 1995].

Sistemas experimentales.

1. Cultivo de células de frijol en suspensión.

En la búsqueda de un sistema experimental para el estudio de la interacción entre la pared celular y la membrana plasmática *in vivo*, analizamos un cultivo celular de frijol.

El cultivo de células en suspensión de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa) fue establecido en el laboratorio del Dr. Rocha. El cultivo proviene de callos, formados a partir de cotiledones inmaduros, que se disgregaron para establecer el cultivo celular. El cultivo en suspensión se mantiene con agitación constante en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio de cultivo de Shenk & Hildebrand, a 26 °C y en oscuridad. Para conservar el cultivo en crecimiento, éste se diluye, cada 7 días dividiendo el contenido de cada matraz en dos y agregando un volumen igual de medio de cultivo fresco.

1.1. Tratamiento con ABA.

En este caso, las células se incubaron en medio de cultivo adicionado con 10 μ M de ABA (+/- ácido abscísico, Sigma). Los tratamientos se realizaron a los tiempos que se especifican en cada experimento. Cada tiempo corresponde a un Erlenmeyer de células en suspensión. Cada tratamiento se detiene poniendo el matraz en hielo y centrifugando para separar el medio de cultivo de las células. El control de cada tiempo es el cultivo sin el agregado de ABA. La concentración de las soluciones de ABA fue determinada teniendo en cuenta su coeficiente de extinción $\lambda_{252nm} = 25200$ (mol ABA). El ABA se disuelve en etanol absoluto o metanol y la solución concentrada se conserva a -20°C.

2. Experimentos realizados con plántulas de frijol.

2.1. Germinación y condiciones de crecimiento.

Las semillas de frijol se esterilizan superficialmente utilizando una solución al 10% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial durante 15 minutos, luego se lavan abundantemente con agua destilada. Posteriormente se colocan sobre papel humedecido con agua destilada,

se cubre la bandeja con papel aluminio para evitar la evaporación y se mantienen en cámara de crecimiento a 25 °C y en oscuridad durante 3 o 4 días, dependiendo del tamaño de la plántula. Se busca que las plántulas tengan aproximadamente entre 3 y 4 cm de hipocótilo para poder transplantarlas a vermiculita. En el momento del trasplante las plántulas todavía mantienen sus cotiledones. En este sustrato se realizan los tratamientos de déficit hídrico, ABA y los controles bajo riego óptimo.

2.2. Tratamientos de déficit hídrico y ABA en plántulas de frijol.

Los tratamientos de déficit hídrico y con ABA que se realizaron se describieron durante la caracterización de p33/p36 [Covarrubias *et al.*, 1995].

Las plántulas crecidas en condiciones óptimas (controles) se regaron con 5 ml de agua/g vermiculita, regando diariamente para mantener las condiciones hídricas. Para generar el déficit hídrico se utiliza una proporción de 0.625 ml de agua/gr vermiculita, ésto genera un potencial hídrico en el sustrato de $\psi_{\text{agua}} = -0.32$ MPa. Los tratamientos con ABA se realizaron tanto por aspersión con una solución 10 μM de ABA y aplicando la misma solución en una proporción de 5 ml de solución/gr vermiculita. En todos los casos, los tratamientos se realizaron en cámaras de crecimiento a 25 °C y en oscuridad, durante 3 días. En condiciones de riego y por el tratamiento con ABA las plántulas mantienen las características de plántulas etioladas, observando la elongación característica del hipocótilo. En condiciones de déficit hídrico se observa la detención en la elongación del hipocótilo y el crecimiento de la raíz, ambas características del déficit hídrico. En todos los casos las plántulas mantienen los cotiledones durante el tratamiento.

También se realizó el tratamiento con NaCl, en este caso las plántulas se transplantaron a vermiculita y se regaron con una proporción de 5 ml de solución 150 mM NaCl/g vermiculita, manteniéndolas en oscuridad a 25 °C durante 3 días en cámaras de crecimiento.

3. Uso de plantas de frijol.

Las semillas se germinaron como se describió anteriormente. Luego de tres días, las plántulas se transplantaron a macetas con vermiculita y se crecieron durante 25 días bajo un régimen de temperatura controlada y fotoperíodo natural, regando con solución nutritiva de Hoagland. A los 25 días de crecimiento la planta de frijol muestra el desarrollo del tercer trifolio.

3.1. Tratamiento de déficit hídrico moderado.

Las plantas de 25 días se retiran de su sustrato de crecimiento con mucho cuidado, tratando de no dañar la raíz. La raíz se lava con abundante agua destilada para sacar los restos de vermiculita. Luego, el exceso de agua se retira secando la raíz con papel absorbente. Posteriormente se pasa la planta entera a una cámara húmeda durante 24 hs. Pasado este tiempo se observa una pérdida de turgencia moderada en las hojas y la pérdida de peso fresco de la planta completa es del 25 al 30%. El control se mantiene bajo condiciones de riego óptimas durante todo el tiempo del tratamiento.

4. Anticuerpo utilizado para los ensayos de inmunodetección y para las inmunoprecipitaciones.

Se utilizó el suero de conejo anti p33/p36, obtenido por el Dr. Francisco Campos. El suero se obtuvo por la inoculación con las proteínas p33/p36 purificadas por filtración en gel y posterior separación en gel de SDS-PAGE. Por estudios anteriores se sabe que ambas proteínas están relacionadas antigénicamente, ya que el anticuerpo generado contra una de ellas reconoce a ambas proteínas [Covarrubias *et al.*, 1995]; por lo cual la inoculación se realizó con ambas proteínas. Para ver la especificidad del anticuerpo analizamos extractos totales de proteínas y fracciones purificadas de pared celular, en ambos casos el anticuerpo solo detecta a p33 y p36 y suele detectar una banda a la altura de 66 kDa, que correspondería al dímero de la proteína. El título de este suero es de 5 ng de proteína para una dilución 1/2500.

5. Análisis de proteínas totales en las células en suspensión y del medio de cultivo.

a. El contenido total del Erlenmeyer se centrifuga (800g X 10 min. a 4 °C) para separar el medio de cultivo de las células:

- A partir del sobrenadante se obtendrán las proteínas totales del medio de cultivo. Para esto el sobrenadante se filtra y se centrifuga a 17000g y 4 °C por 15 min. Se toma una alícuota que se mezcla con 4 volúmenes de acetona al 100 % y se deja a -20 °C durante toda la noche. Luego se centrifuga a 12000g, 15 min. a 4 °C. El precipitado obtenido se lava 3 veces con acetona fría y se liofiliza. El liofilizado se resuspende en un volumen mínimo con buffer Laemmli 2X [Laemmli, 1970].

- El paquete celular que se obtiene en a) se utiliza para la extracción de proteínas totales de las células. Las células se pulverizan en N₂ líquido. Se toma 1 g de polvo para la

extracción de proteínas totales. La extracción se realiza con el siguiente método: se agrega 1 ml de la mezcla que se debe mantener con agitación constante: 2 volúmenes de solución fenólica (fenol saturado en agua) y 1 volumen de buffer de extracción [0.7 M sacarosa, 0.5 M Tris base, 30 mM HCl, 2% βmercapto-etanol, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 12 mg/ml PVPP]. Se homogeneiza durante 5 min, se centrifuga y se toma la fase fenólica. Ésta se extrae nuevamente con 1 ml de la mezcla anterior, pero sin el agregado de PVPP. Se agita durante 1 min y se centrifuga a velocidad máxima. Se toma la fase fenólica que se diluye con 3 volúmenes de una solución 0.1 M de AcNH₄ (disuelto en metanol), se mezcla y se deja precipitar a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifuga y el precipitado se lava exhaustivamente con acetona (-20°C). Se liofiliza y se resuspende en un volumen mínimo de buffer Laemmli 2X.

Este método de extracción de proteínas totales también se utilizó con tejido de plántulas y hojas.

6. Separación de proteínas por electroforesis en gel de SDS-PAGE e inmunodetección.

Las muestras de proteínas totales se analizan por electroforesis en gel SDS-PAGE [Laemmli, 1970], al 12 % de poliacrilamida. El gel se tiñe con Coomassie Blue R-250 para estandarizar la cantidad de proteína en todas las muestras. Luego se corre un segundo gel para realizar la inmunodetección de p33/p36. En este caso, luego de la electroforesis en gel SDS-PAGE, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Hybond C extra, Amersham), utilizando una cámara de transferencia en semi-seco (OWL), durante 40 min a 200 mA y con el siguiente buffer: 0.19 M glicina, 25 mM Tris base, 20 % metanol [Towbin *et al.*, 1979]. Luego de la transferencia se verifica la posición de los marcadores de peso molecular tiñendo la membrana con reactivo de Ponceau (0.1% de Ponceau en ácido acético). Posteriormente la membrana se bloquea utilizando 0.5% de bloqueador Boehringer disuelto en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl), durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación vasculante. Una vez bloqueada la membrana, se incuba con el suero de conejo anti-p33/p36 (1:5000 disuelto en bloqueador) durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se lava con TBS (3 lavados de 10 minutos cada uno), para retirar el exceso de anticuerpo. Luego se incuba con el anticuerpo secundario, anti-conejo Igs-AP (Boehringer) (1:5000 disuelto en bloqueador), durante 1 hora. El lavado del anticuerpo se hace con 2 lavados de TBS de 10 minutos cada uno.

Previo al revelado de la membrana, ésta se lava por 10 min con el buffer utilizado para la reacción de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0.1 M pH 9.0, 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl). Posteriormente se incuba con el sustrato de la fosfatasa alcalina, BCIP/ NBT (disueltos en buffer para fosfatasa) hasta la aparición de las bandas. La reacción se detiene lavando la membrana con agua destilada.

7. Purificación de proteínas de la fracción soluble de la pared celular.

7.1. Método de purificación de proteínas básicas. Purificación de p33/p36.

Para purificar p33/p36 se utiliza el tejido de plántulas sometidas a déficit hídrico durante 3 días, ya que ambas proteínas se inducen en estas condiciones de crecimiento [Covarrubias *et al.*, 1995].

El tratamiento de déficit hídrico al que se somete a las plántulas se describió anteriormente y se logra regando al sustrato con 0.625 ml agua/g vermiculita. Luego de tres días de crecimiento en estas condiciones, las plántulas se cosechan, teniendo en cuenta retirar la vermiculita de la raíz sin dañar el órgano. Se cortan los cotiledones y el resto de la plántula se pulveriza con N₂ líquido. Por ser proteínas básicas se utiliza para su extracción una solución ácida, de acuerdo al método de Mazau *et al.* (1988). Este método utiliza el siguiente buffer: 75% etanol absoluto (v/v), 3.36% HCl concentrado (v/v), 0.1% (p/v) metabisulfito de Na, 1% (p/v) PVPP, en una proporción de 2 ml de buffer/g de polvo de N₂. El extracto se deja con agitación constante a 4 °C durante 48 hs. Luego se centrifuga y el sobrenadante se precipita con 4 volúmenes de acetona al 100 % a -20°C por 24 hs. El precipitado que se obtiene luego de centrifugar se lava con acetona, se liofiliza y se resuspende en acetato de Na⁺ 100 mM pH 4.5. Este extracto total de proteínas básicas se enriquece en p33/p36 por medio de una precipitación con SO₄(NH₄)₂. Ambas proteínas precipitan en la fracción del 40% de SO₄(NH₄)₂, por lo tanto se fracciona al 30%, 40% y 80% de SO₄(NH₄)₂. El precipitado se resuspende en acetato de Na⁺ 50 mM pH 4.5 y se dializa contra buffer acetato Na⁺ 50 mM pH 4.5.

7.2. Purificación de proteínas de pared celular.

Este método se utilizó para extraer la fracción de proteínas de pared celular. Mediante este método se extraen las proteínas utilizando fuerza iónica. [Cassab *et al.*, 1985]. El tejido se muele en N₂ líquido, luego se homogeneiza en 0.1% de buffer acetato de K pH 5.0, 4 mM Na₂S₂O₅ y 1% de PVPP, se deja unos minutos en hielo y se centrifuga 10 min a

1500 xg. La pastilla que se obtiene se lava con 0.5 % Nonidet P-40, 2 mM Na₂S₂O₅ y luego se hacen lavados exhaustivos con una solución de 4 mM Na₂S₂O₅, centrifugando entre lavado y lavado. Para la extracción de las proteínas la pastilla se incuba con 4 mM Na₂S₂O₅, 200 mM CaCl₂, durante toda la noche a 4 °C y con agitación vasculante. Posteriormente se centrifuga y el sobrenadante se utiliza como extracto de proteínas de pared celular.

8. Cuantificación de p33/p36.

La cuantificación se hace por dos métodos:

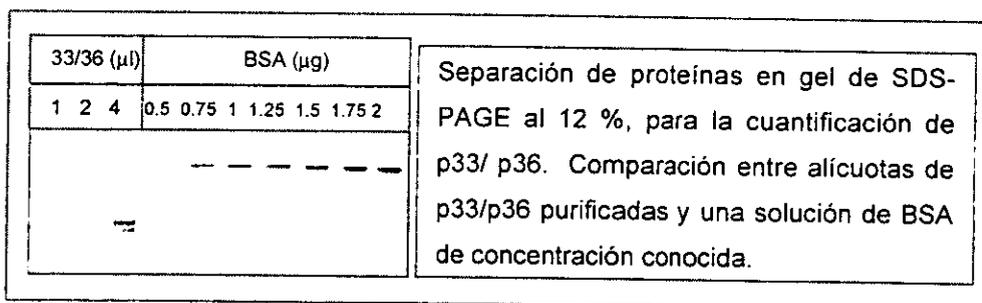
a) Cuantificación de la concentración de proteínas por la absorbancia a 280 nm.

La cuantificación depende de la cantidad de triptófanos y tirosinas de la muestra. Para una solución de BSA se considera que $\lambda_{280nm} = 0.7$ para una concentración de 1 mg/ml. Se puede realizar una corrección al método en el caso de que la muestra contenga ácidos nucleicos en la cual:

$$\text{Conc. Proteínas (mg/ml)} = 1.5\text{Abs}_{280nm} - 0.75 \text{Abs}_{260nm}$$

b) Cuantificación de la concentración de proteínas por geles de SDS-PAGE.

En este caso las proteínas purificadas se separan en un gel de SDS-PAGE al 12% y se compara con cantidades conocidas de una solución estándar de seroalbúmina bovina (BSA) previamente cuantificada.



No se utilizó el método de Bradford porque se encontró que no es representativo de la cantidad de proteína de las muestras de p33/p36 [Bradford, 1976].

Se utilizó el método de Bradford para la cuantificación de extractos proteicos totales, y fracciones membranales.

9. Marcaje de proteínas con el éster de biotina activado.

El marcaje de proteínas se realizó utilizando el éster D-biotina-N-hidroxysuccinimida (Biotina- NHS, Boehringer). El éster activado reacciona con los grupos aminos de las proteínas. El protocolo se sigue de acuerdo al procedimiento general. La biotina se resuspende en DMSO (5 µg/µl) y se agrega a la solución proteica entre 5 y 15 veces en exceso en concentración molar. La reacción se realiza en buffer PBS pH 6.5. Se deja con agitación de 2 a 4 horas y luego se dializa exhaustivamente contra PBS pH 6.5, para eliminar la biotina libre.

Cuando se marcan las proteínas p33/p36 purificadas, la reacción se lleva a cabo a 25°C durante una hora. En cambio, para extractos de proteínas totales o fracciones membranales, el marcaje se realiza a 4°C, durante 2-3 horas. En ambos casos con agitación.

10.1. Extracción de membranas de hoja de frijol.

Para la extracción de membrana plasmática se siguió el método de Vera-Estrella *et al.* (1999). Se utilizaron los trifolios de plantas de frijol de 28 días. Las hojas se cosecharon, se lavaron y se homogeneizaron en el siguiente buffer: 1.4 % (p/v) Tris base, 0.5 % (p/v) BSA, 10 % (p/v) glicerol, 1 mM PMSF, 5 % (p/v) PVP 10000, 5 mM EGTA, 400 mM manitol, 2 mM DTT, 0.1 mM benzamidina, 8 mM metabisulfito de Na, 1mM ácido ε-amino caproico (ajustado a pH 8.0 con H₂SO₄), en una relación 0.15 gr. tejido/ml de buffer. Se homogeneiza en licuadora, haciendo 3 pulsos de 30 seg, con 30 seg de descanso entre cada uno. Luego se filtra por gasa y el filtrado se centrifuga a 17400g a 4°C, durante 20 min. El sobrenadante se centrifuga a 150000g, 1 hora a 4°C. El precipitado que se obtiene corresponde a la **fracción microsomal total**.

La fracción microsomal total se resuspende en el buffer de resuspensión: 6 mM Tris-MES pH 8.0, 10 % (%p/v) glicerol, 250 mM manitol, 2 mM DTT y 1 mM PMSF (se ajusta a pH 8.0 con Tris base concentrado). Esta fracción microsomal total se separa en un gradiente de sacarosa discontinuo para obtener las fracciones membranales enriquecidas. Este

gradiente se realiza de acuerdo al método de Vera-Estrella *et al.*(1999), utilizando las soluciones de 16%, 32 % y 38 % de sacarosa disueltas en el buffer de resuspensión. El gradiente se centrifuga a 75000g, 2 horas a 4°C. Luego se recuperan las interfases del gradiente, las cuales están enriquecidas en las siguientes fracciones membranales: tonoplasto (interfase de 16%), retículo endoplásmico (32%) y **membrana plasmática (38%)**. Cada interfase se diluye con 4 volúmenes de buffer de resuspensión y se centrifugan a 150000g durante 45 min. El precipitado que se obtiene se resuspende en un volumen del mismo buffer y se fracciona para congelar rápidamente en N₂ líquido.

10.2 Extracción de membranas de plántulas de frijol.

Para la extracción de membranas se utilizaron plántulas de tres días de germinación, que se transplantaron a vermiculita y se sometieron a dos días de tratamiento, ya sea con riego óptimo o bajo condiciones de déficit hídrico (0.625 ml agua/g vermiculita). El protocolo que se siguió fue el mismo que para la obtención de membranas a partir de hojas de frijol, sólo se modificó el gradiente de sacarosa. Para localizar la ATPasa específica de cada fracción se realizó un gradiente de sacarosa continuo y se midió la actividad ATPasa en las fracciones del gradiente con y sin el uso de inhibidores. Así encontramos que la fracción membranal que se inhibe por nitrato y que corresponde a la actividad ATPasa vacuolar, es menos densa en plántula que en hoja: por esto utilizamos un gradiente de 10%, 32% y 38% de sacarosa.

11. Inmunoprecipitaciones.

Los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron para establecer que proteína/s interacciona/n con p33/p36. Para inmunoprecipitar se utilizó el suero de conejo anti p33/p36, el cual es capaz de inmunoprecipitar a ambas proteínas, p33 y p36 específicamente.

Los pasos que se siguieron para realizar la inmunoprecipitación fueron los siguientes:

11.1. Pegado del anticuerpo a proteína A agarosa.

Se incuban 10 µl de proteína A -Agarosa (Boehringer/Roche) con 5 µl de suero de conejo anti p33/p36 en 500 µl de Tris-HCl 50 mM pH 6.5, durante 1 hora a 4°C, con agitación continua. Se centrifuga 2 seg. a velocidad máxima y se hacen dos lavados con 1 ml del siguiente buffer: Tris-HCl 50mM, 300 mM de NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Tritón X100,

0.15 mM CaCl₂. Centrifugando 2 seg a velocidad máxima, entre cada lavado y separando el sobrenadante.

11.2. Extractos utilizados para inmunoprecipitar.

Los ensayos de inmunoprecipitación que se realizaron para titular el anticuerpo determinaron que la eficiencia de la inmunoprecipitación era muy baja. Por ésto se decidió utilizar proteína o extractos marcados con biotina para aumentar la sensibilidad del ensayo. Al mismo tiempo recurrimos a marcar de forma diferencial los extractos para determinar cual era la fracción a la que pertenecían las proteínas.

Se realizaron las siguientes incubaciones:

1. Extracto de proteínas totales marcadas con biotina.
2. Extracto de proteínas totales y una fracción microsomal total marcada con biotina.
3. Extracto de proteínas totales y una fracción enriquecida de membrana plasmática marcada con biotina.

El extracto de proteínas totales es la fuente principal de p33/p36 en todas las incubaciones.

La fuente de los extractos proteicos y de las fracciones membranales fueron plántulas y hojas de plantas sometidas a condiciones de déficit hídrico o riego.

Extracto total de proteínas:

El tejido se muele en N₂ líquido y se extrae utilizando un buffer que permite la extracción de proteínas solubles y membranales: Tris HCl 50 mM, 300 mM de NaCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, 1% Tritón X100, 0.15 mM CaCl₂; la relación que se utiliza es 1 g de tejido/2 ml de buffer. Se deja en hielo durante 7 minutos, se filtra usando gasa y el filtrado se centrifuga a 17400g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se utiliza para hacer la inmunoprecipitación.

Cuando se requirió del uso de extractos proteicos solubles se extrajo con el mismo buffer pero sin el agregado de detergentes y el extracto obtenido se centrifugó a 150000g durante 1 hora a 4°C para separar la fracción microsomal. El sobrenadante se utilizó para hacer la inmunoprecipitación.

En las incubaciones en las que se utilizó el extracto proteico marcado con biotina, éste se incubó con el éster de biotina durante 2 horas a 4°C y con agitación continua.

Posteriormente se dializó utilizando membrana de diálisis (Sigma) exhaustivamente contra PBS pH 6.5.

Fracciones membranales:

Se utilizaron dos tipos de fracciones membranales: la fracción microsomal total y la fracción enriquecida en membrana plasmática (ver protocolo de obtención de membranas plasmáticas de hoja y de plántula).

Las fracciones membranales se marcaron con biotina de la siguiente forma: se diluyen con PBS (conc. final 2X) pH 6.5 y se agrega el éster de biotina en una concentración de 5 veces en exceso. Se incuba a 4°C con agitación continua durante dos horas. Posteriormente se solubiliza con el siguiente buffer: 50 mM Tris-HCl, 2mM DTT; 1mM PMSF, 1% Tritón X100, 1.5% octilglucósido, 250 mM manitol, 10% glicerol, durante 1 hora a 4°C con agitación continua. Posteriormente se centrifuga a 16000g durante 30 min y se dializa exhaustivamente en buffer Tris-HCl 50 mM pH 6.5, 1 mM PMSF.

11.3. Inmunoprecipitación.

Luego del pegado del anticuerpo con la proteína A-agarosa (Ver 6.1), se incuba con el extracto proteico. La incubación se realiza en un volumen final de 1.5 ml y se mantiene 4 horas con agitación a 4°C. Luego de la incubación se centrifuga durante 2 seg a velocidad máxima y hacen dos lavados del inmunoprecipitado, con el siguiente buffer: Tris HCl 50 mM, 300 mM NaCl y 0.1% Tritón X100 y un lavado con agua destilada, centrifugando 2 seg entre cada uno, centrifugando entre cada lavado 2 seg y separando el sobrenadante. Se agregan 5 µl. de buffer Laemmli 6X y se hierve 1 minuto.

11.4. Análisis del inmunoprecipitado. Detección de proteínas marcadas con biotina.

El inmunoprecipitado se analiza separando las proteínas por electroforesis en gel de SDS-PAGE, al 12% de poliacrilamida, utilizando una cámara de electroforesis alta. La electroforesis se lleva a cabo, utilizando como marcadores de peso molecular, marcadores preteñidos. De esta forma es posible separar las proteínas hasta que el marcador de 18 kDa, llega al borde del gel. Posteriormente, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Hybond C extra, Amersham), utilizando una cámara de transferencia en semi-seco (OWL). La membrana se bloquea con 0.5% de bloqueador Boehringer en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente y se lava 3 veces con PBS,

cada lavado de 10 min. Luego se incuba 1 hora a temperatura ambiente con estreptoavidina acoplada a peroxidasa (dilución 1/3333 en PBS, Zymed). Posteriormente se lava tres veces con PBS (10 min cada lavado).

Para el revelado, la membrana se incuba durante dos minutos con el sustrato quimioluminiscente (Luminol) para la enzima peroxidasa (Sistema ECL, Amersham) y luego se expone a una película (KODAK) y se revela a distintos tiempos, dependiendo de la señal obtenida.

BIBLIOGRAFÍA.

Akashi T, Kawasaki S, Shibaoka H. Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells. (1990) *Planta* **182**: 363-369.

Akashi T, Shibaoka H. Involvement of transmembrane proteins in the association of cortical microtubules with the plasma membrane in tobacco BY-2 cells. (1991) *Journal of Cell Science* **98**: 169-174.

Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Hofte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. (1998) *Science* **279**: 717-720.

Baldwin T, McCann M, Roberts K. A novel hydroxyproline deficient arabinogalactan protein secreted by suspension cultured cells of *Daucus carota*. (1993) *Plant Physiol.* **103**: 115-123.

Bernhardt Ch, Tierney M. Expression of AtPRP₃, a proline rich structural cell wall protein from *Arabidopsis*, is regulated by cell-type-specific developmental pathways involved in root hair formation. (2000) *Plant Physiol.* **122**: 705-714.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. (1975) *Anal Biochem.* **72**: 248-254.

Bradley D, Kjellbom P, Lamb Ch. Elicitor and wound induced oxidative cross linking of a proline rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response. (1992) *Cell* **70**: 21-30.

Brett C, Waldron K. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Topics in plant functional biology:1. (1996) 2^o edition Chapman and Hall.

Canut H, Carrasco A, Galaud JP, Cassan C, Bouyssou H, Vita N, Ferrara P, Pont-Lezica R. High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall (1998) *Plant J.* **16**: 63-71.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

-
- Carpita N, Gibeaut D. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. (1993) *The Plant J.* **3**: 1-30.
- Cassab G, Nieto Sotelo J, Cooper J.; Jan van Holst G, Varner J. A developmentally regulated hydroxyproline rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. (1985) *Plant Physiol.* **37**: 532-535.
- Cassab G. Plant cell wall proteins. (1998) *Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **49**: 281-309.
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant like protein. (1997) *Plant Mol.Biol.* **35**: 393-405.
- Cooper J, Varner J. Cross linking of soluble extensin in isolated cell walls. (1984) *Plant Physiol.* **76**: 414-417.
- Cosgrove D. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants.(1997) *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **13**: 171-201.
- Covarrubias A, Ayala J, Reyes J, Hernández M, Garcarrubio A. Cell wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. (1995) *Plant Physiol.* **107**: 1119-1128.
- Crawford K, Zambryski P. Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. (1999) *Curr Op Plant Biol.* **2**: 382-387.
- Datta K, Schmidt A, Marcus A. Characterization of two soybean repetitive proline rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes. (1989) *Plant Cell* **1**: 945-952.

-
- Delmer D. Cellulose Biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. (1999) *Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **50**: 245-276.
- Esaka M. Specific secretion of proline rich proteins by salt adapted winged bean cells. (1995) *Plant Cell Physiol.* **36**: 441-446.
- Everdeen D, Kiefer S, Willard J, Muldoon P, Dey P, Li X, Lamport D. Enzymic cross linkage of monomeric extensin precursors *in vitro*. (1988) *Plant Physiol.* **87**: 616-621.
- Fowler T, Bernhardt Ch, Tierney M. Characterization and expression of four proline rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. (2000) *Plant Physiol.* **121**: 1081-1091.
- Fry S. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms (1986) *Ann.Rev.Plant Physiol.* **37**: 165-186.
- Gao M, Kieliszewski M, Lamport D, Showalter A. Isolation, chracterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan protein corresponding to the *LeAGP-1* gene. (1999) *The Plant J* **18**: 43-55.
- García Gómez B, Campos F, Hernández M, Covarrubias A. Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. (2000) *The Plant J.* **22**: 277-288.
- He Z, Cheeseman I, He D, Kohorn B. A cluster of five cell wall associated receptor kinase genes, *Wak 1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. (1999) *Plant Mol.Biol.* **39**: 1189-1196.
- He Z, Fujuki M, Kohorn B. A cell wall associated, receptor like protein kinase. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**: 19789-19793.

-
- Hong J, Nagao R, Key J. Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. (1987) *J.Biol.Chem.* **262**: 8367-8376.
- Hong J, Nagao R, Key J. Characterization of a proline rich cell wall protein gene family of soybean. (1990) *J.Biol.Chem.* **265**: 2470-2475.
- Hong J.; Nagao R.; Key J. Developmentally regulated expression of soybean proline rich cell wall proteins genes. (1989) *Plant Cell* **1**: 937-943.
- Josè Estanyol M, Ruiz Avila L, Puigdomènech P. A maize embryo specific gene encodes a proline rich and hydrophobic protein. (1992) *Plant Cell* **4**: 413-423.
- Kohorn B. Plasma membrane-Cell wall contacts. (2000) *Plant Physiol.* **124**: 31-38.
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227**: 680-685.
- Lane DR, Wiedemeier A, Peng L, Hofte H, Vernhettes S, Desprez T, Hocart CH, Birch RJ, Baskin TI, Burn JE, Arioli T, Betzner AS, Williamson RE. Temperature- sensitive alleles of *RSW2* link the *KORRIGAN* Endo-1,4- β -glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*. (2001) *Plant Physiol.* **126** : 278-288.
- Lang Pauluzzi I. The behaviour of the plasma membrane during plasmolysis: a study by UV microscopy. (2000) *Journal of Microscopy* **198**: 188-198.
- Majewska Sawka A, Nothnagel E. The multiples roles of arabinogalactan proteins in plant development. (2000) *Plant Physiol.* **122**: 3-9.
- Mazau D, Rumeau D, Esquerre Tugaye MT. Two different families of hidroxiproline rich glycoproteins in melon callus. (1988) *Plant Physiol* **86**: 540-546.

-
- Oparka K.J. Plasmolysis: new insights into an old process. (1994) *New Phytol.* **126**: 571-591.
- Oxley D, Bacic A. Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension cultured cells. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, **96**: 14246-14251.
- Park A, Cho S, Yun U, Jin M, Lee S, Sachetto-Martins G, Park O. Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase Wak1 with a glycine rich protein AtGRP-3. (2001) *J.Biol.Chem.* Papers in press. Publicado el 2 de mayo del 2001. Manuscrito N° M101283200.
- Pont Lezica R.F, McNally J, Pickard B. Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypothesis (1993) *Plant, Cell and Environment* **16**: 111-123.
- Reiter, Wolf-Dieter. Structure, synthesis, and function of the plan cell wall. (1994). En *Arabidopsis* **35**: 955-988. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Richmond T, Somerville Ch. The cellulose synthase superfamily. (2000) *Plant Physiol.* **124**: 495-498.
- Robertson D, Wojtaszek P, Bolwell G. Stimulation of cell wall biosynthesis and structural changes in response to cytokinin and elicitor treatments of suspension cultured *Phaseolus vulgaris* cells. (1999) *Plant Physiol.Biochem.* **37**: 611-622.
- Rose J, Bennett A. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. (1999) *Trends in Plant Science* **4**: 176-183.

-
- Ryser U, Schorderet M, Zhao GF, Studer D, Ruel K, Hauf G, Keller B. Structural cell wall proteins in protoxilem development: evidence for a repair process mediated by a glycine rich protein. (1997) *Plant J.* **12**: 97-111.
- Sachetto-Martins G, Franco L, Oliveira D. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif ? (2000) *Biochem.Biophys.Acta* **1492**: 1-14.
- Schultz CJ, Johnson KL, Currie G, Bacic A. The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. (2000) *Plant Cell* **12**: 1751-1767.
- Showalter A. Structure and function of plant cell wall proteins. (1993) *Plant Cell* **5**: 9-23.
- Taylor N, Laurie S, Turner S. Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. (2000) *Plant Cell* **12**: 2529-2539.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. (1979) *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, **76**: 4350-4354.
- Varner J, Lin LS. Plant cell wall architecture (1989) *Cell* **56**: 231-239.
- Vera Estrella R, Barkla B, Bohnert H, Pantoja O. Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptative mechanisms similar to those observed in the whole plant (1999) *Planta* **207**: 426-435.
- Wagner T, Kohorn B. Wall associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. (2001) *Plant Cell* **13**: 303-318.
- Wyatt R, Nagao R, Key J. Patterns of soybean proline rich protein gene expression (1992) *Plant Cell* **4**: 99-110.

Zambryski P, Crawford K. Plasmodesmata: Gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. (2000) *Ann.Rev.Cell Dev.Biol.*16: 393-421.