



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Proteómica de aleurona: Identificación
de proteínas membranales inducidas por
ácido giberélico (AG₃).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A
RUBÉN ZAMUDIO RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	IRMA OFELIA BERNAL LUGO
Vocal	ALBERTO GÓMEZ GUTIÉRREZ
Secretario	KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIÉRREZ
1er. Suplente	AURORA LARA NÚÑEZ
2do. Suplente	ARMANDO CONCA TORRES

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 104, Departamento de Bioquímica. Conjunto E, Facultad de Química.
UNAM**

Asesor
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

Supervisor Técnico
M. en C. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Sustentante
Rubén Zamudio Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme la vida y por enseñarme a construir un futuro, porque me han sabido transmitir una educación y una serie de valores que me permiten afrontar las dificultades de la vida cotidiana.

A la Dra. Irma Bernal por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A Vanessa Maya por su disposición, apoyo y enseñanzas durante la realización de mi tesis.

A mi amigo y compañero de equipo Serge, por enseñarme que el día puede tener más de 24 horas y que sino duermes se aprovecha mas el tiempo.

A todos mis amigos del dominó cubano, (Ana Karina, Ximena, Paloma, Christian, Fernanda, Daniela y agregados culturales) por los ratos de diversión y ocio; también a Rodrigo Alonso, Andrés, Fernando, Tere, Mitzi, Naye, Persy, Alma, Dariana, Katy, Ranferi, Luis (Chaparro), Héctor C., Alicia, Viviana, Chava, etc. en fin a todos los compañeros y amigos QA's que me faltó mencionar, porque todos han aportado algo a mi educación y a mi formación como ser humano.

A mis compañeros y amigos de primer semestre; Esteban, Daniel, Edgar, Marco, Héctor, Cheko, Marthita, Rosita, Mauricio, Dianita, Karina, Noé (laboratorista de química general) Katia, Yessica, Hugo, Alejandro, etc. por los partidos de futbol, sus borracheras y tantas anécdotas que hicieron más grata y amena mi estancia en la facultad.

A la infinidad de profesores y compañeros que conocí en el camino, IQM's, QFB's, IQ's y Q's que colaboraron de una u otra forma para que pudiera terminar la carrera.

Agradezco el apoyo técnico de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Agradezco a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Missouri y a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM por el apoyo con la secuenciación de las proteínas.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo con los estudios de RPE.

Al subprograma 127 "Formación Básica en Investigación"

Este proyecto fue financiado por la Facultad de Química (PAIP-6290-01); DGAPA (IN202806) UNAM; CONACyT (40599Z).

He dejado para el final a una persona que ha sido muy importante para mí en este largo proceso y que me ha sabido comprender y esperar el tiempo necesario, que me ha enseñado a ser una mejor persona... Porque hemos compartido muchas cosas buenas, algunas cosas malas y siempre hemos salido adelante, gracias Carmen, sin ti no lo hubiera logrado...

Mi debilidad es mi fortaleza...

CONTENIDO

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1 Transducción de señales	6
3.2 Proteómica	9
4. Objetivos	
4.1 Objetivo General	11
4.2 Objetivo Específico	11
5. Hipótesis	11
6. Material y Métodos	12
7. Resultados y Discusión	20
7.1 Comparación de patrones electroforéticos de semillas control (1998) con diferente tratamiento de AG ₃	20
7.1.1 Análisis cualitativo	20
7.1.2 Análisis cuantitativo del subproteoma constitutivo	22
7.2 Identificación de las proteínas inducidas por AG ₃ .	23
7.3 Función de las proteínas inducidas por AG ₃ .	25
7.3.1 Activación de la transcripción dependiente de AG ₃ .	25
7.3.2 Metabolismo de Lípidos y Carbohidratos	26
7.3.3 Metabolismo de especies reactivas de oxígeno (EROs)	28
7.3.4 Procesos en la pared celular de la aleurona	29
7.3.5 Proteínas de reserva	30
7.4 Actividad de proteasas	33
7.5 Identificación de proteínas membranales inducidas por AG ₃ con posible participación en la movilización de reservas	35
7.5.1 Patrones electroforéticos de semilla de bajo vigor (1985)	37
8. Conclusiones	46
9. Perspectivas	47
10. Bibliografía	48
11. Anexos	55
11.1 Anexo I. Intensidad relativa de proteínas constitutivas	55
11.2 Anexo II. Datos de viabilidad y actividad de α -amilasa	57
11.3 Anexo III. Características de proteínas identificadas	58

1. RESUMEN

En cereales, la movilización de reservas es estimulada y regulada por el ácido giberélico (AG_3) y todas las membranas celulares participan en esta respuesta. También se ha demostrado que durante la pérdida de viabilidad y vigor de las semillas, la composición proteica de los microsomas se altera. Esto sugiere que algunas de las proteínas membranales participan en la eficiencia de la movilización de reservas. Por lo anterior, en este trabajo se identificaron algunas de las proteínas membranales inducidas por AG_3 en la aleurona, utilizando como herramienta a la proteómica. Se identificaron 10 proteínas que participan en la respuesta a AG_3 : Isocitrato liasa y MnSOD ambas localizadas en el glioxisoma; subunidad beta del proteasoma 20S; β -alanina sintasa; glioxalasa I; oxalato oxidasa 2; una proteína de la familia de las cupinas; dextrinasa límite, globulina del embrión y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Las enzimas identificadas sugieren que el AG_3 incrementa, mucho antes de la secreción de α -amilasa, la actividad de diversas vías metabólicas, como la gluconeogénesis, la β -oxidación y el ciclo del glioxilato. Con la finalidad de definir si alguna de las vías metabólicas identificadas e inducidas por AG_3 participaba en la eficiente movilización de reservas se utilizó semilla de un lote de bajo vigor (1985) en las que la inducción de α -amilasa por AG_3 fue menor que en semilla control (1998). Concomitantemente, en este lote, el comportamiento electroforético de las proteínas microsomales se modificó; los endospermos presentaron un mayor nivel de radicales libres que sus respectivos controles; y el ciclo del glioxilato fue menos activo. Esto sugiere que en las aleuronas de la semilla de bajo vigor (1985) las vías que conducen a la utilización de los lípidos como fuente de energía y de intermediarios carbonados se encuentran dañadas y esto podría incidir en la menor eficiencia con la que el tejido sintetiza α -amilasa.

2. INTRODUCCIÓN

La movilización de reservas en semillas es el proceso fisiológico que proporciona los sustratos para que la plántula se desarrolle y adquiera la capacidad para establecerse como organismo autótrofo. La eficiencia de este proceso, incide importantemente en el vigor de la semilla (Bernal-Lugo, et. al. 1999) y por tanto en el éxito del establecimiento del cultivo. El vigor se define como la capacidad, que en campo, presenta la semilla para germinar y establecerse como organismo autótrofo y puede medirse determinando la actividad de α -amilasa (Ellis, 1992). Esta característica varía de lote a lote, dependiendo de las condiciones de producción y manejo poscosecha.

En cereales, la movilización eficiente de reservas depende del adecuado funcionamiento de la aleurona, a diferencia de la mayoría de los otros cereales, la cebada posee una capa de aleurona conformada por múltiples estratos, su composición y estructura es totalmente distinta a la del resto del endospermo, sus células no contienen gránulos de almidón, en cambio tienen alto contenido de proteína y lípidos (Serna, 1996). La aleurona es un tejido vivo que rodea al endospermo almidonoso y durante la germinación, su función es la de sintetizar y secretar las enzimas hidrolíticas (α -amilasa, proteasas, ribonucleasas, α -galactosidasa; Jones y Jacobsen, 1990) necesarias para la degradación del endospermo almidonoso (Lovegrove y Hooley, 2000). Esto con el objetivo de proveer energía y nutrimentos necesarios para el desarrollo del embrión (Jacobsen y Chandler, 1988).

Esta movilización de las reservas está estimulada por el ácido giberélico (AG_3) e inhibida por el ácido abscísico (ABA; Jacobsen y Chandler, 1988). Durante la germinación, el embrión sintetiza AG_3 , el cual difunde hacia el endospermo almidonoso hasta llegar a la capa de aleurona, donde desata una serie de respuestas fisiológicas que permiten la hidrólisis de las proteínas de reserva de estas células. Posteriormente, se inicia la síntesis *de novo* de enzimas hidrolíticas que son secretadas al endospermo almidonoso; sitio en que realizan la hidrólisis de

las reservas. Los productos de hidrólisis eventualmente viajan hacia el embrión donde son utilizados para su desarrollo (Jacobsen y Chandler, 1988).

3. ANTECEDENTES

La germinación es un proceso fisiológico que resulta en cambios significativos de la composición química y estructural de los granos. Estos cambios le permiten producir energía necesaria requerida para el crecimiento y desarrollo del embrión en una nueva planta. La germinación empieza cuando la semilla se expone a factores favorables como son la presencia de agua, la disponibilidad de oxígeno y la temperatura, que propician la síntesis de hormonas vegetales (giberelinas) seguida por la generación de enzimas que degradan los tejidos de reserva, el endospermo y el escutelo.

Las giberelinas son sustancias orgánicas que son capaces de generar y regular una o varias respuestas fisiológicas a través de transmitir señales específicas a lo largo de la planta. Se sintetizan en casi todas las estructuras de la planta en diferentes proporciones, dependiendo de los requerimientos del tejido donde se producen y de la planta en general. Producen cambios profundos y diversos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, un ejemplo lo constituye el ácido giberélico (AG_3 ; Fig. 1).

Muchos estudios han utilizado como sistema modelo la capa de aleurona de cereales. El conocimiento de los eventos regulados por el AG_3 en las células de aleurona ha avanzado a través de diferentes enfoques como lo son, la genética molecular, la biología celular, la electrofisiología y la bioquímica (Gilroy y Jones, 1994).

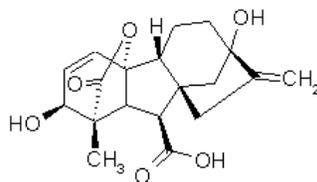


Figura 1. Estructura del ácido giberélico (AG_3)

En este trabajo se utilizó como modelo a la cebada. El grano maduro de cebada es de forma ahusada, más grueso en el centro y disminuyendo hacia los extremos. Está rodeado por el pericarpio, una estructura que sirve de protección; por el embrión y el endospermo, donde se almacenan carbohidratos (principalmente almidón) y proteínas que proveen la energía y nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión. El endospermo comprende al endospermo almidonoso, tejido de reserva no vivo, rodeado por un tejido vivo llamado capa de aleurona.

La capa de aleurona consiste de una a tres capas de células que rodean al endospermo almidonoso y cuya pared celular es muy rígida (Fig. 2). La especial rigidez de la pared celular se debe probablemente a que éste es un tejido en el cual sus células no se reproducen, por lo que deben estar bien protegidas de posibles daños a su estructura.

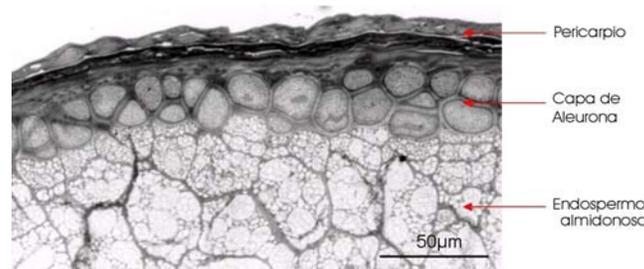


Figura 2. Micrografía que muestra la estructura del endospermo de cebada.

Durante el desarrollo de la semilla, ésta acumula reservas, que se almacenan en forma de proteínas, polisacáridos, lípidos y minerales en el endospermo y en la aleurona. Durante la germinación, estas reservas son degradadas y movilizadas hacia el embrión, donde son utilizadas como sustratos para su crecimiento (Lovegrove y Hooley, 2000). Esta movilización de las reservas está regulada por el AG_3 (Jacobsen y Chandler, 1988). La hidrólisis del almidón del endospermo de la semilla sucede a través de la acción de varias enzimas, la α -amilasa, β -amilasa, glucosidasa, etc. (Fig. 3; Skadsen, 1998). Todas estas enzimas son sintetizadas por la capa de aleurona durante la germinación y su producción también es regulada por el AG_3 (Jacobsen y Chandler, 1988).

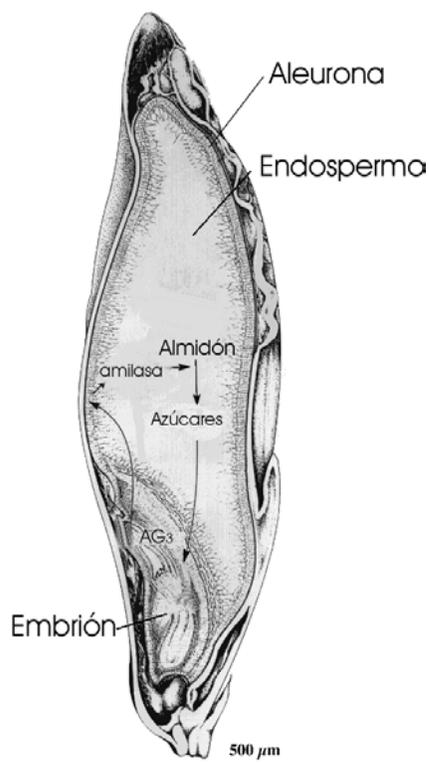


Figura 3. Esquema de la estructura y movilización de reservas en una semilla de cebada

Existe evidencia que indica que en las células de la capa de aleurona, la membrana plasmática participa en la percepción del AG₃ y las endomembranas en la biosíntesis y secreción de las enzimas inducidas por este fitorregulador (Jones y Jacobsen, 1990; Hooley, et. al. 1991).

La membrana plasmática no funge sólo como delimitadora de los diferentes dominios intra y extracelulares, sino que también regula la entrada y salida de distintos solutos a través de diferentes mecanismos de transporte intrínsecos. La membrana puede tener alteraciones debido a la pérdida del vigor, dicha pérdida es ocasionada por las condiciones de producción y de manejo poscosecha (Kigel y Galili, 1995).

Estas alteraciones en la integridad de la membrana pueden visualizarse a nivel ultraestructural, también pueden llegar a manifestarse como un daño en las propiedades normales de permeabilidad de la célula. La incapacidad del plasmalema de contener solutos

durante el deterioro de la semilla tiene al menos dos consecuencias: la incapacidad de la célula de responder osmóticamente y la salida sustancial de los metabolitos de la semilla que favorece el crecimiento de organismos patógenos. La alteración estructural de la membrana parece incidir en una menor eficiencia de respuesta al AG_3 (Bernal-Lugo, et al. 1999).

La viabilidad de la semilla se mantiene por un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento. Previo a la pérdida de la viabilidad, el efecto del envejecimiento se puede observar en la pérdida gradual del vigor de la semilla.

Durante el almacenamiento prolongado existe una reducción progresiva en la capacidad de germinación y en el crecimiento de la plántula. El endospermo de semillas envejecidas produce menos α -amilasa que las semillas frescas (Bernal-Lugo, et. al. 1994; Livesley y Bray 1991). Esto puede ser una expresión del proceso de envejecimiento relacionada con la movilización de reservas en el endospermo (Priestley, 1986).

3.1 Transducción de señales

La capa de aleurona ha sido utilizada como modelo de estudio de la transducción de señales en plantas. Existe evidencia que sugiere el Ca^{2+} , la calmodulina, las proteínas G heterotriméricas, las cinasas, las fosfatasa y segundos mensajeros como el GMP cíclico y el IP_3 están involucrados en etapas tempranas de la transducción de señales de AG_3 (Kashem, et. al. 2000, Kuo, 1996).

Se ha propuesto que la subunidad α de una proteína G podría ser el primer componente de una vía de transducción en la aleurona (Jones, et. al. 1998). Se sabe que esta subunidad α activa a la fosfolipasa C (PLC) que se encuentra en la membrana plasmática. La presencia de la PLC en la membrana y el incremento de IP_3 sugieren que existe un sistema de señalización por fosfoinosítidos en la aleurona. El IP_3 difunde rápidamente a otras partes de la célula (Chen, et. al., 1997) y promueve la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Fig. 4). Esto puede estar involucrado en la expresión de genes que se inducen por AG_3 .



Figura 4. El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato es hidrolizado por una fosfolipasa C de membrana en respuesta a una señal hormonal (AG_3). Los dos productos de la hidrólisis actúan como segundos mensajeros.

El Ca^{2+} es esencial en la expresión de la actividad enzimática de α -amilasa en cereales ya que ésta es una metaloenzima que requiere Ca^{2+} para su estabilidad, así como también para su expresión y secreción (Kashem, et. al., 2000).

Existen estudios que demuestran que vesículas de retículo endoplásmico de aleurona tratadas con AG_3 presentan alto nivel de transporte de Ca^{2+} . Se ha demostrado que un incremento en el flujo de Ca^{2+} en retículo endoplásmico es esencial para la acción de AG_3 en la estimulación de la producción de hidrolasas (Chen, et. al., 1997).

Se han identificado proteínas que unen Ca^{2+} como la calmodulina (CaM) que son necesarias para mantener nivel altos de Ca^{2+} dentro del retículo endoplásmico. El AG_3 induce el aumento en la síntesis de las proteínas que unen calcio (Bush, et. al., 1993). Los sistemas dependientes de Ca^{2+} y la CaM han probado ser elementos centrales en eventos que mantienen la actividad secretoria en respuesta al AG_3 (Ritchie y Gilroy, 1998).

En la figura 5 se muestran algunos de los elementos que participan en la vía de transducción de la señal del AG_3 en la aleurona.

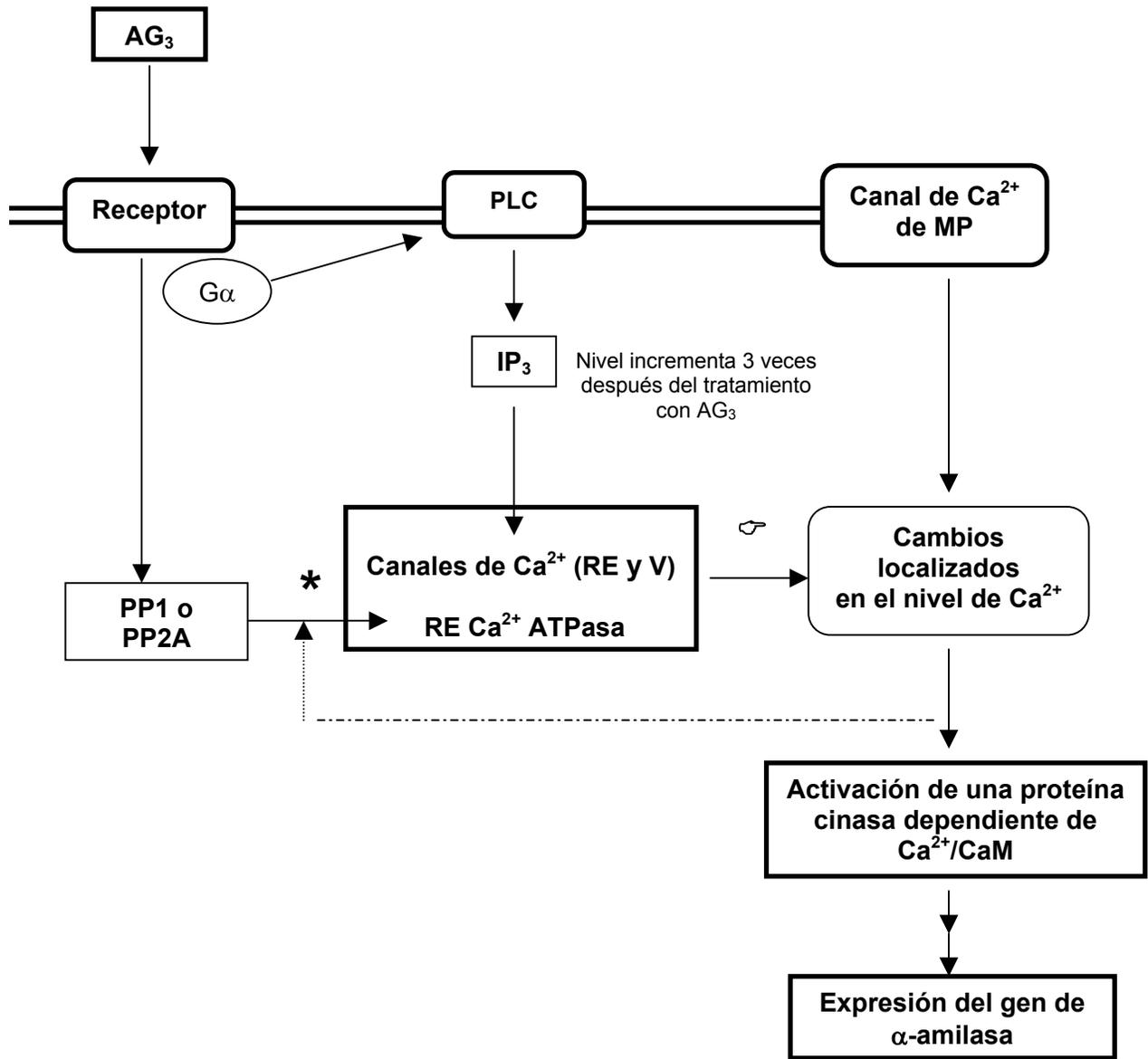


Figura 5. Modelo de la vía de señalización dependiente de AG_3 en células de aleurona. $G\alpha$, subunidad α de una proteína G; PLC, fosfolipasa C; IP_3 , inositol-1,4,5-trifosfato; MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplásmico; V, vacuola; PP1, fosfoproteínfosfatasa 1; PP2A, fosfoproteínfosfatasa 2A; OKA, ácido ocadaico.

* OKA inhibe la expresión de los genes *OsCa-atpasa* y *Osamy-c*
 ☞ El rojo de Rutenio inhibe la expresión del gen *Osamy-c*
 (Chen, et. al., 1997).

3.2 Proteómica

Para caracterizar la expresión de genes en los organismos, normalmente se estudia el ARNm o las proteínas. Debido a su naturaleza intrínseca, los transcritos de ARNm no son buenos indicadores de la expresión de las proteínas y su cantidad frecuentemente no se relaciona con la cantidad de proteínas presentes en el sistema estudiado. Debido a esto, para caracterizar la expresión de genes de una manera acertada también necesitamos estudiar las proteínas expresadas (Skylas, et. al., 2005).

La proteómica es el estudio de todos los polipéptidos expresados por los genes de un organismo, incluyendo las modificaciones post-traduccionales (Honoré, et. al., 2004), en un tejido específico, en una etapa particular del desarrollo y bajo condiciones específicas de crecimiento.

Aunque la proteómica es una herramienta relativamente nueva se basa en técnicas analíticas establecidas previamente (Skylas, et. al., 2005). Dos técnicas son fundamentales para el análisis proteómico: la electroforesis en gel de poliacrilamida en 2-D (2-D PAGE) que puede separar miles de proteínas en sistemas complejos de proteínas y la espectrometría de masas (MS) para la identificación de proteínas y sus respectivas modificaciones post-traduccionales (Honoré, et. al., 2004).

La proteómica ayuda a identificar partes del genoma que determinan la composición de proteínas, las actividades enzimáticas y la expresión de genes relacionados con el crecimiento. Esta nueva tecnología va mas allá de sólo separar algunos polipéptidos de un tejido, pues es capaz de cuantificar, caracterizar e identificar algunas de estas proteínas. Una de las aplicaciones de la proteómica incluye el descubrimiento de proteínas específicas relevantes en una cierta etapa del desarrollo de la semilla o que dependen de las condiciones ambientales (Fig. 6; Skylas, et. al., 2005).

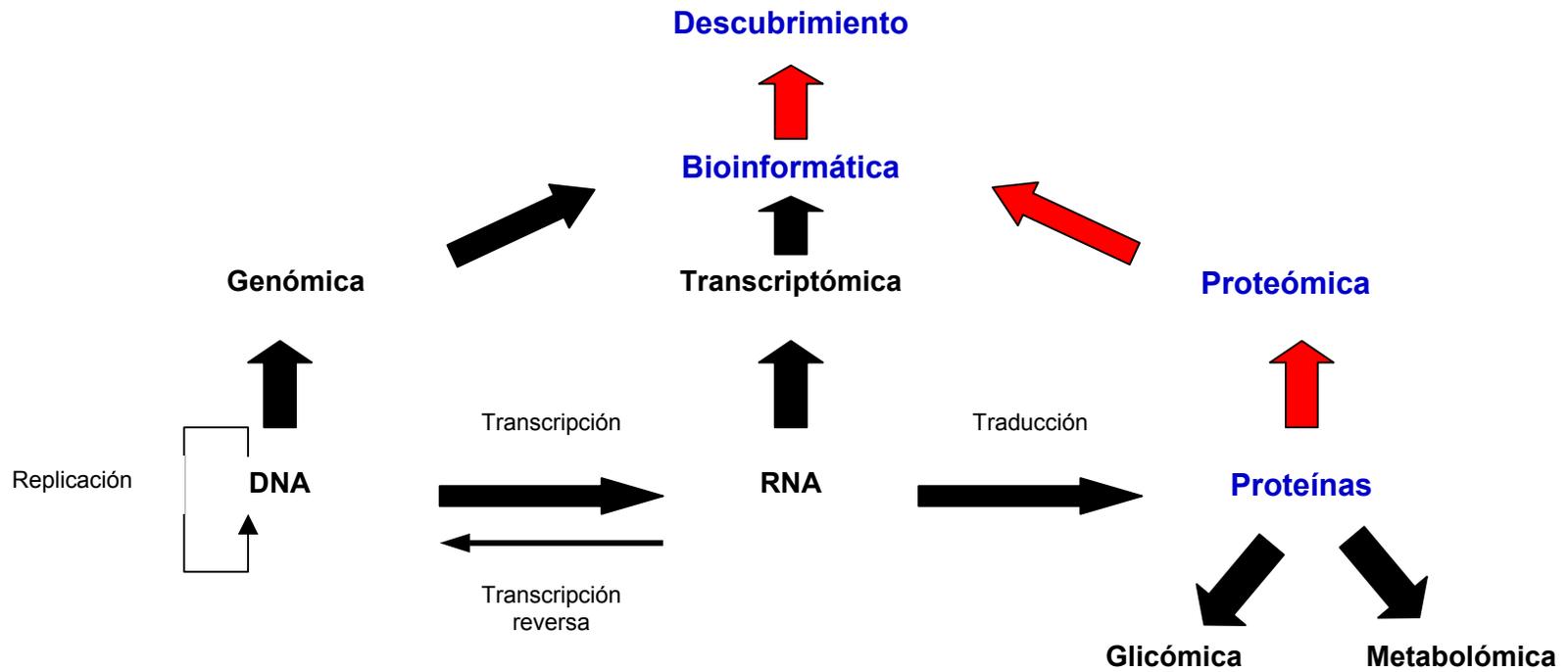


Figura 6. Tecnologías emergentes en continuo desarrollo, utilizadas para elucidar las interacciones entre las biomoléculas en todas las etapas del flujo de información genética en sistemas biológicos y en relación a condiciones de crecimiento específicas. (Skylas, et. al., 2005)

2. INTRODUCCIÓN

La movilización de reservas en semillas es el proceso fisiológico que proporciona los sustratos para que la plántula se desarrolle y adquiera la capacidad para establecerse como organismo autótrofo. La eficiencia de este proceso, incide importantemente en el vigor de la semilla (Bernal-Lugo, et. al. 1999) y por tanto en el éxito del establecimiento del cultivo. El vigor se define como la capacidad, que en campo, presenta la semilla para germinar y establecerse como organismo autótrofo y puede medirse determinando la actividad de α -amilasa (Ellis, 1992). Esta característica varía de lote a lote, dependiendo de las condiciones de producción y manejo poscosecha.

En cereales, la movilización eficiente de reservas depende del adecuado funcionamiento de la aleurona, a diferencia de la mayoría de los otros cereales, la cebada posee una capa de aleurona conformada por múltiples estratos, su composición y estructura es totalmente distinta a la del resto del endospermo, sus células no contienen gránulos de almidón, en cambio tienen alto contenido de proteína y lípidos (Serna, 1996). La aleurona es un tejido vivo que rodea al endospermo almidonoso y durante la germinación, su función es la de sintetizar y secretar las enzimas hidrolíticas (α -amilasa, proteasas, ribonucleasas, α -galactosidasa; Jones y Jacobsen, 1990) necesarias para la degradación del endospermo almidonoso (Lovegrove y Hooley, 2000). Esto con el objetivo de proveer energía y nutrimentos necesarios para el desarrollo del embrión (Jacobsen y Chandler, 1988).

Esta movilización de las reservas está estimulada por el ácido giberélico (AG_3) e inhibida por el ácido abscísico (ABA; Jacobsen y Chandler, 1988). Durante la germinación, el embrión sintetiza AG_3 , el cual difunde hacia el endospermo almidonoso hasta llegar a la capa de aleurona, donde desata una serie de respuestas fisiológicas que permiten la hidrólisis de las proteínas de reserva de estas células. Posteriormente, se inicia la síntesis *de novo* de enzimas hidrolíticas que son secretadas al endospermo almidonoso; sitio en que realizan la hidrólisis de

las reservas. Los productos de hidrólisis eventualmente viajan hacia el embrión donde son utilizados para su desarrollo (Jacobsen y Chandler, 1988).

3. ANTECEDENTES

La germinación es un proceso fisiológico que resulta en cambios significativos de la composición química y estructural de los granos. Estos cambios le permiten producir energía necesaria requerida para el crecimiento y desarrollo del embrión en una nueva planta. La germinación empieza cuando la semilla se expone a factores favorables como son la presencia de agua, la disponibilidad de oxígeno y la temperatura, que propician la síntesis de hormonas vegetales (giberelinas) seguida por la generación de enzimas que degradan los tejidos de reserva, el endospermo y el escutelo.

Las giberelinas son sustancias orgánicas que son capaces de generar y regular una o varias respuestas fisiológicas a través de transmitir señales específicas a lo largo de la planta. Se sintetizan en casi todas las estructuras de la planta en diferentes proporciones, dependiendo de los requerimientos del tejido donde se producen y de la planta en general. Producen cambios profundos y diversos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, un ejemplo lo constituye el ácido giberélico (AG_3 ; Fig. 1).

Muchos estudios han utilizado como sistema modelo la capa de aleurona de cereales. El conocimiento de los eventos regulados por el AG_3 en las células de aleurona ha avanzado a través de diferentes enfoques como lo son, la genética molecular, la biología celular, la electrofisiología y la bioquímica (Gilroy y Jones, 1994).

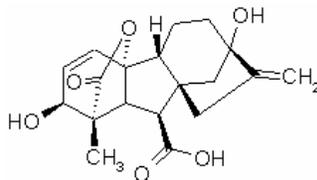


Figura 1. Estructura del ácido giberélico (AG_3)

En este trabajo se utilizó como modelo a la cebada. El grano maduro de cebada es de forma ahusada, más grueso en el centro y disminuyendo hacia los extremos. Esta rodeado por el pericarpio, una estructura que sirve de protección; por el embrión y el endospermo, donde se almacenan carbohidratos (principalmente almidón) y proteínas que proveen la energía y nutrimentos necesarios para el desarrollo del embrión. El endospermo comprende al endospermo almidonoso, tejido de reserva no vivo, rodeado por un tejido vivo llamado capa de aleurona.

La capa de aleurona consiste de una a tres capas de células que rodean al endospermo almidonoso y cuya pared celular es muy rígida (Fig. 2). La especial rigidez de la pared celular se debe probablemente a que éste es un tejido en el cual sus células no se reproducen, por lo que deben estar bien protegidas de posibles daños a su estructura.

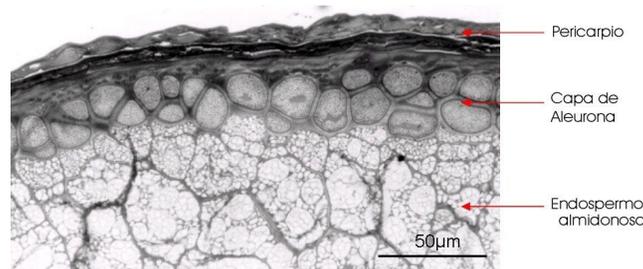


Figura 2. Micrografía que muestra la estructura del endospermo de cebada.

Durante el desarrollo de la semilla, ésta acumula reservas, que se almacenan en forma de proteínas, polisacáridos, lípidos y minerales en el endospermo y en la aleurona. Durante la germinación, estas reservas son degradadas y movilizadas hacia el embrión, donde son utilizadas como sustratos para su crecimiento (Lovegrove y Hooley, 2000). Esta movilización de las reservas está regulada por el AG_3 (Jacobsen y Chandler, 1988). La hidrólisis del almidón del endospermo de la semilla sucede a través de la acción de varias enzimas, la α -amilasa, β -amilasa, glucosidasa, etc. (Fig. 3; Skadsen, 1998). Todas estas enzimas son sintetizadas por la capa de aleurona durante la germinación y su producción también es regulada por el AG_3 (Jacobsen y Chandler, 1988).

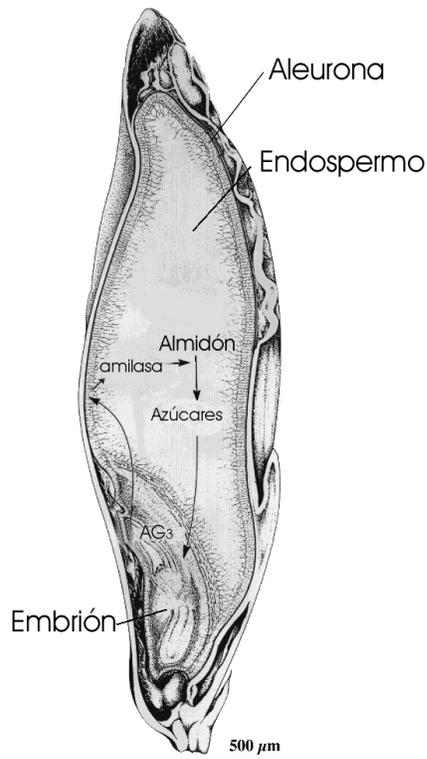


Figura 3. Esquema de la estructura y movilización de reservas en una semilla de cebada

Existe evidencia que indica que en las células de la capa de aleurona, la membrana plasmática participa en la percepción del AG_3 y las endomembranas en la biosíntesis y secreción de las enzimas inducidas por este fitorregulador (Jones y Jacobsen, 1990; Hooley, et. al. 1991).

La membrana plasmática no funge sólo como delimitadora de los diferentes dominios intra y extracelulares, sino que también regula la entrada y salida de distintos solutos a través de diferentes mecanismos de transporte intrínsecos. La membrana puede tener alteraciones debido a la pérdida del vigor, dicha pérdida es ocasionada por las condiciones de producción y de manejo poscosecha (Kigel y Galili, 1995).

Estas alteraciones en la integridad de la membrana pueden visualizarse a nivel ultraestructural, también pueden llegar a manifestarse como un daño en las propiedades normales de permeabilidad de la célula. La incapacidad del plasmalema de contener solutos

durante el deterioro de la semilla tiene al menos dos consecuencias: la incapacidad de la célula de responder osmóticamente y la salida sustancial de los metabolitos de la semilla que favorece el crecimiento de organismos patógenos. La alteración estructural de la membrana parece incidir en una menor eficiencia de respuesta al AG_3 (Bernal-Lugo, et al. 1999).

La viabilidad de la semilla se mantiene por un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento. Previo a la pérdida de la viabilidad, el efecto del envejecimiento se puede observar en la pérdida gradual del vigor de la semilla.

Durante el almacenamiento prolongado existe una reducción progresiva en la capacidad de germinación y en el crecimiento de la plántula. El endospermo de semillas envejecidas produce menos α -amilasa que las semillas frescas (Bernal-Lugo, et. al. 1994; Livesley y Bray 1991). Esto puede ser una expresión del proceso de envejecimiento relacionada con la movilización de reservas en el endospermo (Priestley, 1986).

3.1 Transducción de señales

La capa de aleurona ha sido utilizada como modelo de estudio de la transducción de señales en plantas. Existe evidencia que sugiere el Ca^{2+} , la calmodulina, las proteínas G heterotriméricas, las cinasas, las fosfatasa y segundos mensajeros como el GMP cíclico y el IP_3 están involucrados en etapas tempranas de la transducción de señales de AG_3 (Kashem, et. al. 2000, Kuo, 1996).

Se ha propuesto que la subunidad α de una proteína G podría ser el primer componente de una vía de transducción en la aleurona (Jones, et. al. 1998). Se sabe que esta subunidad α activa a la fosfolipasa C (PLC) que se encuentra en la membrana plasmática. La presencia de la PLC en la membrana y el incremento de IP_3 sugieren que existe un sistema de señalización por fosfoinosítidos en la aleurona. El IP_3 difunde rápidamente a otras partes de la célula (Chen, et. al., 1997) y promueve la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Fig. 4). Esto puede estar involucrado en la expresión de genes que se inducen por AG_3 .

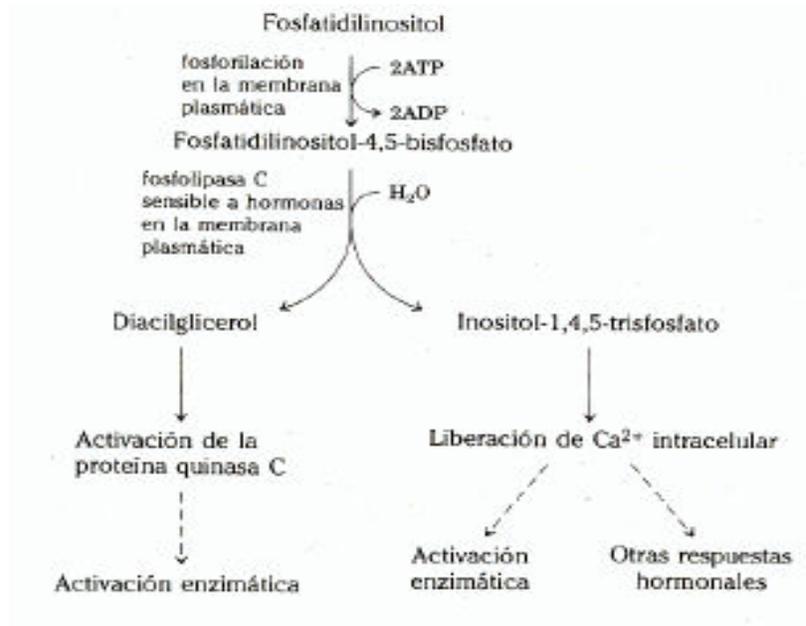


Figura 4. El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato es hidrolizado por una fosfolipasa C de membrana en respuesta a una señal hormonal (AG_3). Los dos productos de la hidrólisis actúan como segundos mensajeros.

El Ca^{2+} es esencial en la expresión de la actividad enzimática de α -amilasa en cereales ya que ésta es una metaloenzima que requiere Ca^{2+} para su estabilidad, así como también para su expresión y secreción (Kashem, et. al., 2000).

Existen estudios que demuestran que vesículas de retículo endoplásmico de aleurona tratadas con AG_3 presentan alto nivel de transporte de Ca^{2+} . Se ha demostrado que un incremento en el flujo de Ca^{2+} en retículo endoplásmico es esencial para la acción de AG_3 en la estimulación de la producción de hidrolasas (Chen, et. al., 1997).

Se han identificado proteínas que unen Ca^{2+} como la calmodulina (CaM) que son necesarias para mantener nivel altos de Ca^{2+} dentro del retículo endoplásmico. El AG_3 induce el aumento en la síntesis de las proteínas que unen calcio (Bush, et. al., 1993). Los sistemas dependientes de Ca^{2+} y la CaM han probado ser elementos centrales en eventos que mantienen la actividad secretoria en respuesta al AG_3 (Ritchie y Gilroy, 1998).

En la figura 5 se muestran algunos de los elementos que participan en la vía de transducción de la señal del AG_3 en la aleurona.

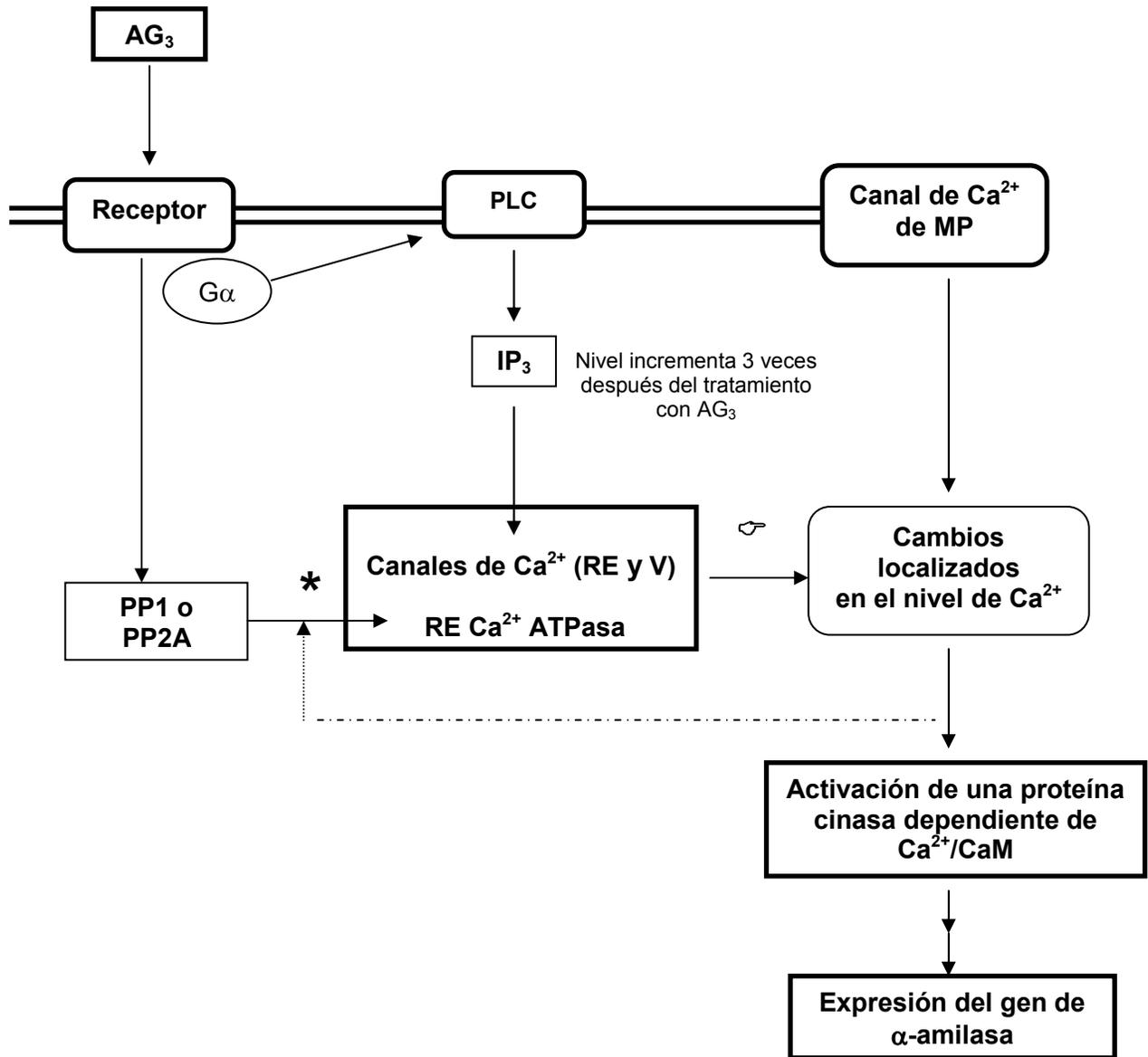


Figura 5. Modelo de la vía de señalización dependiente de AG_3 en células de aleurona. $G\alpha$, subunidad α de una proteína G; PLC, fosfolipasa C; IP_3 , inositol-1,4,5-trifosfato; MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplásmico; V, vacuola; PP1, fosfoproteínofosfatasa 1; PP2A, fosfoproteínofosfatasa 2A; OKA, ácido ocadaico.

* OKA inhibe la expresión de los genes *OsCa-atpasa* y *Osamy-c*
 ☞ El rojo de Rutenio inhibe la expresión del gen *Osamy-c*
 (Chen, et. al., 1997).

3.2 Proteómica

Para caracterizar la expresión de genes en los organismos, normalmente se estudia el ARNm o las proteínas. Debido a su naturaleza intrínseca, los transcritos de ARNm no son buenos indicadores de la expresión de las proteínas y su cantidad frecuentemente no se relaciona con la cantidad de proteínas presentes en el sistema estudiado. Debido a esto, para caracterizar la expresión de genes de una manera acertada también necesitamos estudiar las proteínas expresadas (Skylas, et. al., 2005).

La proteómica es el estudio de todos los polipéptidos expresados por los genes de un organismo, incluyendo las modificaciones post-traduccionales (Honoré, et. al., 2004), en un tejido específico, en una etapa particular del desarrollo y bajo condiciones específicas de crecimiento.

Aunque la proteómica es una herramienta relativamente nueva se basa en técnicas analíticas establecidas previamente (Skylas, et. al., 2005). Dos técnicas son fundamentales para el análisis proteómico: la electroforesis en gel de poliacrilamida en 2-D (2-D PAGE) que puede separar miles de proteínas en sistemas complejos de proteínas y la espectrometría de masas (MS) para la identificación de proteínas y sus respectivas modificaciones post-traduccionales (Honoré, et. al., 2004).

La proteómica ayuda a identificar partes del genoma que determinan la composición de proteínas, las actividades enzimáticas y la expresión de genes relacionados con el crecimiento. Esta nueva tecnología va mas allá de sólo separar algunos polipéptidos de un tejido, pues es capaz de cuantificar, caracterizar e identificar algunas de estas proteínas. Una de las aplicaciones de la proteómica incluye el descubrimiento de proteínas específicas relevantes en una cierta etapa del desarrollo de la semilla o que dependen de las condiciones ambientales (Fig. 6; Skylas, et. al., 2005).

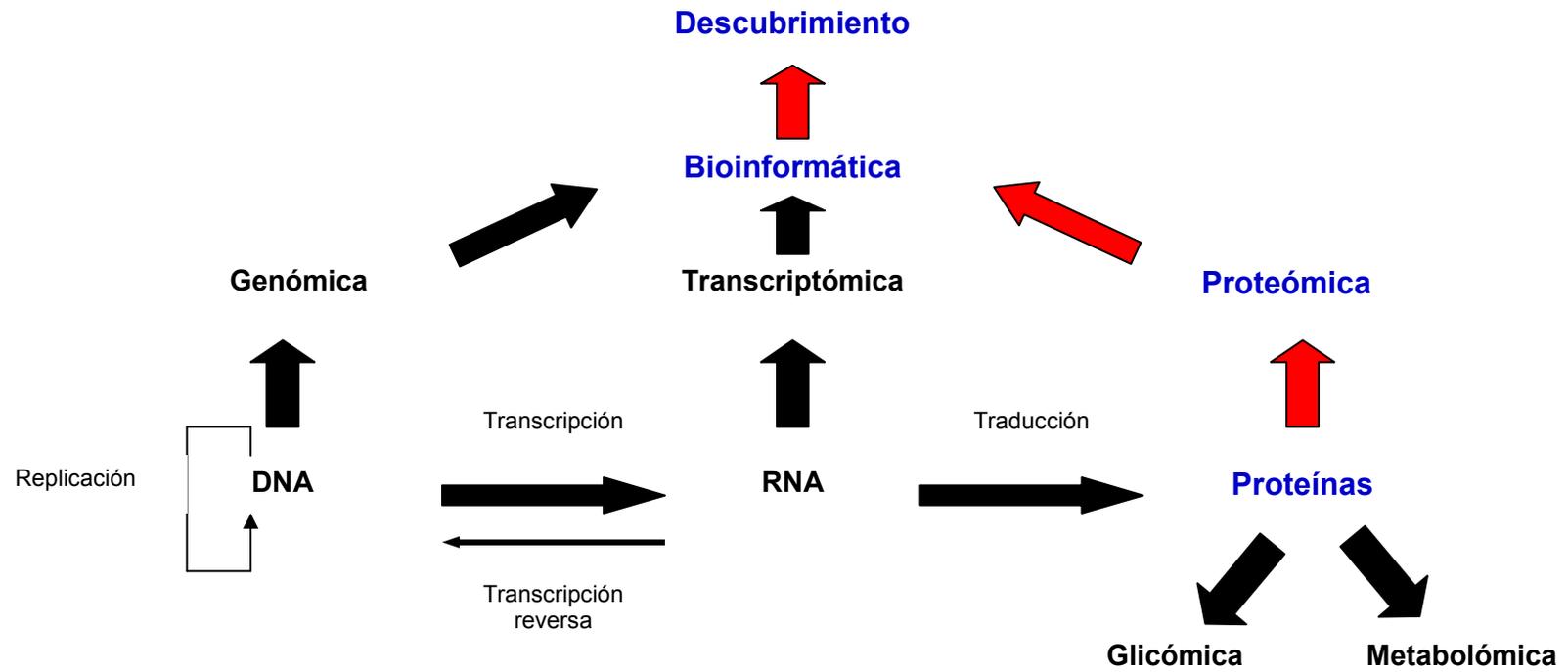


Figura 6. Tecnologías emergentes en continuo desarrollo, utilizadas para elucidar las interacciones entre las biomoléculas en todas las etapas del flujo de información genética en sistemas biológicos y en relación a condiciones de crecimiento específicas. (Skylas, et. al., 2005)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ✓ Identificar algunas proteínas membranales de aleurona de cebada involucradas en el proceso eficiente de movilización de reservas.

4.2 Objetivo Particular

- Aislar, separar y detectar las proteínas membranales inducidas por AG₃ en aleuronas aisladas de semillas de cebada con diferente vigor.
- Identificar dichas proteínas y relacionar su función con el sistema de movilización de reservas.

5. HIPÓTESIS

- Si las proteínas membranales participan en la respuesta de la aleurona de cebada al AG₃, entonces un análisis proteómico de microsomas permitirá identificar algunas de estas proteínas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

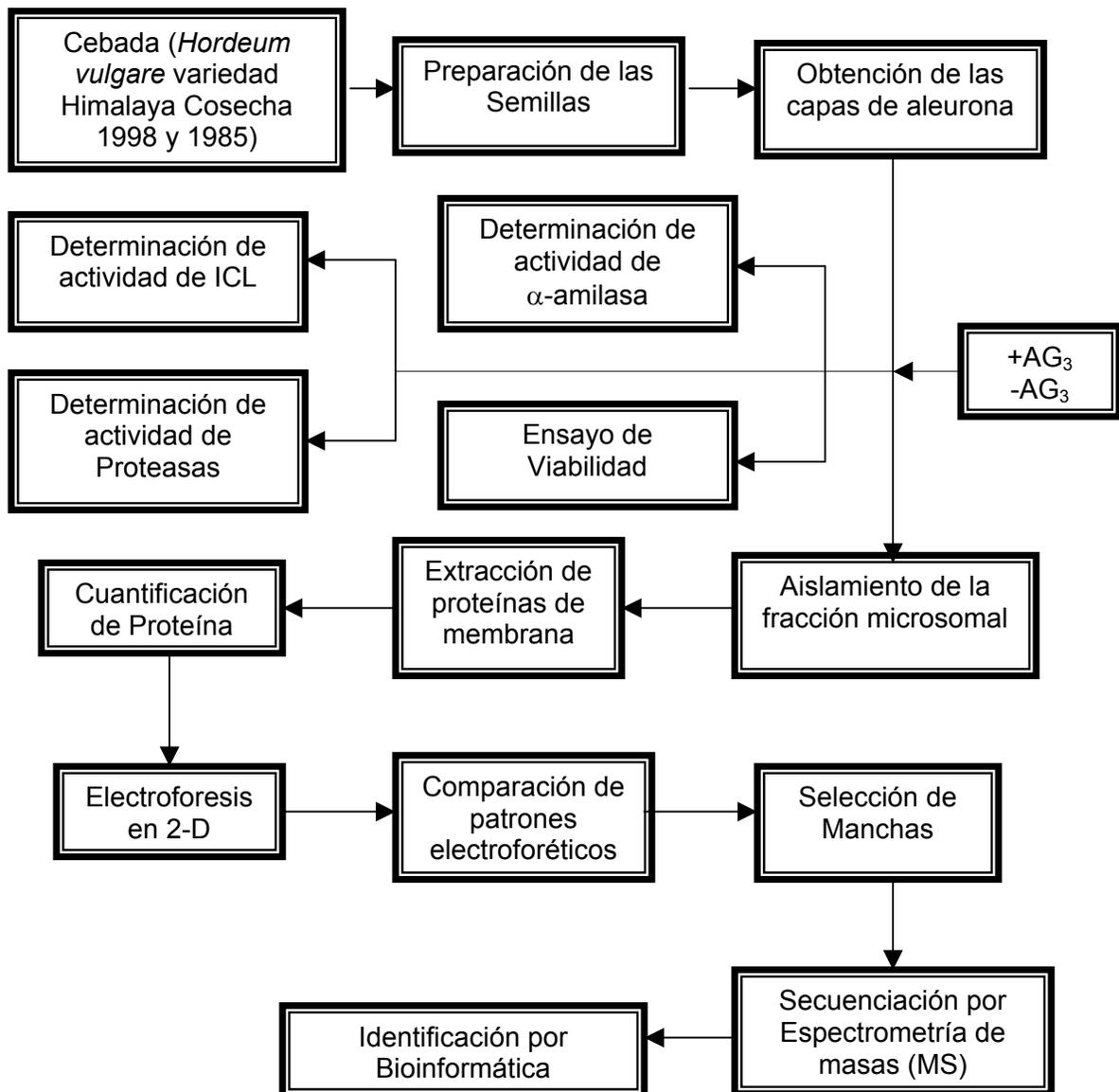


Figura 7. Diagrama General de la Investigación

Material biológico

Se utilizó semilla de cebada *Hordeum vulgare*, variedad Himalaya cosecha 1998 y cosecha 1985, obtenidas del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA. Ambos lotes fueron almacenados a 4°C y 40 % de humedad relativa.

Preparación de las semillas

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

Obtención de las capas de aleurona

Previamente a la obtención de las capas de aleurona, las medias semillas desinfectadas se pusieron a embeber durante 96h a 25°C sobre dos círculos de papel filtro con aproximadamente 10 mL de agua destilada estéril con 20 µg/mL de cloranfenicol y 20 µg/mL de estreptomicina en cajas Petri estériles. Al término de este tiempo, se eliminó el endospermo almidonoso con la ayuda de dos espátulas, todo en condiciones estériles.

Aislamiento de la fracción microsomal y extracción de la proteína de membrana

Cuatrocientas capas de aleurona aisladas se incubaron por 3 h a 28°C en buffer de incubación (10 aleuronas / mL, ácido succínico 20 mM, pH 5.0, CaCl₂ 20 mM) con o sin 1 µM AG₃ (AG₃ preparado en NaHCO₃ 0.01M). Después de este tiempo, el buffer de incubación se eliminó y las capas de aleurona se secaron con papel absorbente. Las capas de aleurona se homogenizaron en un mortero con 25 mL de buffer de homogenización frío (Sacarosa 330 mM, EGTA 2 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 5.0, con inhibidores de proteasas Boheringer) en presencia de 14.2 mM β-mercaptoetanol (β-ME). El homogenizado se filtró a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a

10,000 rpm a 4°C por 10 min (Centrifuga Sorvall Super T21). Se colectó el sobrenadante en tubos de ultracentrífuga (Centrifuge Bottles Polycarbonate with Cap Assemblies Beckman, Cat. BC355618) fríos y se centrifugó a 55,000 rpm a 4°C por 1 h (Ultracentrífuga Beckman XL-100K). El sobrenadante se descartó y las pastillas se resuspendieron en 200 µL de buffer de resuspensión (Tris-HCl 5 mM pH 7.0, EGTA 1 mM, CHAPS 2% y urea 4 M). Las muestras se agitaron en un vórtex y se centrifugaron en una microfuga a 14000 rpm/ 4°C/ 10min. Los sobrenadantes se colectaron y las pastillas se re-extrajeron con otros 200 µL de buffer de resuspensión. Se repitió la centrifugación y los sobrenadantes de cada muestra se juntaron (Maya, 1997).

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína de las muestras se determinó usando el Kit 2-D Quant (Amersham Biosciences).

Electroforesis 2-D

Se precipitaron 500µg de proteína, con TCA 10% en acetona a –20°C. Se centrifugó la proteína precipitada a 14000 rpm/ 15min/ 4°C, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de acetona. Se disgregó en vórtex y centrifugó a 14000 rpm/ 10min/ 4°C, se eliminó el sobrenadante y se repitió el procedimiento dos veces más. Se evaporó la acetona a temperatura ambiente. Las muestras se solubilizaron en una solución rehidratante (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Buffer IPG 2% pH 4-7 (Amersham Biosciences), Azul de Bromofenol 0.002%, DTT 2.8 mg/mL) con intensa agitación en vórtex por aproximadamente 1 h. Cuando estuvieron completamente solubilizadas las muestras se absorbieron por la noche en tiras de 13 cm de IPG pH 4-7 (Amersham Biosciences) a 20°C. El Isoelectroenfoco se realizó en un Sistema Multiphor II con Immobiline DryStrip Kit (Amersham Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones de enfoque fueron las siguientes: 500 V por 1 h

(step mode), 3500 V por 1.5 h (gradient mode) y 18100 V/h (5000 V/h cuando se usaron tiras de 7 cm), las tiras fueron guardadas en plástico adherente -80°C . Para el gel de segunda dimensión, las tiras de gel se sacaron de -80°C y se dejaron descongelar. Una vez descongeladas se incubaron en tubos de ensayo de 25 mL con buffer de equilibrio A (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, DTT 10 mg/mL y un poco de azul de bromofenol) y buffer de equilibrio B (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, glicerol 3 0%, SDS 2%, iodoacetamida 25 mg/mL y un poco de azul de bromofenol) por 15 min cada uno y subsecuentemente colocadas horizontalmente en un gel de Tris-glicina SDS poliacrilamida (15%, Tabla 1). El SDS-PAGE se realizó en una cámara Vertical 25 X 25 cm (Slab Gel Electrophoresis Unit SE600 Hoeffer) aplicando 30 mA por 15 min y 60 mA por 4.75 h. El gel 2-D se tiñó con Azul de Coomassie coloidal (Bradford, 1976).

Tabla 1. Preparación del gel de acrilamida (15%)

	Gel 15%
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	20.0 mL
Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0.8%	40.0 mL
SDS 10%	0.8 mL
H ₂ O	18.78 mL
Persulfato de amonio 10%	400 μL
TEMED	26.4 μL

Tabla 2. Preparación de Azul de Coomassie coloidal

	Concentración Final
(NH ₄) ₂ SO ₄	17%
H ₃ PO ₄	3%
Azul de Coomassie G-250	0.1%
Metanol	34%

Comparación de Patrones electroforéticos de doble dimensión

Las imágenes de los patrones de los geles 2-D se obtuvieron y compararon a través de un Fluor-S Multiimager (Quantity One, PD-QUEST Software) para identificar las manchas que presentaran diferencias cuantitativas o cualitativas entre los geles de los distintos tratamientos.

Secuenciación por Espectrometría de masas (MS)

Para secuenciar las manchas seleccionadas se recurrió a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Missouri y a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Identificación por Bioinformática

Para identificar las proteínas correspondientes se utilizaron los programas BLASTp del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y BLASTp del ExPASy/SWISS PROT (<http://au.expasy.org/sprot/>), dos de las bases de datos públicas.

Determinación de actividad de α -amilasa

La α -amilasa fue determinada usando el procedimiento del almidón-KI / I₂ (Chrispeels y Varner, 1967). Se obtuvieron 60 capas de aleurona de la misma forma que se menciona en los puntos anteriores, se colocaron las 60 aleuronas en matraces de 25 mL estériles (10 aleuronas/matraz) y se incubaron en 2 mL de buffer de incubación (ácido succínico 20 mM pH 5.0, CaCl₂ 20 mM) con o sin 1 μ M AG₃ durante 3 h a 28°C. Se homogenizaron con ayuda de un mortero y arena, en el mismo buffer y volumen en el que fueron incubadas las aleuronas; el homogenizado se colocó en tubos de 1.5 mL. Se centrifugaron en microfuga a 14000 rpm durante 10 min a 25°C, se colectó el sobrenadante y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se prepararon 100 mL de una solución de KI / I₂ con HCl y 50 mL de una solución de almidón (0.125g) con 0.25 mL de acetato de calcio 1.3 M, pH 6.0 y 0.25 mL de NaCl 0.1 M. Se colocaron 2 mL de H₂O y 1 mL de solución de yodo en tubos de ensayo y se hizo una curva patrón de 130 μ L a 180 μ L de almidón, se leyó a 620 nm y se determinó la absorbencia. El volumen de almidón cuya absorbencia fuera cercana a 1.0, se colocó en tubos de ensayo a 30°C. Se agregó un volumen de 20-50 μ L del extracto enzimático durante 0.5- 2 min (el volumen de extracto y el tiempo de incubación de la reacción debe ser tal que la absorbencia de la muestra sea entre 0.5-0.8 D.O a 620 nm). La reacción se detuvo con 1 mL de solución de yodo, se agregaron 2 mL de H₂O y

se midió la absorbencia a 620 nm. Una unidad (U) de actividad de α -amilasa se definió como la cantidad de enzima que produjo un cambio de 1.0 unidad de absorbencia por minuto a 620 nm.

Ensayo de Viabilidad

Se obtuvieron 300 capas de aleurona de la misma forma que se menciona en los puntos anteriores y se incubaron en buffer de incubación (10 aleuronas / mL, ácido succínico 20 mM pH 5.0, CaCl_2 20 mM) con o sin 1 μM AG_3 durante 0, 5, 14, 18 y 24 h a 28°C; 10 aleuronas por cada matraz, 3 matraces por cada tiempo. Después de los respectivos tiempos, el buffer de incubación se eliminó y las capas de aleurona se secaron con papel absorbente. Las capas de aleurona se colocaron en frascos viales color ámbar (10 aleuronas por cada frasco). Se agregaron 2 mL de 2,3,5-trifeniltetrazolio 1% (TTC) en buffer de fosfatos 20 mM pH 5.8 y se incubaron durante 1 h a 25°C. Transcurrido el tiempo, las aleuronas se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y el pigmento se extrajo con 1 mL de etanol absoluto a 70°C durante 30 min. El pigmento extraído se centrifugó a 14000 rpm por 10 min en microfuga y se determinó la absorbencia del sobrenadante a 485 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó usando valores de referencia de todas las células vivas y todas las células muertas (Kermode, 2003).

Determinación de proteasas

Se realizó la extracción de la proteína de membrana de la forma que se mencionó anteriormente y se tomaron muestras de 200 μL de las fracciones llamadas homogenado total, de la fracción soluble y de la fracción microsomal de aleuronas incubadas 3 h en buffer de incubación con o sin AG_3 . Se colocaron 20 μL de cada muestra en tubos de 1.5 mL por triplicado, se agregaron 200 μL de Tris/HCl a diferentes pH (5.5, 7.0 y 8.8) a cada tubo y se incubaron durante 5 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo se agregaron 50 μL de azocaseína 1% (se disolvió en su respectivo buffer Tris/HCl pH 5.5, 7.0 y 8.8, se necesitó calentar ligeramente) y se incubaron durante 30 min a 37°C. Una muestra de fracción microsomal se

incubó con 200 μ L de Tris/HCl pH 7.0 y 50 μ L de azocaseína 1% durante 16 h a 25°C. Transcurridos los tiempos, se agregó TCA 5.0% para detener la reacción, posteriormente se agregaron 500 μ L de NaOH 500 mM para neutralizar. Se eliminó la proteína precipitada centrifugando durante 15 min a 14,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se midió a 366 nm. El coeficiente de extinción molar de la azocaseína al 1% en NaOH es 37 g/L (García-Carreño, 1992).

Determinación de carbohidratos

Se extrajo la proteína de membrana de la forma mencionada anteriormente y se prepararon tubos con los reactivos que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 3. Sistema de reacción para la cuantificación de carbohidratos

Tubos	1 (mL)	2 (mL)	3 (mL)	4 (mL)	5 (mL)	6 (mL)	7 (mL)
Solución Patrón Glucosa (200 μ g/mL)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
H ₂ O Destilada	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.9	1.0
Extracto						0.1	

Se agitaron los tubos en un vórtex para mezclar los reactivos. En la campana de extracción se agregaron 0.3 mL de Fenol 5% a todos los tubos y se agitaron en vórtex. Posteriormente se agregó 1.8 mL de H₂SO₄ concentrado todos los tubos, agitando en vórtex cada tubo después de agregar el H₂SO₄ (se agitó con cuidado pues la reacción es exotérmica). Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 485 nm. Los tubos 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a la curva patrón de glucosa, el tubo 7 corresponde al blanco de reactivos (Dubois, et al. 1956).

Tinción de glicoproteínas

La glicoproteínas presentes en los geles de 1D se tiñeron con el kit GelCode Glycoprotein Staining Kit (Pierce).

Determinación de la actividad de Isocitrato Liasa (ICL)

Se obtuvieron 50 capas de aleurona de la forma mencionada anteriormente y se incubaron en buffer de incubación (10 aleuronas / mL, ácido succínico 20 mM pH 5.0, CaCl₂ 20 mM) con o sin 1 μM AG₃ durante 3 h a 28°C. Después de los respectivos tiempos, el buffer de incubación se eliminó y las capas de aleurona se secaron con papel absorbente y se homogenizaron en un mortero con 15 mL de buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.6 con inhibidores de proteasas Boheringer. El homogenizado se filtró por 6 capas de gasa y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min. Posteriormente se agregaron 100 μL del extracto obtenido a la mezcla de reacción (300 μL Buffer de Fosfatos pH 7.6 10 μM, 300 μL Glutación 2.5 μM, 300 μL MgSO₄ 5 μM, 300 μL Isocitrato trisódico 5 μM) y se incubaron durante 20 min a 30°C. Transcurrido el tiempo se agregaron 300 μL de TCA 50% para detener la reacción, se removió la proteína precipitada centrifugando 5 min a 14,000 rpm. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se agregaron 660 μL de 2,4-Dinitrofenilhidracina 0.1% (disuelta en HCl 2 N), se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregaron 3.35 mL de NaOH 2.5 N, se agitó y se midió la absorbencia a 445 nm (Singh, et. al., 1981).

Resonancia Paramagnética Nuclear (RPE)

Los estudios de RPE se mandaron hacer a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

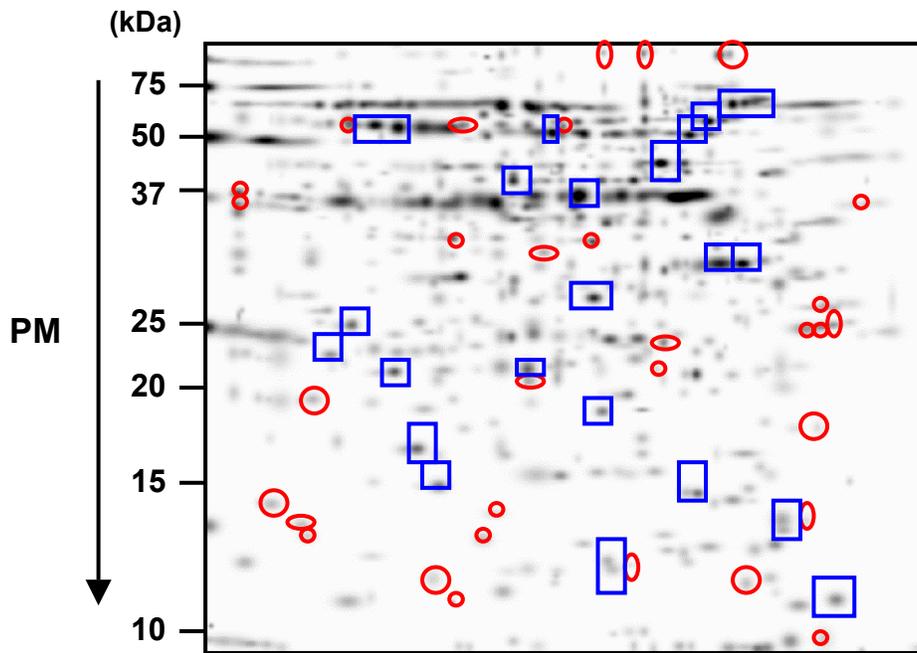
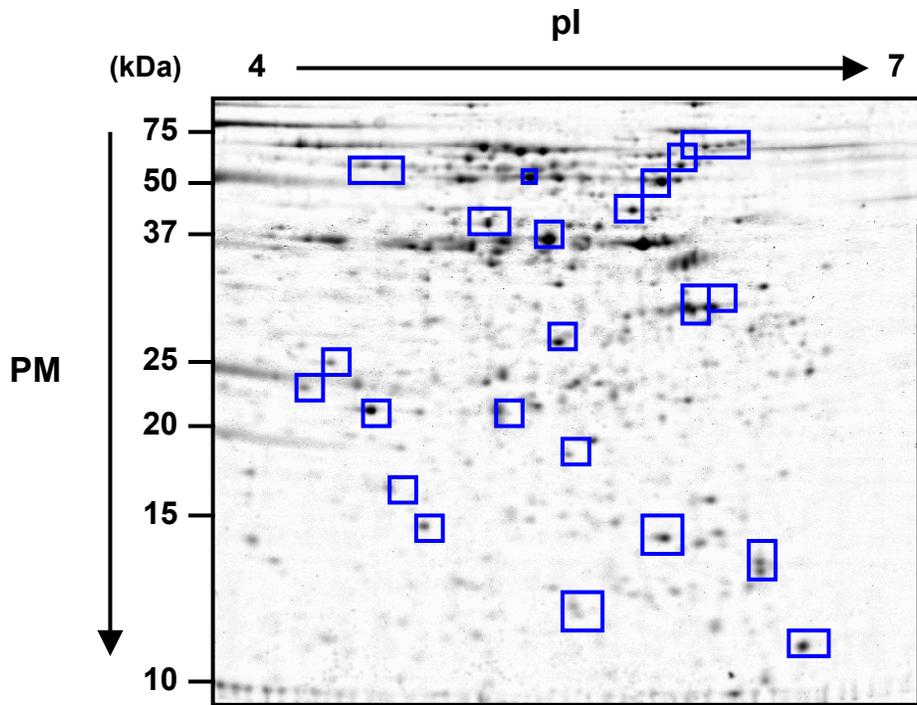
7.1 Comparación de patrones electroforéticos de semillas control (1998) con diferentes tratamientos de AG₃

7.1.1 Análisis cualitativo

En la figura 8 se muestra la imagen digitalizada de los patrones 2-D de proteínas membranales aisladas de capa de aleurona lote 1998. El número de péptidos detectados fue menor en el tejido proveniente de aleuronas tratadas con el fitorregulador (648 manchas) que en su respectivo control (701 manchas; Ver Tabla 4). La comparación de los patrones electroforéticos indicó que 344 proteínas se encontraban en ambos tratamientos, aunque en algunos casos la cantidad varió (ver análisis cuantitativo). A este conjunto se le denominó subproteoma constitutivo (rectángulos en color azul). También se observó que el tratamiento con AG₃ provocó la pérdida de 33 proteínas (7.6 % del total). Se detectaron 271 nuevas proteínas debido al tratamiento con AG₃ (Figura 8, círculos color rojo). De las 271 manchas que se indujeron por AG₃, se seleccionaron 32 de ellas, en función de su intensidad relativa y su presencia en la mayoría de los geles, además tenían que estar perfectamente aisladas; de estas 32 manchas, se seleccionaron 10 con un criterio similar al anterior pero más riguroso. Se mandaron secuenciar por espectrometría de masas (MS) a la Universidad de Missouri. También se seleccionó una mancha y se mandó secuenciar a la Unidad de Proteómica del IBT.

Tabla 4. Número de proteínas totales que aparecen en los patrones electroforéticos para la semilla fresca con diferentes tratamientos

1998	
-AG ₃	+AG ₃
701	648



7.1.2 Análisis cuantitativo del subproteoma constitutivo

Las proteínas que se denominaron constitutivas son aquellas que se encuentran en los patrones electroforéticos independientemente del tratamiento. A estas se les realizó un análisis cuantitativo para determinar cuáles aumentaban, disminuían o no presentaban ningún cambio.

Para hacer el análisis cuantitativo se tomaron las intensidades relativas de las manchas constitutivas, que proporcionaba el programa con el que fueron analizados los geles (PD-QUEST). Se sumaron las intensidades de todas las manchas y se calculó el porcentaje que representaba cada una del total. Esto se realizó de forma independiente para cada tratamiento. Finalmente, se compararon los porcentajes de intensidad entre los distintos tratamientos.

El criterio que se tomó en cuenta para distinguir las proteínas que aumentaron por efecto del AG₃, fue que su intensidad fuera por lo menos del doble. Para decir que las proteínas habían disminuido se consideró que la intensidad relativa fuera por lo menos de la mitad. En la tabla 9 y 10 se presentan los valores de las contribuciones de las manchas y el porcentaje de inhibición y las veces que aumenta la intensidad de las mismas por la presencia de AG₃ (Ver Anexo I).

En la figura 9 podemos apreciar el análisis cuantitativo de las proteínas constitutivas de la semilla fresca, se observa que por efecto del AG₃ 12.8% de las proteínas constitutivas disminuyen, 27.0% aumentan y 60.2% no presentan ningún cambio.

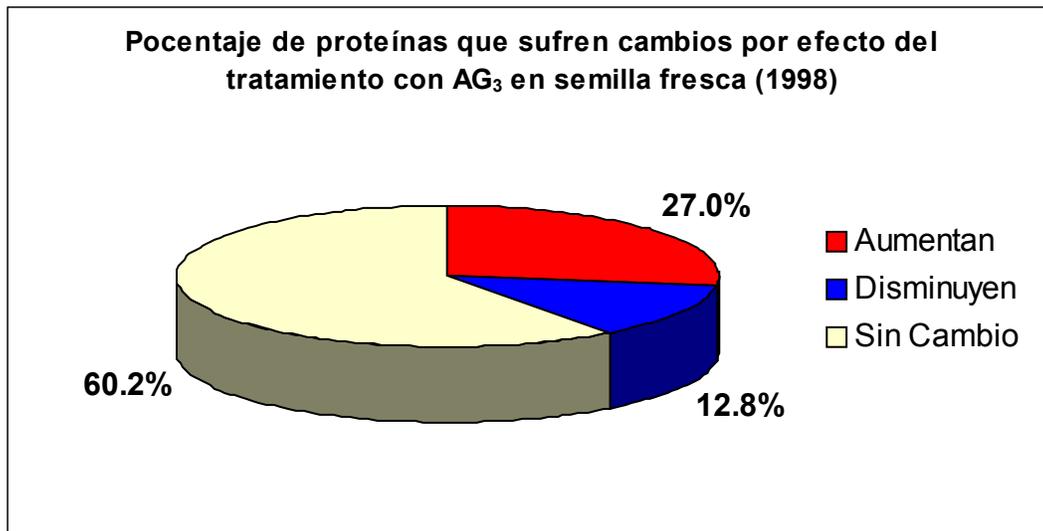


Figura 9. Análisis cuantitativo del grupo de proteínas constitutivas de semilla fresca (1998) que sufrieron cambios debido al tratamiento con AG₃

7.2 Identificación de las proteínas Inducidas por AG₃

Sólo las proteínas inducidas por AG₃ se recortaron y se mandaron secuenciar. Las secuencias de los oligopéptidos, de cada proteína, obtenidas por espectrometría de masas (MS) fueron utilizadas para identificar la proteína correspondiente utilizando las herramientas BLASTp del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y BLASTp del ExPASy/SWISS PROT (<http://au.expasy.org/sprot/>), dos de las bases de datos publicas.

Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 5. Resultados de las secuencias de oligopéptidos y su identificación en bases de datos públicas

Proteína	Teo PM(kD)/pI	Exp PM(kD)/pI	Secuencia	ϵ	No. Acceso
Mn Superóxido Dismutasa (EC 1.15.1.1)	25.3/7.9	11.9/4.3	FNGGGHVNHSIFWK	1×10^{-5}	NCBI 1654387 Swiss Prot Q56DH8
			IDVWEHAYYLQ	0.001	
Isocitrato Liasa (EC 4.1.3.1)	64.3/6.9	11.3/4.4	PFVDYLPPIADG- GTGFGGTTATVK	2×10^{-16}	NCBI 2143227 Swiss Prot P25248
20S Proteasoma (Subunidad beta)	29.0/6.5	11.1/4.9	EEGIQLVAEAIR NDLGSGSNVDVCVITK RNHQLPNPR AADTEAVT	0.008 2×10^{-6} 0.84 111	NCBI 50933089 Swiss Prot Q9LST8
Beta alanina sintasa (EC 3.5.1.6)	33.4/5.3	44.3/4.8	AAVQFACTDTVADNVAAAER VQELFEGQYFCQAQR GNSFLAGPT	0.002 7×10^{-7} 125	NCBI 50253039 Swiss Prot Q93XI4
Proteína de la Familia de Cupinas	74.3/6.0	22.6/5.0	VTYLQEGGSETSSLEVQR	0.020	NCBI 108706671
			YLQEGGSETSSLEVQ	13	
			VYALFTSNALNCDDPSHP	0.087	
			SEAGTVTATDVADAAGTVYR	2×10^{-4}	
Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (EC 1.2.1.12)	44.0/5.1	36.5/5.7	AGIALNDHFVK DAPMFVVGVNEDK VPTVDVSVVDLTVR	0.77 3×10^{-4} 2×10^{-4}	NCBI 34787348 Swiss Prot P26517
Lactoilglutación liasa (EC 4.4.1.5; Glioxalasa I)	32.6/5.7	37.7/5.2	AFAQDPDGYLFELLQR	2×10^{-5}	NCBI 16580747 Swiss Prot Q948T6
			SFLDPDGWK	0.93	
			VVLVDYADFLK	2.3	
			GNAYAQVALGTD	1.2	
Dextrinasa Límite	99.1/5.0	104/5.6	Identidad determinada por espectrometría de masas	-	NCBI 2677837
Precursor Oxalato Oxidasa 2 (EC 1.2.3.4)	23.5/6.1	39.4/5.7	VTEFPGENTQGVSMNR DFCVADLD AGETFLIPR	0.51 13 52	NCBI 1171937 Swiss Prot P45851
Globulina del Embrión	72.3/6.8	12.1/5.8	SPAQELTFGR	0.57	NCBI 167004 Swiss Prot Q03678

7.3 Función de las proteínas inducidas por AG₃

7.3.1 Activación de la transcripción dependiente de AG₃

Una de las proteínas identificadas que se regulan por AG₃ es la subunidad β del proteasoma 20S. Una estructura altamente ordenada de subunidades β y α , llamada subunidad 20S al unirse a dos subunidades regulatorias llamadas 19S forman un complejo proteasa multicatalítico llamado Proteasoma 26S (Moon, et. al., 2004). Este complejo remueve proteínas anormales, mal plegadas o de vida corta (Chen, et. al., 2004) mediante la vía de poliubiquitinación en la cual las proteínas son conjugadas con múltiples subunidades de ubiquitina y de esta forma quedan señalizadas para la degradación por el proteasoma (Smalle, et. al., 2003; Smalle y Vierstra, 2004). Entre las proteínas que puede degradar el proteasoma se encuentran factores de transcripción, enzimas del metabolismo y proteínas que participan en la transducción de señales (Moon, et. al., 2004).

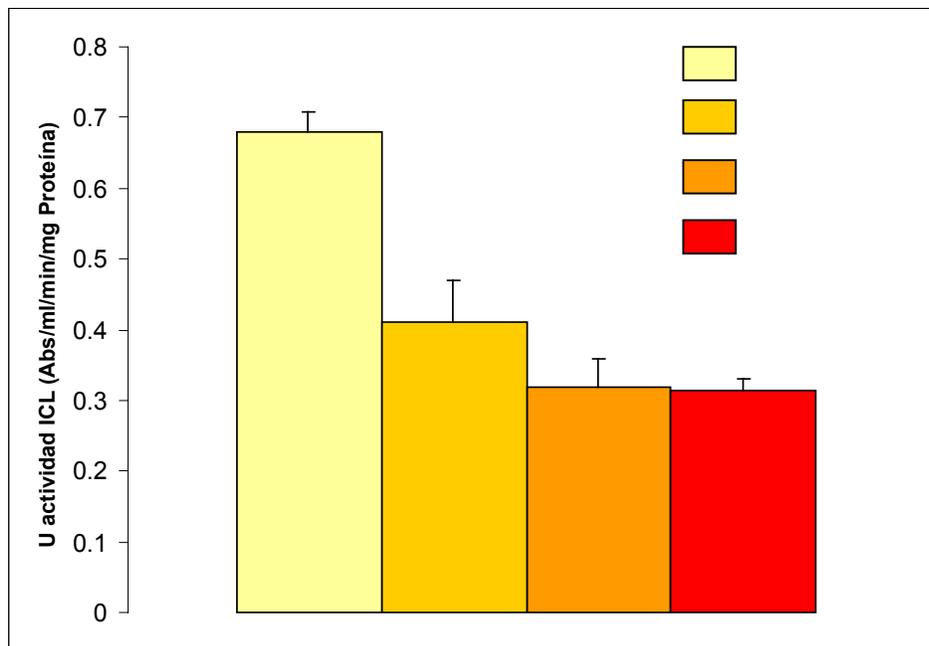
Se demostró recientemente en semillas de cebada que la respuesta a AG₃ es regulada negativamente por una proteína represora llamada SLN1 (SLENDER1; Peng y Harberd 1997; Fu, et. al., 2004) que es rápidamente degradada en respuesta al AG₃ por la vía de 26S Proteasoma (Fu, et. al., 2002). La remoción de la SLN1, lleva a eliminar la represión de varios procesos característicos de la respuesta al AG₃, incluyendo la producción y secreción de hidrolasas (Eastmond y Jones, 2005).

El hecho de que hayamos encontrado un fragmento de la subunidad β del proteasoma 20S sugiere que a las 3 h de incubación con AG₃ este sistema ya está inactivo y muy probablemente esta inactivación es a través de la proteólisis de sus componentes. En este tiempo la represión que tenía el sistema es eliminada y se pueden llevar a cabo todos los procesos necesarios para la movilización de reservas como los que se sugiere a continuación.

7.3.2 Metabolismo de Lípidos y Carbohidratos

Se sabe que la composición de las reservas de almacenamiento de la aleurona de la cebada es similar a la de muchas oleaginosas, constituyentes lipídicos (Jones, 1969). El AG₃ estimula la gluconeogénesis así como la actividad enzimática de la β-oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato (Doig, et al., 1975), por lo que se especula que el catabolismo de lípidos en la capa de aleurona debe iniciarse primero. El catabolismo de lípidos se requiere para producir energía y esqueletos carbonados para poder iniciar la producción y secreción de hidrolasas por la aleurona. Debido a que las proteínas encontradas se aislaron después de 3 horas de incubación con AG₃, la gluconeogénesis, alimentada por los productos del ciclo del glioxilato, está muy activa y por esto encontramos inducida a la isocitrato liasa (ICL), enzima esencial para el ciclo del glioxilato (Eastmond y Jones, 2005) y regulada por AG₃, aunque con un peso molecular menor que el reportado. Una posibilidad es que si bien la expresión del gen de la ICL se induce por AG₃ también se podría incrementar su recambio.

La ICL se encuentra asociada a los glioxisomas en los cuales se genera H₂O₂ durante la β-oxidación, este metabolito inactiva a la enzima (Yanik y Donaldson, 2005). Ya que la catalasa, enzima que degrada al H₂O₂, alcanza su máxima actividad hasta las 12h de tratamiento con AG₃ (Kermode y Palma, 2003) podría ser que el H₂O₂ sobrepase la actividad detoxificante del sistema, acumulándose y causando la inactivación de la ICL y por lo tanto, su degradación. Para demostrar que a este tiempo la velocidad de expresión de esta enzima era mayor que su inactivación, se cuantificó la actividad de la enzima en las mismas condiciones de incubación con AG₃ que se realizaron los geles de 2D y se obtuvo lo siguiente.



Como se puede observar en la figura 10, la actividad de la ICL en semillas 1998, se incrementa un 60% aproximadamente en presencia de AG₃, por lo que concluimos que efectivamente la ICL es una de las proteínas inducidas a las 3 h.

Otra enzima que encontramos fue la β -alanina sintasa, la cual puede estar asociada al metabolismo de lípidos. Ya que la β -oxidación en los glioxisomas debe ser muy activa se necesitarían grandes cantidad de CoA, la β -alanina sintasa proporciona β -alanina, que es un componente esencial del pantotenato de la coenzima A, mediante el catabolismo de las pirimidinas (Rathinasabapathi, et. al., 2000). El AG₃ acelera la hidrólisis de ácidos nucleicos durante las primeras horas de la germinación (Brown y David, 1986), de modo que se tendrían los sustratos necesarios para la formación de CoA.

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es otra de las enzimas encontradas, la cual participa activamente en la gluconeogénesis ya que cataliza la oxidación y fosforilación del D-gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato.

Además de la gluconeogénesis y la β -oxidación, el metabolismo de carbohidratos también debe estar muy activo de modo que se generen gran cantidad de triosas como la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato, formados por la triosa fosfato isomerasa de la glucólisis, en esta reacción se forma un subproducto citotóxico, el metilglioxal (MG) que reacciona con el DNA y las proteínas (Kumar, et. al. 2005). La aleurona tiene un sistema de detoxificación para este subproducto, el sistema de la glioxalasa que convierte el MG en ácido láctico; este sistema está formado por la glioxalasa I y II. Se encontró a la glioxalasa I como una enzima que se induce por AG_3 . Para demostrar que este sistema está activo, sería deseable demostrar la presencia de la glioxalasa II.

Otra de las enzimas que encontramos, se trata de una dextrinasa límite que también es regulada por AG_3 (Schroeder y MacGregor, 1998). Aunque no se sabe cómo es que esta enzima es liberada de la aleurona puede estar implicada en la síntesis de almidón, elementos de respuesta al AG_3 encontrados en la región del promotor del gen sugieren que la enzima participa en la hidrólisis del almidón durante la movilización de reservas (Burton, et. al., 1999).

7.3.3 Metabolismo de especies reactivas de oxígeno (EROs)

La formación del radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$, una de las especies reactivas de oxígeno, puede ocurrir en diferentes compartimentos de la célula (Elstner, 1991). En las membranas de los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas es donde se piensa que se generan las cantidades más importantes de radicales superóxido (Fridovich, 1986). La cantidad de estas especies se incrementa con la actividad metabólica del organelo. Takahashi y Asada (1983) demostraron que las membranas eran impermeables a moléculas de $O_2^{\cdot-}$ Cargadas. Por lo tanto las superóxido dismutasas (SODs), que catalizan la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, deben estar presentes en las membranas de compartimentos donde los radicales superóxido se forman o en la matriz de los organelos donde se producen para poder eliminarlos (Takahashi y Asada, 1983). En algunos casos la cantidad de EROs sobrepasa la capacidad

antioxidante de la célula. Este exceso de EROs es dañino para muchos componentes celulares, incluyendo los lípidos de la membrana. Las EROs en exceso provocan la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y éstas pierden sus propiedades biológicas de manera parcial o total dependiendo de la magnitud de la lipoperoxidación. Se ha demostrado que las aleuronas de cebada contienen al menos dos diferentes isoformas de SOD, una Cu-ZnSOD y una MnSOD (Fath, et. al., 2001). La MnSOD se encuentra principalmente en mitocondrias y en algunos trabajos se ha demostrado que esta asociada a las membranas de los glioxisomas (Sandalo y Del Rio, 1988). Debido a que en la metodología utilizada para extraer proteínas de membrana, se eliminan las mitocondrias por centrifugación diferencial y el tejido tiene una gran cantidad de glioxisomas suponemos que la enzima que nosotros encontramos es una MnSOD que se encuentra unida a glioxisomas. Recientemente se ha encontrado que el AG_3 disminuye la actividad de la MnSOD soluble (Fath, et. al., 2001), esta disminución puede deberse a que el AG_3 provocara una redistribución de esta enzima, de forma tal que la disminución en la actividad de la MnSOD soluble reportada por Fath, et. al. (2001) coincidiera con un incremento en la actividad de MnSOD en la membrana glioxisomal. La posibilidad de que esta enzima sea contaminación mitocondrial no puede ser descartada con los experimentos realizados.

7.3.4 Procesos en la pared celular de aleurona

La aleurona tiene una alta capacidad para acidificar el medio que la rodea (Hamabata, et. al., 1998; Martínez-Camacho, 2004) y esta capacidad se incrementa cuando el tejido es tratado con AG_3 . A diferencia de otros tejidos en los que ésta actividad participa en la relajación de la pared celular, en la aleurona favorece la rigidización de la pared celular acompañada de la solubilización del calcio (Morales, et, al., 2000). La rigidización de la pared celular se puede realizar por diversos mecanismos: interacción de pectinas con calcio o el entrecruzamiento de polisacáridos a través de fenoles o de proteínas ricas en tirosina, para lo cual se requiere H_2O_2 .

Dado que durante la rigidización de la pared celular de la aleurona el calcio se solubiliza (Morales, et. al., 2000) el primer mecanismo los constituye el hecho de que entre las proteínas inducidas por AG₃ hayamos identificado a la oxalato oxidasa (OXO2), enzima localizada en el apoplasto y que produce CO₂, H₂O₂ y Ca²⁺ si se utiliza oxalato de calcio como sustrato o sólo los dos primeros metabolitos si el sustrato es oxalato. El H₂O₂ y el Ca²⁺ liberados (Svedruzic, et. al., 2005) difunden rápidamente y se comportan como segundos mensajeros que participan en el proceso de transducción de señales (Kotsira y Clonis, 1998). El H₂O₂ generado se puede combinar con cloro y formar hipoclorito, un fuerte oxidante que participa en la resistencia de los cereales a las toxinas (Kotsira y Clonis, 1998).

7.3.5 Proteínas de reserva

Debido a que la familia de las cupinas es muy extensa no podemos asignar una función a esta proteína en el proceso de movilización de reservas ya que las cupinas tienen una gran diversidad de funciones. Las globulinas son proteínas de reserva presentes en el embrión y en la aleurona de las semillas de cebada. Se utilizan para proporcionar energía durante la germinación (Heck, et. al., 1993).

En resumen, en la Figura 11 se muestra un esquema que representa el metabolismo que estaría activo durante las primeras 3 h de incubación con AG₃. En las primeras etapas de incubación con AG₃, el proteasoma 26S elimina la represión de varios procesos característicos de la respuesta al AG₃ y remueve proteínas mal plegadas. Posteriormente se lleva a cabo la movilización de lípidos de la aleurona. Los ácidos grasos liberados de los triglicéridos por medio de lipasas son transportados hacia el glioxisoma. Mediante la β -oxidación los ácidos grasos se convierten en acetilCoA que entra al ciclo del glioxilato y posteriormente a la gluconeogénesis con el objetivo de producir energía y esqueletos carbonados que son necesarios para la producción y secreción de hidrolasas. Durante la movilización de los lípidos, se generan radicales superóxido que son detoxificados por la MnSOD y durante la gluconeogénesis se genera metilglioxal, tóxico para la célula, que se elimina por la vía de la Glioxalasa.



Figura 11. Proteínas involucradas en metabolismo de la aleurona. Las proteínas en cuadros rojos corresponden a las proteínas inducidas por AG₃.

7.4 Actividad de Proteasas

Ya que algunas de las proteínas presentaron un menor peso molecular que el reportado se determinó la actividad de proteasas que posiblemente pudieran estar degradando a las proteína. La actividad de proteasas se determinó a diferentes pH y en 3 etapas diferentes de la extracción de proteínas de membrana, el homogenado total, la fracción soluble y en la fracción microsomal. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 6. Determinación de la actividad de proteasas en tres fracciones diferentes de aleuronas 1998 en ausencia de AG₃,

pH	Actividad Proteasas* Homogenado Total (g/L)	Actividad Proteasas* Fracción Soluble (g/L)	Actividad Proteasas* Fracción microsomal (g/L)
5.5	1.41×10^{-3}	1.29×10^{-3}	1.22×10^{-3}
7.0	6.76×10^{-4}	7.57×10^{-4}	1.09×10^{-3}
8.8	5.54×10^{-4}	4.32×10^{-4}	1.28×10^{-3}

*Coeficiente de extinción molar de la azocaseína al 1% en NaOH es 37 g/L. La actividad esta dada en función de las condiciones del ensayo (Ver material y métodos)

Como se observa en la tabla 6, a pesar de que a pH 8.8 hay mayor actividad de proteasas en la fracción microsomal, la actividad de proteasas en las 3 fracciones y a los diferentes pH es mínima, de modo que no pudo haber degradación de las proteínas durante el proceso de extracción de proteínas de membrana.

Una vez demostrado que durante la extracción de proteínas membranales no hubo degradación se pensó que alguna proteasa pudiera estar degradando a las proteínas durante la imbibición de las proteínas para el IEF, ya que las proteínas se embeben durante 16 h a 20°C y si alguna proteasa no hubiera sido inhibida podría estar ocasionando la degradación.

Tabla 7. Determinación de proteasas en fracción microsomal en ausencia y presencia de AG₃. (Incubación de 16h en presencia de azocaseína)

Actividad Proteasas* -AG ₃ (g/L)	Actividad Proteasas* +AG ₃ (g/L)
9×10^{-4}	1.3×10^{-3}

*Coeficiente de extinción molar de la azocaseína al 1% en NaOH es 37 g/L. La actividad esta dada en función de las condiciones del ensayo (Ver material y métodos)

Como se observa tampoco hay una actividad relevante de proteasas durante el tiempo en que las proteínas se embebieron en las tiras para el IEF, por lo que el menor peso molecular obtenido para algunas proteínas se puede deber a una degradación anterior o durante la incubación con AG₃ o a factores ya mencionados anteriormente.

7.5 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEMBRANALES INDUCIDAS POR AG₃ CON POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA MOVILIZACIÓN DE RESERVAS

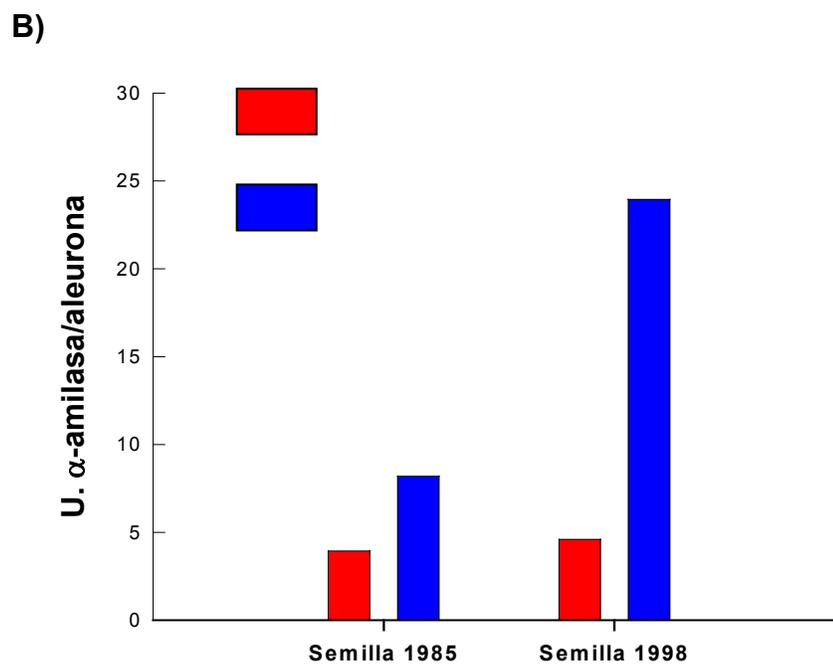
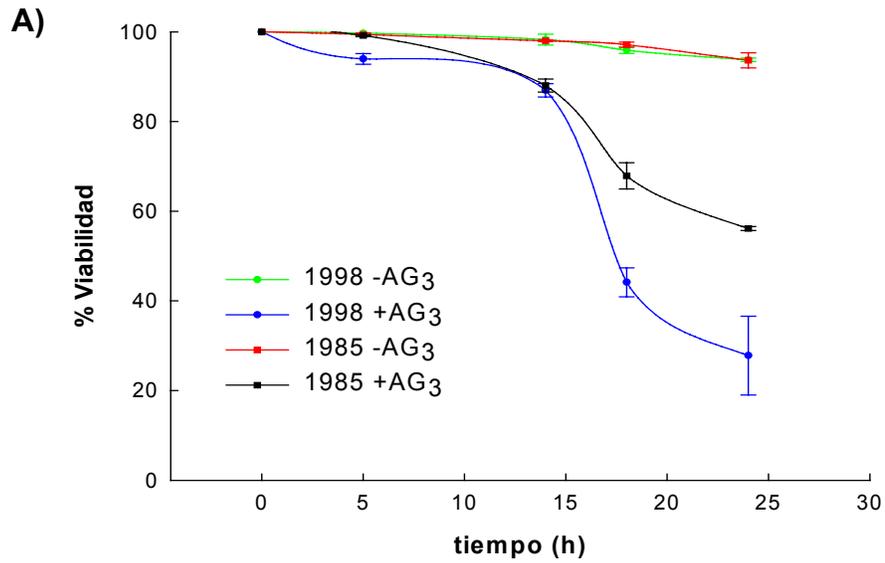
Con la finalidad de definir si alguna de las proteínas identificadas e inducidas por AG₃ participaba en la movilización de reservas se utilizó un lote de bajo vigor (1985), debido a que se ha reportado que el almacenamiento de semillas disminuye la eficiencia de la movilización de reservas en cereales. Para demostrar que el lote de bajo vigor (1985) presentaba estas características se comparó la actividad de α -amilasa inducida por AG₃ en este lote y su control, el lote 1998.

En ausencia de AG₃ se observó (Figura 12B) que las semillas de ambos lotes presentaron actividades enzimáticas similares (4.60 y 3.93 U de α -amilasa/ aleurona, respectivamente). En presencia de AG₃, la actividad de α -amilasa se incrementó en ambos lotes de semillas. Sin embargo, el incremento fue mayor en el lote control (1998) que en el de bajo vigor (1985). En este último caso la actividad de la α -amilasa incrementó sólo 2 veces con respecto a su control, mientras que en la semilla control (1998) la actividad aumentó 5.2 veces con respecto al tejido sin tratamiento. Esto nos sugiere que en efecto, las semillas almacenadas por largo tiempo mostraron una menor eficiencia en la movilización de reservas.

Estos resultados se podrían explicar de dos maneras: La viabilidad de las células de la aleurona en las semillas de bajo vigor (1985) era menor que en el lote control (1998) o bien que las proteínas membranales que participan en la movilización de reservas estuvieran dañadas. Para decidir entre estas dos posibilidades se cuantificó la viabilidad de las células de la aleurona en cada uno de los lotes.

En el ensayo de viabilidad (Figura 12A) se observó que tanto en la semilla control (1998) como en la semilla de bajo vigor (1985) incubadas en ausencia de AG₃ presentaron porcentajes de viabilidad similares, lo cual indica que la viabilidad de ambos lotes era similar y por lo tanto ésta no era la causa de la diferencia observada en la eficiencia de movilización. Sin embargo, la velocidad de muerte celular inducida por AG₃ fue diferente entre los lotes (el AG₃ induce muerte

celular), sugiriendo fuertemente que las proteínas membranales presentes en la aleurona y que participan en la respuesta al AG₃ se hubieran dañado o que el sistema fuese incapaz de inducir la síntesis de proteínas específicas.



Para evaluar entre estas posibilidades se generaron los patrones electroforéticos 2-D de las proteínas membranales del lote de bajo vigor (1985).

7.5.1 Patrones electroforéticos semilla de bajo vigor (1985)

Desafortunadamente no se logró el electroenfoco de las proteínas de la semilla de bajo vigor (1985), ni en presencia ni en ausencia de AG_3 (Figura 13), lo que de nuevo sugiere que las proteínas aisladas del lote 1985 se modificaron durante el almacenamiento. En la literatura se reportan diversas causas por las cuales las proteínas en una muestra no se pueden enfocar. A continuación se describen los diferentes experimentos realizados para tratar de definir la causa por la cual estas proteínas no pudieron ser enfocadas.

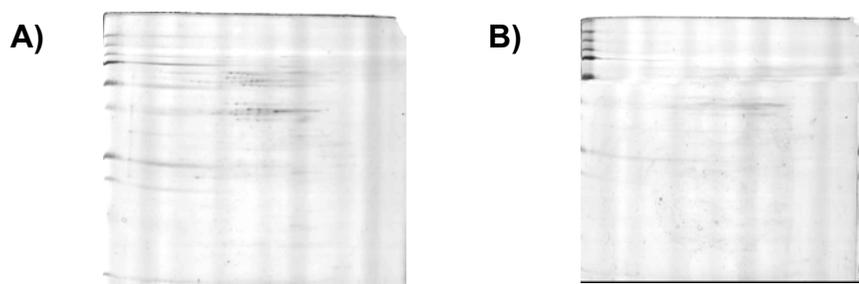


Figura 13. Patrones de proteínas membranales de aleuronas de semillas de bajo vigor (1985).
A) En ausencia de AG_3 . B) en presencia de AG_3 .

La primera posibilidad explorada para definir la causa de porque las proteínas aisladas de aleuronas de bajo vigor (1985) no se enfocaran, fue disminuir la cantidad de muestra cargada en la primera dimensión. Se ha reportado que el exceso de proteína cargada es una causa para que haya un deficiente enfoque (Berkelman y Stenstean, 1998). De manera rutinaria, nosotros cargamos 500 μg de muestra, por lo que se decidió disminuir diez veces la cantidad de muestra, así que se corrieron geles 2-D con 50 μg de muestra. El resultado de estos experimentos (Figura 14) indica que el patrón de enfoque no mejoró.

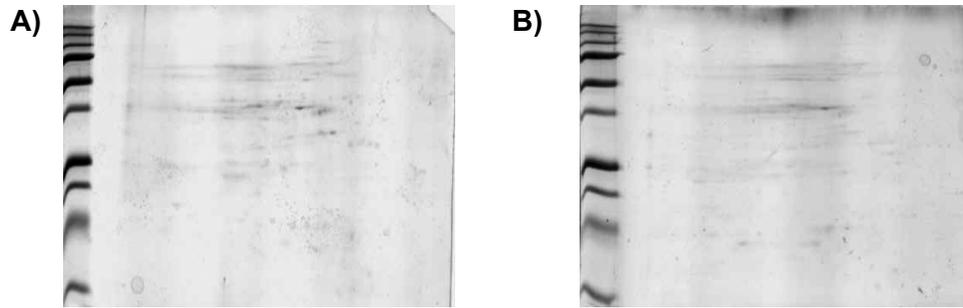


Figura 14. Patrones de proteínas membranales de aleuronas de semillas de bajo vigor (1985).
A) En ausencia de AG₃. B) En presencia de AG₃. Cantidad de muestra 50µg

Otra posibilidad que impide un buen enfoque de las proteínas es que la muestra de proteínas aisladas del lote 1985 contuviera proteínas o impurezas que no fueran solubles en el buffer de resuspensión utilizado para cargar la muestra en las tiras de IPG y esto constituyera un factor que determine que las proteínas no se enfoquen. Por lo que se probó incrementar el tiempo de resuspensión de la muestra de 45 min a 1.5h y posteriormente centrifugar durante 30 min a 14000 rpm. La formación de una pastilla indicaría la presencia de proteínas insolubles o impurezas. No se observó ningún precipitado en las muestras analizadas, por lo que se infiere que toda la muestra fue resuspendida. Este resultado indicó que las proteínas aisladas del lote 1985 son totalmente solubles en el buffer de resuspensión. Por lo que la insolubilidad de las proteínas o impurezas tampoco es una razón por la cual las proteínas no se enfocan en los geles 2D.

Otra causa que puede impedir el enfoque de las proteínas es que durante el almacenamiento las proteínas se hubiesen glicosilado o que en la preparación de la muestra se estuviesen arrastrando polisacáridos de la pared celular. Se tiene conocimiento de que los carbohidratos (especialmente los que están cargados) pueden interactuar con las anfólicas y las proteínas, ocasionando que las proteínas no se enfoquen correctamente y se obtengan geles como los de la figura 13 (Berkelman y Stenstead, 1998). Para poder comprobar si ésta era la causa del problema, se determinaron carbohidratos por el método del fenol-sulfúrico.

También se corrieron geles de 1D y se tiñeron para detectar glicoproteínas (GelCode Glycoprotein Staining Kit).

Tabla 8. Cantidad de carbohidratos presentes en las proteínas de semillas control (1998) y de bajo vigor (1985), inducidas y no inducidas por AG₃ utilizando la técnica del fenol-sulfúrico.

Semilla	Tratamiento	μg Glu / μg Proteína
1985	+AG ₃	0.75
	-AG ₃	1.00
1998	+AG ₃	0.74
	-AG ₃	0.60

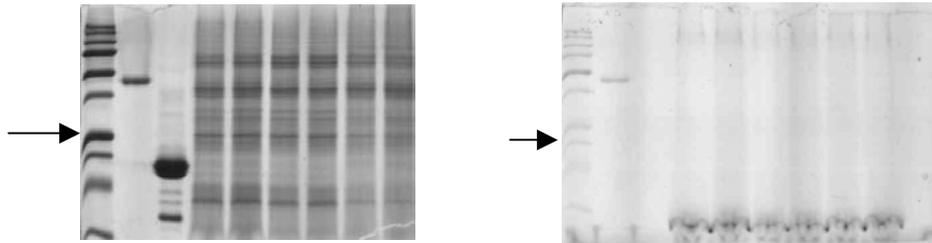


Figura 15. Geles de poliacrilamida 15% 1-D. El carril 1 corresponde al control positivo, peroxidasa, el carril 2 es el control negativo, inhibidor de tripsina. Carril 3 y 4: 1985 +AG₃. Carril 5 y 6: 1985 -AG₃. Carril 7: 1998 +AG₃. Carril 8: 1998 -AG₃.

A) Tinción con Azul de Coomasie. B) Tinción de glicoproteínas.

A pesar de que la cuantificación química de carbohidratos indica la presencia de azúcares en las muestras independientemente del lote o del tratamiento, no se logró detectar la presencia de glicoproteínas (Figura 15B). Este resultado negativo no es un error pues la tinción se realizó correctamente ya que en el gel se observó la banda del control positivo, peroxidasa, que si presenta carbohidratos en su estructura. Para comprobar que el resultado negativo de la tinción de glucoproteínas tampoco se debía una insuficiente carga de proteína, el gel se tiñó con azul de Coomassie coloidal. En la figura 15A se observan las proteínas cargadas en cada carril. Estos resultados nos indican que los carbohidratos no son la razón por la cual las proteínas no se enfocan en los geles.

Se ha reportado que durante el almacenamiento, las reacciones que producen lipoperóxidos se producen continuamente (Narayana y Sun, 2000). Estas especies químicas son altamente reactivas, por lo que existe la posibilidad de que reaccionen con proteínas cercanas a su sitio de producción de forma tal que en las proteínas membranales del lote 1985 fuese mayor la abundancia de proteolípidos que en las del lote control (1998). Esto podría ser una de las posibles causas de este problema, ya que los lípidos unidos a proteínas pueden interferir en el enfoque de las mismas. Por lo que extrajimos los proteolípidos de la muestra de proteínas membranales con cloroformo-metanol (2:1) y se corrieron geles 2D, esperando que al eliminar los proteolípidos se enfocaran adecuadamente las proteínas. Efectivamente después de este tratamiento, la muestra se enfocó mucho mejor (Figura 16).

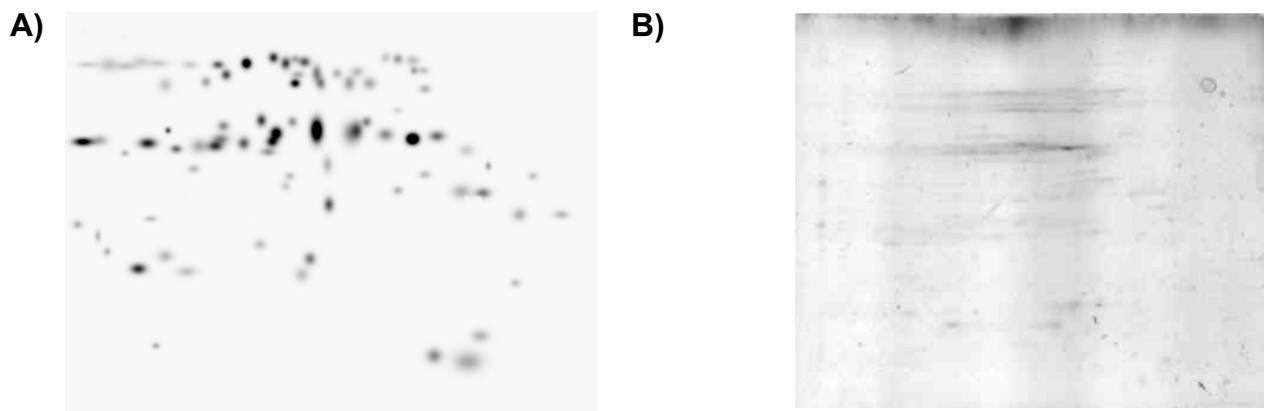


Figura 16. Patrones electroforéticos de proteínas membranales de aleuronas de semillas de diferente vigor, en presencia de AG_3 . A) Proteínas membranales aisladas de aleuronas de semilla de bajo vigor (1985) a las que se le eliminó la fracción lipídica B) Proteínas membranales aisladas de aleuronas de semilla de bajo vigor (1985).



Figura 17. Patrones electroforéticos de proteínas membranales de aleuronas de semillas de diferente vigor, en presencia de AG_3 . A) Proteínas membranales aisladas de aleuronas de semilla de bajo vigor (1985) enfocadas a 7500Vh B) Proteínas membranales aisladas de aleuronas de semilla control (1998) enfocadas a 7500Vh.

La mejoría del electroenfoco de las proteínas debido al tratamiento de las muestras con cloroformo metanol (Figura 16A) sugería que la muestra del lote 1985 era diferente de la 1998, por lo que decidimos variar las condiciones de electroenfoco. Cuando las proteínas de la semilla de bajo vigor (1985) se electroenfocaron en tiras de 7cm de IPG durante un mayor tiempo (7500Vh), los patrones en la segunda dimensión presentaron proteínas bien enfocadas aunque la abundancia de las proteínas en el control (1998) fue menor (Figura 17B). La comparación entre los patrones de proteínas de aleuronas de semillas de bajo vigor (1985; Figura 16A y Figura 17A) muestra la existencia de un número de manchas notablemente menor en la muestra obtenida al extraer con cloroformo metanol que en la muestra electroenfocada por más tiempo, sugiriendo que efectivamente algunas de las proteínas fueron extraídas en la mezcla cloroformo-metanol.

Desafortunadamente no se puede hacer la comparación de estos patrones ya que como se observa en la figura 17, el patrón electroforético de la semilla mejoró pero el patrón del control (1998) se modificó de tal forma que redujo la cantidad de proteínas.

Aparentemente, las proteínas membranales de la aleurona de bajo vigor se modificaron; y esta modificación parece deberse a la formación de lipoperóxidos, los cuales junto con otros radicales pueden ser detectados por Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE). Con la finalidad de demostrar si se dan las condiciones, presencia de radicales libres, para que se modifiquen las proteínas membranales en la semilla de bajo vigor (1985), se mandaron hacer estudios de RPE (Resonancia Paramagnética Electrónica) a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI). Se sabe que al haber radicales libres, estos pueden interferir en el enfoque de las proteínas, ya que los radicales podrían inducir el entrecruzamiento de proteínas, o acomplejar las proteínas con las anfotericinas, lo cual no permitiría la formación óptima del gradiente de pH en el Isoelectroenfoque, y por tanto las proteínas no lograrían alcanzar su pI y se obtendrían geles 2D como los de la figura 13.

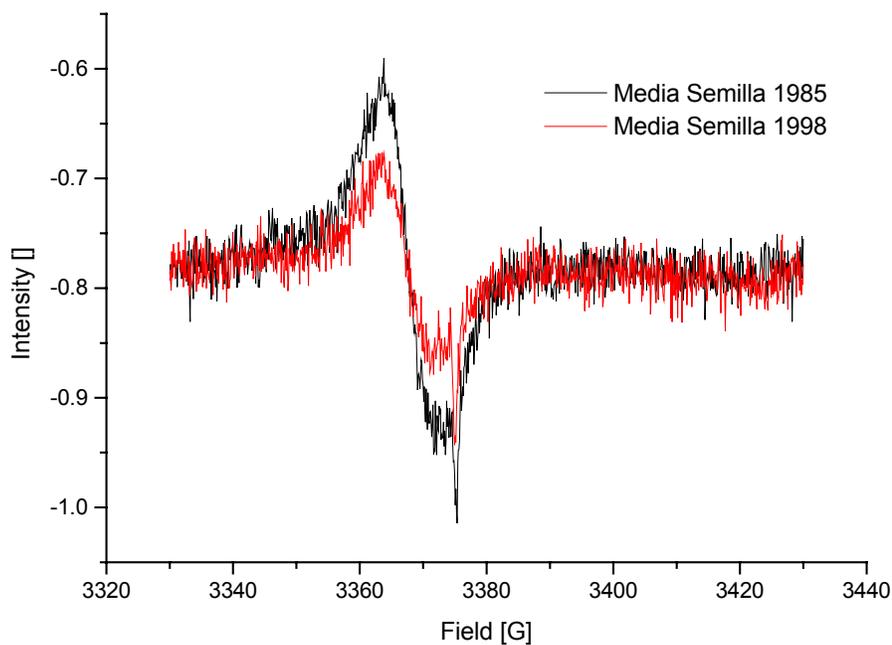


Figura 18. Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) de medias semillas de cebada de vigor contrastante

En la figura 18 se muestra que, cualitativamente, la semilla de bajo vigor (1985) contiene una mayor cantidad de radicales libres que su control debido al almacenamiento, por lo que nos propusimos determinar si la imbibición de las semillas durante 96 h contribuía al aumento en la cantidad de radicales libres o a su disminución.

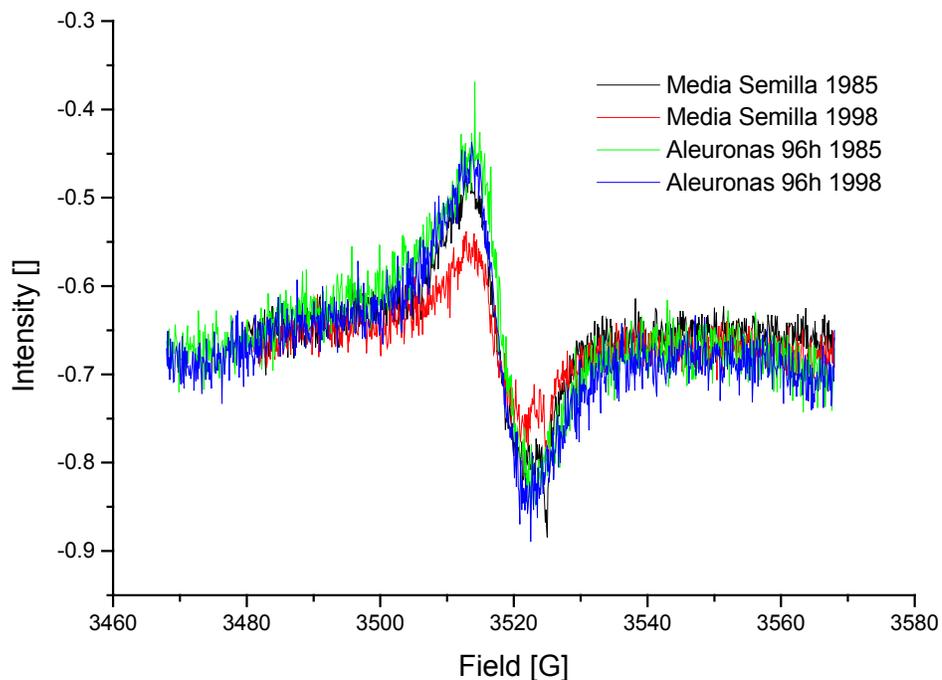


Figura 19. Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) de medias semillas de cebada de vigor contrastante y aleuronas extraídas de semillas embebidas durante 96h.

El tratamiento de imbibición para aislar las aleuronas produjo en el lote control (1998) un aumento en la cantidad de radicales. Este incremento fue de tal magnitud que el contenido de radicales fue similar en aleuronas aisladas de ambos lotes de semillas (Figura 19). Una vez hecha esta comparación se determinó si el tratamiento con AG_3 , modificaba este contenido de radicales libres.

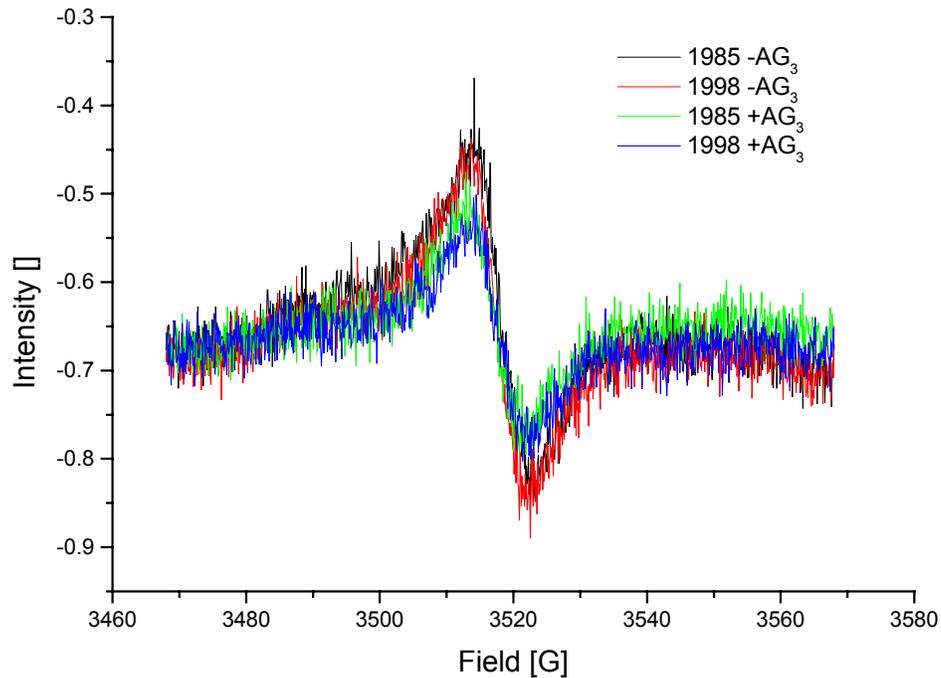


Figura 20. Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) de aleuronas aisladas de semillas de vigor contrastante en ausencia y presencia de AG₃.

En la figura 20, observamos que el tratamiento con AG₃ disminuyó los niveles de radicales libres en las aleuronas, de modo que después de 3h de incubación con la hormona, las aleuronas de las semillas de vigor contrastante presentaron la misma cantidad de radicales pero menor que la presente en las aleuronas que no fueron tratadas con el fitorregulador. Este resultado sugiere que la capacidad metabólica para inactivar radicales fue similar en ambos lotes. Por lo tanto, la posible diferencia en el comportamiento eléctrico de ambas muestras de proteínas no fue causada por diferencias en niveles de radicales libres durante la incubación de aleuronas aisladas. Aunque, la diferencia bien pudo establecerse durante el período de almacenamiento o durante la homogenización del tejido. Para distinguir entre estas dos posibilidades la muestra se homogenizó en presencia de un antioxidante (BHT) y los patrones 2-D obtenidos fueron los siguientes.

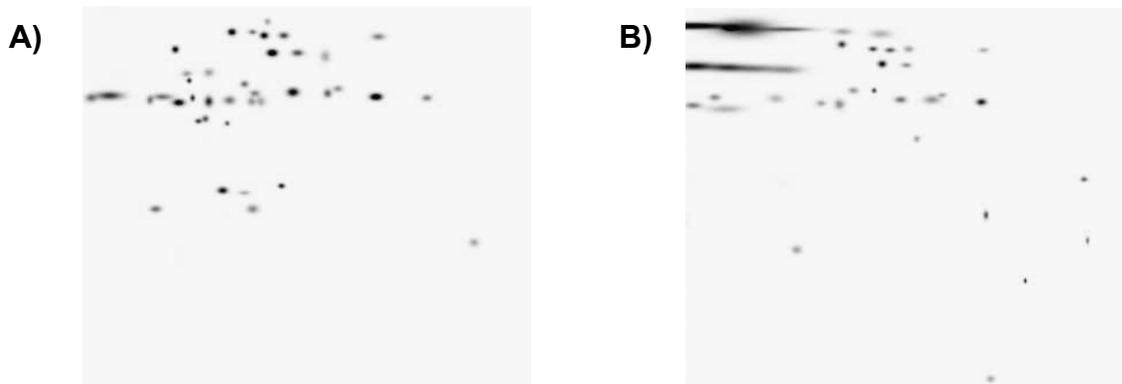


Figura 21. Patrones electroforéticos de proteínas membranales de aleuronas de semillas de bajo vigor que se obtuvieron realizando la homogenización en presencia de un antioxidante (BHT). A) Ausencia de AG_3 B) Presencia de AG_3 .

A pesar de que se tienen patrones electroforéticos con proteínas bien enfocadas (Figura 21), se tiene un número menor de proteínas comparado con el patrón de la semilla control, (1998), de modo que la diferencia en el comportamiento de la muestra no se estableció durante la homogenización de las aleuronas, ya que el antioxidante no mejoró los patrones electroforéticos, por lo que se sugiere que la modificación se haya dado en el periodo de almacenamiento.

En resumen, no fue posible identificar por proteómica en el lote de bajo vigor (1985) cuál de las enzimas inducidas por AG_3 participaba en la movilización reservas. Tomando en cuenta que la actividad de la ICL es la enzima que regula la actividad del ciclo del glioxilato, y éste a su vez regula la velocidad de la vía que lo alimenta y la de la que utiliza su producto, la β -oxidación y la gluconeogénesis respectivamente, cuantificamos la actividad de la ICL en aleuronas provenientes del lote 1998 y 1985 en presencia y ausencia de AG_3 (Figura 10). En aleuronas provenientes del lote control (1998), el AG_3 incrementa la actividad de ICL cerca de dos veces respecto del tejido no tratado. En cambio en aleuronas del lote de bajo vigor (1985), la actividad basal de la ICL fue menor que la que presenta el tejido control (1998) y el AG_3 no tuvo efecto. Esto sugiere que en las aleuronas de bajo vigor (1985) las vías que conducen a la utilización de los lípidos como fuente de energía y de intermediarios carbonados se encuentran dañadas. Esto podría incidir en la eficiencia con la que el tejido sintetiza α -amilasa.

8. CONCLUSIONES

- El AG₃ modifica la composición proteica en los microsomas de aleurona provenientes del lote control (1998).
- El almacenamiento prolongado de semillas de cebada, aún en condiciones de baja humedad relativa (40%) y 4°C, modifica el comportamiento electroforético de las proteínas microsomales.
- La cantidad de muestra cargada, proteínas o impurezas no solubles, los carbohidratos y los proteolípidos no es la razón por la cual no se logra el electroenfoque de las proteínas membranales de semillas de bajo vigor (1985).
- Se logra el electroenfoque de las proteínas membranales de semilla de bajo vigor (1985) al eliminar los proteolípidos y aumentar las condiciones de electroenfoque (7500Vh), pero se obtienen patrones de proteínas totalmente diferentes comparado con sus respectivos controles (semilla 1998).
- El AG₃ incrementa, mucho antes de la secreción de α -amilasa, la actividad de diversas vías metabólicas, entre las que se encuentra el ciclo del glioxilato, la β -oxidación, y la gluconeogénesis.
- El ciclo del glioxilato es menos activo en las aleuronas aisladas de semillas de bajo vigor (1985).
- Los endospermos provenientes de semillas de bajo vigor (1985) contienen más radicales libres que sus respectivos controles.

9. PERSPECTIVAS

- ⊕ Encontrar las condiciones experimentales para obtener los patrones electroforéticos de las aleuronas de semillas de bajo vigor (1985) y hacer la comparación con los patrones electroforéticos de las aleuronas de semillas control (1998) para identificar de manera fehaciente las proteínas que participen en la movilización de reservas eficiente.
- ⊕ De no conseguir lo anterior, utilizar el ácido abscísico (ABA) para revertir el efecto del AG_3 esperando que el patrón electroforético de las proteínas involucradas en la movilización de reservas eficiente se modifique cuando las aleuronas se incuben en presencia de AG_3 y ABA simultáneamente.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ashihara, H., Stasolla, C., Loukanina, N., Thorpe, T.A. (2000). *Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (Picea glauca) cells: metabolic fate of ¹⁴C-labeled precursors and activity of key enzymes*. *Physiol. Plant.* 108:25–33.
- Barnes, R.L., Naylor, N.W. (1962). *Formation of beta-alanine by pine tissues supplied with intermediates in uracil and orotic acid metabolism*. *Plant Physiol* 37:171–175.
- Berkelman, T., Stenstedt, T. (1998) *2-D Electrophoresis: Using immobilized pH gradients. Principles and methods*. Pp. 43-44. Lo proporciona Accesolab con el equipo Multiphor II.
- Bernal-Lugo, I., Rodríguez, M., Gavilanes Ruiz, M., Hamabata, A. (1999). *Reduced aleurone α -amylase production in aged wheat seeds is accompanied by lower levels of high-pI α -amylase transcripts and reduced response to gibberellic acid*. *J. Exp. Bot.* 50 (332):311-317.
- Bernal-Lugo, I., Parra, C., Carballo, A. Hamabata, A. (1994). *Enzymic systems altered by accelerated ageing of seeds*. *Plant Physiology (Life Science Advances)* 13:287-294.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brown, P. H., David, T.h. (1986). *Barley Aleurone Layers Secrete a Nuclease in Response to Gibberellic Acid*. *Plant Physiol.* 82:801-806.
- Burton, R., Zhang, X., Hrmova, M., Fincher, G. (1999). *A Single Limit Dextrinase Gene Is Expressed Both in the Developing Endosperm and in Germinated Grains of Barley*. *Plant Physiology* 119:859–871.
- Bush, D., Biswas, A.K., Jones, R. (1993). *Hormonal regulation of Ca^{2+} transport in the endomembrane system of the barley aleurone*. *Planta.* 189:507-515.
- Chen, X., Chang, M., Wang, B., Wu, R. (1997). *Cloning of Ca^{2+} -ATPase gene and the role of cytosolic Ca^{2+} in the gibberellin-dependent signalling pathway in aleurone cells*. *The Plant Journal.* 11(3): 363-371.

- Chen, Q., Thorpe, J., Ding, Q., Keller, J. (2004). *Proteasome synthesis and assembly are required for survival during stationary phase. Free Radical Biology and Medicine.* 37(6):859-868.
- Chrispeels M.J., Varner, J.E. (1967). *Hormonal control of enzyme synthesis: On the mode of action of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layers of barley.* Plant Physiology. 42:1008-1016.
- Deswal, R., Kumar, S. (1999). *Glyoxalase I from Brassica juncea is a calmodulin stimulated protein.* Biochimica et Biophysica Acta 1450:460-467.
- Doig, R.I., Colborne, A.J., Morris, G. and Laidman, D.L. (1975). *The induction of glyoxysomal enzyme activities in the aleurone cells of germinating wheat.* J. Exp. Bot. 26:387–398.
- Dubois M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances.* Anal. Chem. 28:350-6.
- Dunwell, J., Khuri, S. Gane, P. (2000). *Microbial Relatives of the Seed Storage Proteins of Higher Plants: Conservation of Structure and Diversification of Function during Evolution of the Cupin Superfamily.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(1):153–179.
- Dunwell, J., Purvis, A., Khuri, S. (2004). *Molecules of Interest Cupins: the most functionally diverse protein superfamily?.* Phytochemistry 65:7–17.
- Eastmond, P.J., Jones, R. (2005). *Hormonal regulation of gluconeogenesis in cereal aleurone is strongly cultivar-dependent and gibberellin action involves SLENDER1 but not GAMYB.* The Plant Journal 44:483–493.
- Ellis, R.H. (1992). *Seed and seedling vigour in relation to crop growth and yield.* Plant Growth Regulation 11:249-255.
- Elstner, E.F. (1991). *Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells.* Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists Press. Pp. 13-25.

- Fath, A., Bethke, P., Jones, R. (2001). *Enzymes That Scavenge Reactive Oxygen Species Are Down-Regulated Prior to Gibberellic Acid-Induced Programmed Cell Death in Barley Aleurone*. Plant Physiology. 126:156–166.
- Fridovich, I. (1986). *Superoxide dismutases*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 58:61-97.
- Fu, X., Richards, D.E., Ait-Ali, T., Hynes, L.W., Ougham, H., Peng, J., and Harberd, N.P. (2002). *Gibberellin-mediated proteasome dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor*. Plant Cell 14:3191–3200.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P. (2004). *The Arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates*. Plant Cell 16:1406–1418.
- Gilroy, S., Jones, R.L. (1994). *Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (Hordeum vulgare L.) aleurone protoplasts*. Plant Physiol. 104:1185-1192.
- Grene, R. (2002). *Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants*. The Arabidopsis Book. 1-20.
- Groll, M., and Huber, R. (2003). *Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 35:606–616.
- Hamabata, A., García-Maya, M., Romero, T., Bernal-Lugo, I. (1998). *Kinetics of the acidification capacity of aleurone layer and its effect upon solubilization of reserve substrates from starch endosperm of wheat*. Plant Physiology. 86:643-644.
- Heck, G.R., Chamberlain, A.K., Ho, T.H. (1993). *Barley embryo globulin 1 gene, Beg1: characterization of cDNA, chromosome mapping and regulation of expression*. Mol Gen Genet. 239 (1-2):209-218.
- Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J. (1991). *Gibberellin perception at the plasma membrane of Avena fatua aleurone protoplasts*. Planta 183:274-280.

- Honoré, B., Østergaard, M., Vorum, H. (2004). *Functional genomics studied by proteomics*. BioEssays. 26:901-915.
- Jacobsen, J.V., Chandler, P.M. (1988). *Giberellin and abscisic acid in germinating cereals. En Plant Hormones and heir role in plant growth development*. Kluwer Acad. Publishers, Ed. P. Davies, 164-193.
- Jones, R.L. (1969). *The fine structure of barely aleurone cells*. Planta, 85:359–374.
- Jones, R.L., Jacobsen, J.V. (1990). *Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone*. International Review of Cytology 126:49-88.
- Jones, H., Smith, S. J., Desikan, R. Plakidou-Dymock, S., Lovegrove, A., Hooley, R. (1998). *Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone*. The Plant Cell. 10:245-253.
- Karim, M., Jan, A., Karibe, H., Komatsu, S. (2005). *Identification of phosphoproteins regulated by gibberellin in rice leaf sheath*. Plant Molecular Biology. 58:27–40.
- Kashem, M. A., Itoh, K., Iwabuchi, S. Hori, H., Mitsui, T. (2000). *Possible involvement of phosphoinositide- Ca^{2+} signalling in the regulation of α -amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.)*. Plant Cell Physiology. 41(4):399-407.
- Kermode, A., Palma, K. (2003). *Metabolism of hydrogen peroxide during reserve mobilization and programmed cell death of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer cells*. Free Radical Biology & Medicine. 35(10):1261-1270.
- Kigel, J., Galili, G. (1995). *Seed development and germination*. Marcel Dekker, Inc. EUA. 701.
- Kotsira, V., Clonis, Y. (1997). *Oxalate Oxidase from Barley Roots: Purification to Homogeneity and Study of Some Molecular, Catalytic, and Binding Properties*. Archives of Biochemistry and Biophysisc 340(2):239–249.

- Kotsira, V., Clonis, Y. (1998). *Chemical Modification of Barley Root Oxalate Oxidase Shows the Presence of a Lysine, a Carboxylate, and Disulfides, Essential for Enzyme Activity*. Archives of Biochemistry and Biophysisc. 356(2):117-126.
- Kumar, S., Singla-Pareek S., Ray, M., Reddy, M.K., Sopory, S. K. (2005). *Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione*. Biochemical and Biophysical Research Communications 337:61–67.
- Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodríguez, M., Bush, D. (1996). *Okadaic Acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells*. The Plant Cell. 8: 259-269.
- Livesley, M.A., Bray, C.M. (1991). *The effects of ageing upon α -amylase production and protein synthesis by wheat aleurone layers*. Annals of Botany 68:69-73.
- Longstaff, M. A., Bryc, J. H. (1993). *Development of Limit Dextrinase in Germinated Barley (*Hordeum vulgare*) Evidence of Proteolytic Activation*. Plant Physiol. 101:881–889.
- Lovegrove, A., Hooley, R. (2000). *Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone*. Trends Plant Sci. 5(3): 102-110.
- Martínez-Camacho, J.L., González-de la Vara, L., Hamabata, A., Mora-Escobedo, R., Calderón-Salinas, V. (2004). *A pH-stating mechanism in isolated wheat (*Triticum aestivum*) aleurone layers involves malic acid transport*. Journal of Plant Physiology. 161:1289-1298.
- Maya, V.R. (1997). *Aislamiento y Purificación de Membrana plasmática de capa de aleurona de cebada*. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
- Moon, J., Parry, G., Estelle, M. (2004). *The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development*. The Plant Cell, 16:3181–3195.
- Morales, J.E., Bernal-Lugo, I. Argüello, C., Ortega-López, J., Rodríguez-Vázquez, R., Hamabata, A. (2000). *Resistance of wheat aleurone cell walls to acid and xylanase action*. Journal of Plant Physiology. 158:21-27.

- Narayana, U.M., Sun, W.Q. (2000). *Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation*. Journal of Experimental Botany. 348 (51):1221-1228.
- Peng, J., Harberd, N.P. (1997). *Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of Arabidopsis*. Plant Physiol. 113:1051–1058.
- Priestley, D.A. (1986). *Seed Aging. Implications for seed storage and persistence in the soil*. Cornell University. United States of America. 43, 128-133.
- Rathinasabapathi B., Sigua, C., Ho, J., Gage, D.A. (2000). *Osmoprotectant β -alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: S-adenosyl-L-methionine dependent N-methylation of β -alanine to its betaine is via N-methyl and N,Ndimethyl β -alanines*. Physiol Plant 109: 225–231.
- Ritchie, S., Gilroy, S. (1998). *Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone*. Plant Physiology. 116:765-776.
- Sandalio, L.M., Del Rio, L.A. (1988). *Intraorganellar Distribution of Superoxide Dismutase in Plant Peroxisomes (Glyoxysomes and Leaf Peroxisomes)*. Plant Physiol. 88:1215-1218.
- Schroeder, S. MacGregor, A. (1998). *Synthesis of Limit Dextrinase in Germinated Barley Kernels and Aleurone Tissues*. J. Am. Soc. Brew. Chem. 56(1):32-37.
- Serna, S. (1996). *Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*. AGT Editor, S.A. México, 34-42, 98, 307-315.
- Singh, B., Sukhija, P.S., Bhatiam, S. (1981). *Embryonic control of isocitrate lyase activity in cotyledons of germinating soybean*. J. Biosci., Vol. 3(2):143-148.
- Skadsen , R.W. (1998). *Physiological and molecular genetic mechanisms regulating hydrolytic enzyme gene expression in cereal grains*. Physiol. Plant. 104:486-502.

- Skylas, D.J., Van Dyk, D., Wrigley, C.W. (2005). *Proteomics of wheat grain*. *Journal of Cereal Sciences*. 41:165-179.
- Skipsey, M., Andrews, C., Townson, T., Jepson, I., Edwards, R. (2000). *Cloning and Characterization of Glyoxalase I from Soybean*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374 (2) 261–268.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T.J., Babiychuk, E., Kushnir, S., and Vierstra, R.D. (2003). *The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling*. *Plant Cell* 15:965–980.
- Smalle, J., Vierstra, R.D. (2004). *The ubiquitin 26s proteasome proteolytic pathway*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 55:555–590.
- Svedruzic, D., Jonsson, S., Toyota, C. G., Reinhardt, L., Ricagnoc, S., Lindqvist, Y., Richards, N. (2005). *The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433:176–192.
- Takahashi, M.A., K. Asada (1983). *Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids*. *Arch. Biochem. Biophys.* 226(2): 558-66.
- Van Kuilenburg, A., Van Lenthe, H., Van Gennip, A. (1999). *A Radiochemical Assay for b-Ureidopropionase Using Radiolabeled N-Carbamyl-β-alanine Obtained via Hydrolysis of [2-14C]5,6-Dihydrouracil*. *Analytical Biochemistry* 272:250–253.
- Vigil, E.L. (1970). *Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm*. *J. Cell Biol.* 46:435–454.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). *The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis*. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015–1068.
- Yanik, T., Donaldson, R. P. (2005). *A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 435:243–252.

11. ANEXOS

11.1 Anexo I. Intensidad relativa de proteínas constitutivas

Tabla 9. Intensidades relativas de las manchas del subproteoma constitutivo presentes en los patrones electroforéticos de semilla control en presencia o ausencia de AG₃ y el porcentaje de inhibición de las manchas debido al tratamiento +AG₃.

No. de Mancha	% del total en 1998 +AG ₃	% del total en 1998 -AG ₃	%Inhibición
802	0.09	1.21	93
1202	0.13	0.34	60
1206	0.02	0.15	88
806	0.25	0.55	55
805	0.08	0.43	82
2208	0.17	0.34	51
2304	0.10	0.26	60
2403	0.03	0.08	58
2406	0.10	0.19	49
2504	0.02	0.07	63
2410	0.05	0.11	52
2502	0.10	0.28	64
2803	0.13	0.34	61
3202	0.24	0.63	61
2412	0.11	0.28	60
3506	0.25	1.26	80
3804	0.19	0.42	56
3707	0.19	0.40	53
3906	0.06	0.15	52
4402	0.12	0.33	63
4801	0.14	0.59	77
5207	0.21	0.75	72
5208	0.12	0.61	81
5712	0.08	0.81	90
5705	0.34	1.31	74
5805	0.07	0.18	59
6307	0.11	0.35	69
6805	0.04	0.28	86
7406	0.02	0.06	65
7505	0.59	1.67	65
7607	0.05	0.16	71
8408	0.20	0.71	72
8504	0.02	0.12	86
9807	0.14	0.52	72
5301	0.08	0.28	73
5203	0.08	0.75	89
5202	0.24	1.04	77
5501	0.13	0.26	52
4609	0.08	0.46	83
5801	0.10	0.72	87
5305	0.19	0.72	73
6302	0.20	0.52	61
9311	0.03	0.10	68
3101	0.04	0.09	58

Tabla 10. Intensidades relativas de las manchas del subproteoma constitutivo presentes en los patrones electroforéticos de semilla control (1998) en presencia o ausencia de AG₃ y el número de veces que aumenta la intensidad de las manchas debido al tratamiento +AG₃.

No. de Mancha	% del total en 1998 +AG ₃	% del total en 1998 -AG ₃	No. Veces que aumenta	No. de Mancha	% del total en 1998 +AG ₃	% del total en 1998 -AG ₃	No. Veces que aumenta
201	1.20	0.15	7.91	5706	0.08	0.04	1.89
904	0.41	0.13	3.05	6003	0.13	0.06	2.27
1307	0.13	0.05	2.67	6202	0.19	0.10	1.90
508	0.81	0.19	4.29	6104	0.15	0.05	2.85
1705	0.80	0.13	6.17	6103	0.09	0.05	2.08
1703	0.16	0.06	2.50	6203	0.30	0.15	1.95
1803	0.21	0.06	3.64	6303	0.26	0.07	3.76
907	0.75	0.21	3.48	6403	0.28	0.11	2.60
1901	0.20	0.02	8.04	6306	0.28	0.12	2.42
1905	0.93	0.25	3.66	6402	0.19	0.07	2.69
2201	0.71	0.36	1.98	6502	0.21	0.08	2.67
2307	0.06	0.02	4.06	6503	0.09	0.02	4.21
2407	0.17	0.08	2.06	6602	0.29	0.05	5.22
2306	0.15	0.06	2.46	6704	0.12	0.03	4.64
2701	0.59	0.26	2.28	6902	0.19	0.03	5.87
2704	0.76	0.13	5.80	6903	0.04	0.01	2.56
3102	0.10	0.02	4.52	7205	0.12	0.06	1.95
3106	0.15	0.04	3.47	7302	0.07	0.04	1.89
3205	0.32	0.03	9.95	7405	0.74	0.24	3.16
3303	0.10	0.02	4.46	7605	0.04	0.02	1.93
2413	0.31	0.16	2.00	7705	0.08	0.02	3.15
3302	0.06	0.03	2.18	7803	0.10	0.01	6.90
3403	0.45	0.21	2.11	7806	0.29	0.10	2.83
3409	0.13	0.04	3.38	7905	0.62	0.26	2.38
3505	1.18	0.35	3.36	7907	0.32	0.13	2.58
3802	0.27	0.12	2.23	8005	0.21	0.01	21.61
3801	0.65	0.25	2.58	8104	0.13	0.06	2.19
3901	0.13	0.05	2.48	8107	0.19	0.10	1.88
3902	0.09	0.02	4.63	8008	0.18	0.05	3.61
3904	0.14	0.04	3.93	8009	0.97	0.46	2.13
4104	0.34	0.17	1.94	8405	0.09	0.04	2.28
4102	0.11	0.06	1.99	8410	0.51	0.03	15.05
4204	0.12	0.03	4.95	8701	0.05	0.02	2.69
4401	0.18	0.09	1.93	8803	0.33	0.05	6.15
4404	0.12	0.04	3.10	9308	0.09	0.03	2.93
4508	0.34	0.18	1.92	9802	0.40	0.14	2.87
4704	0.14	0.05	2.64	2903	0.06	0.02	2.41
5102	0.13	0.04	3.50	4304	0.18	0.09	1.95
5103	0.14	0.07	2.00	5303	0.12	0.04	3.03
5209	0.45	0.21	2.12	5701	0.07	0.03	2.08
5308	0.15	0.04	4.30	6201	0.11	0.05	2.00
5504	0.13	0.07	1.92	7602	0.14	0.04	3.21
5405	0.39	0.05	8.09	8402	0.30	0.09	3.41
5509	0.24	0.12	2.06	8601	0.04	0.02	2.36
5608	0.09	0.02	5.07	8306	0.27	0.05	5.94
5609	0.38	0.11	3.62	8307	0.11	0.03	3.57
5704	0.22	0.09	2.47				

11.2 Anexo II. Datos de viabilidad y actividad de α -amilasa

Tabla 11. Porcentaje de viabilidad de semillas de cebada control (1998) en presencia o ausencia de AG_3 a diferentes tiempos de incubación.

Cebada 1998				
t(h)	% Viabilidad -AG_3	σ	% Viabilidad +AG_3	σ
0	100	0	100	0
5	99.705	0.799	93.965	1.195
14	98.26	1.216	86.94	1.499
18	95.9	0.707	44.155	3.231
24	93.75	0.382	27.805	8.789

Tabla 12. Porcentaje de viabilidad de semillas de cebada de bajo vigor (1985) en presencia o ausencia de AG_3 a diferentes tiempos de incubación.

Cebada 1985				
t(h)	% Viabilidad -AG_3	σ	% Viabilidad +AG_3	σ
0	100	0	100	0
5	99.42	0.354	99.18	0.198
14	98.005	0.205	88.025	1.450
18	97.135	0.559	67.9	2.942
24	93.65	1.683	56.14	0.453

Tabla 13. Determinación de la actividad de α -amilasa para semillas control (1998) y de bajo vigor (1985) con diferentes tratamientos.

Tratamiento	1998	1985
+ AG_3	23.95 U Act α -amilasa/ aleurona	8.19 U Act α -amilasa/ aleurona
- AG_3	4.60 U Act α -amilasa/ aleurona	3.93 U Act α -amilasa/ aleurona

11.3 Anexo III. Características de proteínas Identificadas

Manganeso Superóxido Dismutasa

[*Triticum aestivum*] NCBI **1654387**, SWISS PROT **Q56DH8**

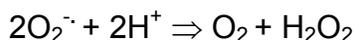
PM 25.3 KDa, pl 7.9

Secuencia (231 aa)

MALRTLAAKKTLLGLALGGARPLAAARGVATFTLPDLPYDFGALEPAVSGEIMRLHHQKHHATYV
ANYNKALEQLDAAVSKGDASAVVHLQSAIK**FNGGGHVNHSIFWKNL**KPISEGGGEPHGKLGW
AIDEDFGSIEKLIKMNNAEGAALQGGGWVWLALDKEAKKLSVETTPNQDPLVTKGSNLYPLLGI**D**
VWEHAYYLQYKNVVRPDYLTNIRKVVNRKYAGEEYEKVLA

Manganeso Superóxido Dismutasa (MnSOD; EC 1.15.1.1)

Las superóxido dismutasas (SODs) catalizan la conversión de los radicales superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno:



En base al cofactor (metal) de estas enzimas, las SODs se clasifican en 3 grupos: hierro SOD (FeSOD) que se localizan en los cloroplastos, manganeso SOD (MnSOD) que se encuentran en las mitocondrias y peroxisomas, y cobre-zinc SOD (Cu-ZnSOD) que se pueden encontrar en cloroplastos, citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Greene 2002)

Isocitrato Liasa Glioxisomal

[*Brassica napus*] NCBI **2143227**, SWISS PROT **P25248**

PM 64.3, pl 6.9

Secuencia (576 aa)

MAASFVPSMIMEEEGRFEAEVAEVQTTWWSSERFKLTRRPYTARDVVALRGHLKQGYASNEM
AKKLWRTLKSHQVNGTASRTFGALDPVQVTMMAKHLDTIYVSGWQCSSTHTSTNEPGPDLD
YPYDTPVNPKEHLFFAQQYHDKRQREARMSMSREERA**KTPFVDYLPKPIADGGTGFGGTTATV**
KLLCKLFVERGAAGVHIEDQSSVTKKCGHMAGKVLVAVSEHINRLVAARLQFDVMGTETVLVART
DAVAPTLIQSNIDSRDHQFILGVTNPNLRGKSLSSLLAEGMAVGNGPALQAIEDQWLSSARLM
TFSDAVVEALKRMNLSENEKSRRVTEWLIHARYENCLSNEQGRELAAKLGVTDLFDWDWDLPR
REGFYRFQGSVTAAVVRGWAFQAQIADLIWMETASPDLECTQFAEGVKSKTPEVMLAYNLSPS
FNWDASGMTDQQMMEFIPRIARLGycwQFITLAGFHADALVVDTFKDYARRGMLAYVERIQR
EERSNGVDTLAHQKWSGANYDYDRYLKTVQGGISSTAAMGKGVTEEQFKETWTRPGAAGMGE
GTSLVVAKSRM

Isocitrato Liasa Glioxisomal (ICL; EC 4.1.3.1)

La isocitrato liasa (ICL) es la enzima que cataliza la conversión de isocitrato a succinato y glioxilato:



La ICL se encuentra en los glioxisomas de las células. Se sabe que es una enzima esencial para la gluconeogénesis (Eastmond y Jones, 2005) y que su actividad es inducida por AG₃ e inhibida por ABA, ésta regulación de la ICL se da a nivel transcripcional. La actividad de esta enzima aumenta en los primeros días de la germinación a la par de un incremento en el número de glioxisomas (Vigil, 1970).

El metabolismo oxidativo genera EROs, radicales superóxido e hidroxilo y peróxido de hidrógeno, en los peroxisomas y glioxisomas. Los glioxisomas se caracterizan por la presencia de catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) la cual protege a las células del estrés oxidativo. Estudios de inmunoprecipitación indican que la CAT se asocia físicamente con una proteína glioxisomal, la isocitrato liasa (Yanik y Donaldson, 2005). También se sabe que el H₂O₂ inactiva a la ICL y degrada el producto de su reacción, el glioxilato, cuando la CAT está inactiva, por lo tanto, se piensa que la asociación de la CAT con la ICL podría darle protección contra el H₂O₂. Interacciones enzima-enzima se han demostrado entre las enzimas del ciclo del glioxilato en glioxisomas (Yanik y Donaldson, 2005). Hay evidencia acumulada de que las enzimas de peroxisomas y glioxisomas están organizadas en grupos de enzimas que permiten a los sustratos ser transportados (*channeling*) para disminuir el tiempo de tránsito de intermediarios, previniendo la pérdida de los intermediarios y además protegerlos.

20S Proteasoma subunidad beta

[*Oryza sativa (japonica cultivar-group)*] NCBI **50253039**, SWISS PROT **Q9LST8**
PM 29.0 KDa, pl 6.5

Secuencia (272 aa)

MAGATDLPPKGGFSYDNCARNAMLVEKGLKMPGFLKTGTTIVGLVFQDGVVLGADTRATEGPI
VADKNCEKIHYPNIYCCGAGT**AADTEAVT**DMVSSQLQLHRYATGRESRVVTSLTLLKSHLFS
YQGHVSAALVLGGVDVTGPHLHTVYPHGSTDLPFATMGSGSLAAMSVFESKYKEGLT**EEGI**
QLVAEAIRGGIF**NDLGSGSNVDVCVITK**GKTEYL**RNHQLPNPR**TYVSSKGYNFTKGQTVVLSTK
ITQLKPKVEVTEGDAMEE

20S Proteasoma subunidad beta

El Proteasoma (macropaina) (EC 3.4.25.1) es un complejo proteinasa multicatalítico que está involucrado en una vía proteolítica no lisosomal dependiente de ATP/ubiquitina, que degrada la mayoría de las proteínas intracelulares de vida corta.

El 26S Proteasoma es un complejo con múltiples subunidades que consiste en un núcleo proteasa 20S cilíndrico y que tiene 2 partículas regulatorias 19S en sus extremos, llamadas tapaderas (Groll y Huber, 2003). La partícula regulatoria sirve como una puerta al interior del núcleo de la proteasa. El núcleo de la proteasa consiste en una serie de unidades α

y β proteolíticas, rodeando una estrecha cámara (Voges, et al., 1999). El núcleo del complejo 20Ss del proteosoma está compuesto por 28 distintas subunidades, las cuales forman una estructura altamente ordenada en forma de 4 anillos de alrededor de 700kDa. Los 2 anillos exteriores están formados por subunidades α , y son proteolíticamente inactivos. Los dos anillos internos están formados por subunidades β , que tienen la actividad proteolítica. La treonina de N-terminal, creada por un modificación post-traducciona es la responsable directa de la proteólisis. Es aquí donde el sustrato es finalmente degradado en pequeños péptidos (8-9 aminoácidos), para que después sus aminoácidos puedan ser reciclados.

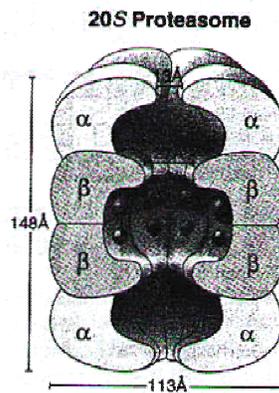


Figura 22. Representación de la estructura de la 20S Proteasoma subunidades α y β (Derecha).

Beta alanina sintasa

[*Oryza sativa (japonica cultivar-group)*] NCBI **50253039**, SWISS PROT **Q93XI4**
PM 33.4 KDa, pl 5.3

Secuencia (301 aa)

MAGGGGAGSKVSV**AAVQFACTDVESENVDTAER**LIREAHKKGANIVL**VQELFEGQYFCQAQR**
LDFQRAKPYKGNPTIIRFQKLAKLEVVIPVSFFEEANNAHNSVAIIDADGTDLGLYRKSHIPD
GPGYQEKFYFNP GDTGFKAFKTKYATIGVGICWDQWFPECARAMVLQGAEILFYPTAIGSEPD
DNNLDSREHWKRMQGHAGANLVPLVASNRIGRET VETEHGESTITFF**GNSFIAGPT**GEIVKLA
NDKDEDLVAEFDLDEIKSTRHGWGIFRDRRPDLYKVLTLTGEEKS

Beta alanina sintasa (EC 3.5.1.6)

La β -alanina sintasa, también llamada β -ureidopropionasa o *N*-carbamil- β -alanina amidohidrolasa (EC 3.5.1.6) cataliza el último paso del catabolismo de pirimidinas. La enzima cataliza la conversión de *N*-carbamil- β -alanina a β -alanina, amoníaco y CO_2 :

El metilglioxal (MG) es un subproducto citotóxico (reacciona con el DNA y las proteínas) producido por el catabolismo de las treonina y la acetona, también es un intermediario de transición de la dihidroxiacetona fosfato y del gliceraldehído-3-fosfato de la vía de la glucólisis. También se acumula en las células por la salida del intermediario 1,2 enediolato del sitio activo de la triosa fosfato isomerasa. Puede ser detoxificado usando la vía del glioxal, el sistema comprende dos enzimas, la glioxalasa I y la glioxalasa II, que catalizan la detoxificación de MG a D-Lactato usando glutatión reducido (GSH) como cofactor (Kumar, et. al. 2005; Skypsey, 2000).



También existe evidencia bioquímica de la modulación de la actividad de la glioxalasa I por calcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$; Deswal y Kumar, 1999), estos son elementos centrales que participan en la vía de transducción de señales de AG_3 ya que participan en la activación de proteínas cinasas, las cuales fosforilan a la glioxalasa I (Karim, et al., 2005) posiblemente para activar o incrementar su actividad; la enzima no muestra ningún cambio a nivel transcripcional debido al tratamiento con AG_3 .

La fosforilación de la glioxalasa I durante el tratamiento con AG_3 indica que esta proteína esta involucrada en la vía de señalización por AG_3 (Karim, et al., 2005).

Proteína de la Familia de las Cupinas

[*Oryza sativa (japonica cultivar-group)*] NCBI **108706671**

PM 74.3 kDa, pI 6.0

Secuencia (656 aa)

MHGDTTPRHPHVARAPPIACLYIIDRRGLSASPRIAPHTAGRSIGQKKRAERWGRMAVAAATVR
WLVLLAVSAAATASREKWWHGAGGEASGGGHLVQKEWRRVVAASSDAGLVTAVDVADAAGT
AYRLHFITMSPGTLFLPVQLHADMFYVHSGRGKVTYIEEGDSESSLQVERGDVYNFDQGTL
YIQSNACGTRERLQIYAIFTSDSINADDPRHPTSEVYSFVSDLLKGFEVVLRPGFVPREVVESI
KSTKTPPAIIPYNPEEEDEDDSSNWTEEITDALWGVRDPHFLNKKKKDKQDKHKGKDKKSKSK
AFNFYSGKPDVENCYGWSRSMTNRDLETLRGSNIGMFMVNLTTGAMMGPHWNPRATEIAVVT
QGAGMVQIVCPSIPSGESKKHHHDEEGGRGDHGHGGGGVRCNSLFRVKEGDVLLVPRFHP
MAQISFNDSFVFGFSTDMGHNHPQFLAGRHSVLQVIGKEILARSLGQDNSTNVGRLLSSQR
ESTIMACTSCAEELERKAE^{EEEEEGGGGKGEKERE^{EEEEERR}QREK^{EEEEERRR}QEEERKR^{EEEE}}
KERRER^{EEEEERR}QREK^{EEEEQR}RE^{EEEEERR}RE^{EEEEEQ}EDGRGDEPKPRE^{EEEE}
GDWGERQIRLPRSLKKRFIGIKGRLSSG

Proteína de la Familia de las Cupinas

El término cupina (del latín *cupa*, pequeño barril) ha sido asignado a los dominios estructurales de barril β que han sido identificados en una superfamilia de proteínas que incluye muchas

enzimas, factores de unión a azúcares, proteínas de reserva y compuestos no enzimáticos que tienen uno o dos dominios de cupina.

La superfamilia de las cupinas se encuentra entre las familias de proteínas mas funcionales que se hayan descrito hasta la fecha, se ha propuesto que la estructura compacta de barril β hace que la base de cupina tenga muchas funciones, muchas de los cuales requieren termoestabilidad, resistencia a pepsina, etc. Dentro de la estructura conservada la variedad de funciones es provista por variaciones en los residuos del sitio activo y el tipo de metal que tiene unido (Dunwell, et. al., 2004). Las cupinas se pueden clasificar de la siguiente forma (Dunwell, et. al., 2000):

- *Monocupinas*: Dioxigenasas (2-Oxoglutarato dioxigenasa y Acireductona dioxigenasa), Germina (Oxalato Oxidasa EC 1.2.3.4) y Proteínas parecidas a la germina (GLP's), Fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8), Proteínas de unión a auxinas, Proteínas nucleares, Epimerasas, Monocupinas con multidominios (Factor de transcripción tipo AraC).

- *Bicupinas*: Dioxigenasas (Quercitina dioxigenasa EC 1.13.11.24, Gentisato 1,2-dioxigenasa EC 1.13.11.5, Homogentisato dioxigenasa EC 1.13.11.5, 1-hidroxi-2-naftoato dioxigenasa EC 1.13.11.38), Oxalato descarboxilasa (EC 4.1.1.2), Globulinas (proteína de reserva), Proteína de unión a sacarosa (proteína de reserva).

Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa

[*Hordeum vulgare*] NCBI **34787348**, SWISS PROT **P26517**
PM 25.3 KDa, pl 7.9

Secuencia (337 aa)

MGKIKIGINGFGRIGRLVARVALQSDDVELVAVNDPFITTEYMTYMFKYDTVHGHWKHSDIKLKD
DKTLLFGEKPVTVFGVRNPEEIPWGEAGADYVVESTGVFTDKDKAAAHKGGAKKVVISAPSKD
APMFVGVNEDKYTSVDNIVSNASCTTNCLAPLAKVINDNFGIIEGLMTTVHAITATQKTVDGPS
SKDWRGGRAASFNIIPSSTGAAKAVGKVLPELNGKLTGMSFRVPTVDVSVDLTVRTEKAASY
DDIKKAIKAASEGKLGIMGYVEEDLVSTDFVGDSRSSIFDAKAGIALNDHFVKLVSWYDNEWG
YSNRVVDLIRHMAKTQ

Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (G3PDH; EC 1.2.1.12)

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) juega un papel importante en la glucólisis y la gluconeogénesis porque cataliza reversiblemente la oxidación y fosforilación del D-Gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato. Esta enzima es un tetrámero de subunidades

idénticas, cada una contiene dos dominios funcionales conservados: un dominio de unión a NAD^+ y un dominio catalítico altamente conservado.

Se ha encontrado que la enzima está unida a actina y tropomiosina y que tal vez tenga un papel en el ensamble del citoesqueleto. El citoesqueleto proporciona una estructura para el adecuado posicionamiento de las enzimas glicolíticas, esto permite un eficiente transporte de metabolitos de una enzima a otra.

La G3PDH muestra diversas funciones no glicolíticas, dependiendo de su localización subcelular. La traslocación de la G3PDH al núcleo actúa como un mecanismo de señalización para iniciar la apoptosis. La acumulación de la G3PDH en el núcleo está involucrada en la inducción de apoptosis donde interviene en la activación de la transcripción. La presencia de esta enzima también está asociada con la síntesis de proteínas pro-apoptóticas como la BAX, c-JUN y la GAPDH por sí misma.

Dextrinasa Límite

[*Hordeum vulgare*] NCBI **2677837** SWISS PROT **O48541**
PM 99.1 KDa, pl 5.0

Secuencia (904 aa)

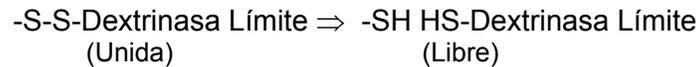
```
MAVGETGASVSAEAEAEATQAFMPDARAYWVTSDLIAWNVGELEAQSVCCLYASRAAAMSLS  
PSNGGIQGYDSKVELQPESAGLPETVTQKFPFISSYRAFKVPSSVDVASLVKQCQLVVASFGADG  
KHVDVTGLQLPGVLDLDMFAYTGPLGAVFSEDSVSLHLWAPTAQGVSVCFDDGPAGPALETVQL  
KESNGVWSVTGPREWENRYLYEVDVYHPTKAQVLKCLAGDPYARSLSANGARTWLVDINNE  
TLKPASWDELADEKPKLDSFSDITIYELHIRDFSAHDGTVDSDSRGGFRAFAYQASAGMEHLRK  
LSDAGLTHVHLLPSFHFAGVDDIKSNWKVDFECELATFPPGSDMQQAAVVAIQEEDPYNWGYN  
PVLWGVPKGSYASDPDGPSSRIIEYRQMVQALNRIGLRVVMVYVYHLDSSGPCGISSVLDKIVP  
GYVRRDTNGQIENSAAMNNTASEHFMVDRLIVDDLLNWAVNYKVDGFRFDLMGHIMKRTMTV  
KSALQSLTTDAHGVGDSKIYLYGEGWDFAEVARNQRGINGSQLNMSGTGIGSFNDRIRDAING  
GNPFGNPLQQGFNTGLFLEPNFYQGNEADTRRSLATYADQIQIGLAGNLRDYVLISHTGEAKK  
GSEIHTFDGLPVGYTASPIETINYVSAHDNETLFDVISVKTPMILSVDERCRINHLASSMMALSQG  
IPFFHAGDEILRSKSIDRDSYNSGDWFKLDFTYETNNWGVGLPPSEKNEDNWPLMKPRLNPN  
SFKPAKGHILAALDSFVDILKIRYSSPLFRLSTANDIKQRVRFHNTGPSLVPGVIVMGIEDARGES  
PEMAQLDTNFSYVVTVFNVCPHEVSMDIPALASMGFELHPVQVNSSDTLVRKSAYEAATGRFT  
VPGRTVSVFVEPRC
```

Dextrinasa Límite (EC 3.2.1.41)

La dextrinasa límite es una enzima desramificante que cataliza la hidrólisis de enlaces α 1 \rightarrow 6 de las dextrinas límite, productos de la degradación del almidón, liberando maltosa.

La dextrinasa límite existe en una forma libre y activa, así como bajo una forma soluble e inhibida (latente) que ya han sido descritas (Burton, et. al., 1999) parece estar parcialmente unida a materiales insolubles en la semilla pero puede ser activada en presencia de grupos

reductores. Dos hipótesis han sido propuestas para la liberación de la enzima. En la primera hipótesis se propone que agentes reductores como la L-Cisteína actúan sobre la dextrinasa límite reduciendo sus puentes disulfuro, esto implica que la dextrinasa límite tiene sulfhidrilos que requiere tener libres para su actividad.



En la segunda hipótesis se sugiere que una proteasa de sulfhidrilos es activada por agentes reductores a través de la reducción de puentes disulfuro o que mantiene su actividad al impedir la formación de puentes disulfuro, esta enzima libera o activa la dextrinasa límite por una modificación proteolítica (Longstaff y Bryc, 1993).

Globulina del embrión

[*Hordeum vulgare*] NCBI **167004** SWISS PROT **Q03678**
PM 72.3 KDa, pl 6.8

Secuencia (637 aa)

MATRAKATIPLLFLLLGTSLLLFAAAVSASHDDEDDRRGGHSLQQCVQRCRQERPRYSHARCVQE
CRDDQQQHGRHEQEEEQGRGRGWHGEGEREEEHGRGRGRHGEGEREEEHGRGRGRHGE
GEREEERGRGHGRHGEGEREEERGRGRGRHGEGEREEEGRGRGRRGEGERDEEQGDSR
RPYVFGPRSFRRRIQSDHGFVRALRPFQVSRLLRGIRDYRVAIMEVNPRAFVVPGFDTADGVG
YVAQGEGVLTVIENGEKRSYTVKEGDVIVAPAGSIMHLANTDGRRKLVIAKILHTISVPGKFQFLS
VKPLLASLSKRVLRAAFKTSDELERLRFNQRQGQEKTRSVSIVRASEEQLRELRRAAEGGQG
HRWPLPPFRGDSRDTFNLEQRPKIANRHGRLYEADARSFHALANQDVRVAVANITPGSMTAP
YLNTQSFKLAVVLEGEQIVCPHLGRESESEREHGKGRRREEEEDDQRQRRRGSESESE
EEEEQQRVETVRRARVSRGSAFVVPVPPGHPVVEISSSQGSSNLQVVCFEINAERNERVWLAGRN
NVIGKLGSPAQELTFGRPAREVQEVFRAQDQDEGFFVAGPEQQSREQEQEQRHRRRGDRGR
GDEAVETFLRMATGAI

Globulina del embrión

Durante el desarrollo de las semillas hay una acumulación masiva de reservas de nitrógeno y carbono en forma de proteínas que pueden ser usadas como una fuente de energía para la germinación del embrión. Las globulinas son proteínas de reserva que se encuentran en el embrión y representan una pequeña proporción del total de las reservas de proteínas de todo el grano.

En el caso de leguminosas, las globulinas consisten en dos grandes familias de proteínas que difieren en peso molecular y que se clasifican por su coeficiente de sedimentación en 7S (grupo de las vicilinas) y 11S (grupo de las leguminas), son holoproteínas formadas por subunidades.

Las globulinas 11S, son complejos hexaméricos de 320-400kDa compuestos por 6 subunidades diferentes (52-65kDa). Cada subunidad tiene un polipéptido ácido (pI 6.5) de 33-42kDa y un polipéptido básico (pI 9) de 19-23kDa unidos por un puente disulfuro.

Las globulinas 7S, se encuentran como complejos triméricos de 149-190kDa compuestos por 3 polipéptidos diferentes de 48-83kDa y no se encuentran unidos por puentes disulfuros.

Oxalato Oxidasa 2 (Precursor)

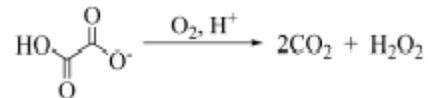
[*Hordeum vulgare*] NCBI **1171937**, SWISS PROT **P45851**
PM 39.4 KDa, pI 5.7

Secuencia (224 aa)

MGYSKTLAVSLFAVLLLAPAVLASDPDPLQ**DFCVADLD**GKAVSVNGHPCKPMSEAGDDFLFSS
KLAKAGNTSTPNGSAVTELD**VAEWPGTNTLGVS**MNRVDFAPGGTNPPHVHPRATEIGIVMKGE
LLVGILGSLDSGNKLYSRVVR**AGETFLIPR**GLMHFQFNVGKTEASMVVSFNSQNP GIVFVPLTLF
GSPPIPTPVLTKALRVEAGVVELLKSKFAAGF

Oxalato Oxidasa 2 (EC 1.2.3.4; OXO2)

La OXO2 cataliza la oxidación, dependiente de oxígeno, del oxalato a dióxido de carbono, reacción en la cual se forma peróxido de hidrógeno.



La OXO2 es comúnmente llamada germina y se trata de la proteína mejor caracterizada del grupo de las cupinas, en términos de bioquímica, función y patrones de expresión.

Estudios de peso molecular han demostrado que la enzima es inactiva como monómero y que forma complejos multiméricos. Aunque estudios de sedimentación y SDS-PAGE sugieren que se trata de homopentámeros, la cristalografía de rayos X demuestra que la enzima es un hexámero (Svedruzic, et. al., 2005).

La OXO tratada con β -mercaptoetanol pierde el 83% de su actividad catalítica en 5min. Esto sugiere que algunas cisteínas preservan la actividad catalítica de la OXO al mantener la integridad de su estructura terciaria mediante la formación de puentes disulfuro (Kotsira y Clonis, 1997).

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AG ₃	Ácido giberélico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CaM	Calmodulina
CAT	Catalasa
CoA	Coenzima A
DTT	Ditiotreitol
EROs	Especies reactivas de oxígeno
G3PDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
ICL	Isocitrato liasa
IEF	Isoelectroenfoque
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPG	Immobilized pH gradient
MG	Metilglioxal
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
MS	Espectrometría de masas
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
OKA	Ácido ocadaico
OXO	Oxalato oxidasa
PLC	Fosfolipasa C
RPE	Resonancia paramagnética electrónica
TCA	Ácido tricloroacético
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolio