



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL ÁCIDO ABCSÍCO EN EL
PROTEOMA MEMBRANAL DE LA ALEURONA DE
CEBADA TRATADA CON ÁCIDO GIBERÉLICO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A

ANA KARINA ELIAS PATIÑO



México, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente Irma Ofelia Bernal Lugo

Vocal Lucía Cornejo Barrera

Secretario Eleazar Martínez Barajas

1er. Suplente José Mariano García Garibay

2do. Suplente Armando Conca Torres

Lugar de trabajo Laboratorio 104 Edif. E, Departamento de Bioquímica. Facultad de Química, UNAM.

Asesor Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

Asesor Técnico M. en C. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Sustentante Ana Karina Elias Patiño

DEDICATORIA

A Papá Dios,
por su protección y amor.

A mis padres,
por su ejemplo y consejos.

Al flaco,
el amor de toda mi vida

AGRADECIMIENTOS

A papá Dios por todo lo maravilloso que ha puesto en mi camino, sin habérselo pedido. Por cuidarme cada día y escuchar mis oraciones.

A mis padres por su confianza depositada en mí, por su esfuerzo desmedido, su apoyo y amor. Gracias por propiciar la mejor de las herencias, el poder de tomar mis decisiones y construir un camino lleno de luz, amor y retos constantes.

A todos mis familiares y amigos, por apoyarme profesional y emocionalmente.

A Edgard Alejandro por inundar de amor mi corazón y enseñarme a ser paciente, persistente y fuerte, luchar con pasión para conquistar lo que quiero y necesito. Por estar a mi lado en cualquier situación y tener siempre un detalle, que me incita a seguir adelante.

A Vane y Rubencito por brindarme su tiempo y conocimientos, además de ser los guías técnicos en la realización de mi tesis, pero sobretodo por abrirme su corazón, hacer más divertida la estancia en el laboratorio y brindarme su amistad.

A todos lo que al compartir conmigo, pudieron entender que la sinceridad, la confianza y el cariño son la base para una hermosa amistad. Gracias por mostrarme que cada día tiene un momento de ocio, diversión y risas, estudio y desvelo, descanso, simpleza y muchos pequeños detalles. Deseo que esto perdure toda la vida. ¡L@S QUIERO AMIG@S!

A la Dra. Irma Bernal por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Por su paciencia y dedicación en esta investigación.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación y tesis, a través del proyecto 40599-Z. Así como al apoyo financiero de DGPA, UNAM y Facultad de Química a través de los proyectos PAPIIT-IN202806, UNAM y PAIP-FQ-6290-01, UNAM.

A la Q. Laurel Fabila por su asistencia técnica y compartir deliciosas tostaditas.

A todos mis profesores y compañeros de la facultad de Química, que guiaron mi conocimiento y compartieron sus experiencias para forjarme una opinión y tener una visión más amplia para el ámbito laboral.

A la UNAM por proporcionarme más que un aula de estudio, sino todo un hogar multidisciplinario, que me formó como profesionista y mejor persona.

ABREVIATURAS

ABA	ÁCIDO ABSCÍSICO
AG ₃	ÁCIDO GIBERÉLICO
ATP	ADENOSIN TRIFOSFATO
AXAH-I	ARABINOXILAN-ARABINOFURANO HIDROLASA
BLAST	BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL
CoA	COENZIMA A
DTT	DITOTREITOL
G3PDH	GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA
HSP	HEATSHOCK PROTEIN
ICL	ISOCITRATO LIASA
InsP3	INOSITOL-1,4,5-TRIFOSFATO
IPG	IMMOBILIZED pH GRADIENT
MnSOD	SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE MANGANESO
MS	ESPECTROMETRÍA DE MASAS
PLC	FOSFOLIPASA C
SDS	DODECIL SULFATO DE SODIO
TCA	ÁCIDO TRICLOROÁCETICO
2-D	DOS DIMENSIONES
6PGDH	6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
Sistema biológico	4
La aleurona	
Movilización de reservas	5
Fisiología y bioquímica de la movilización de reservas	
Regulación del proceso de movilización de reservas	
Señalización de ácido Giberélico y Abscísico en la síntesis de hidrolasas	8
Proteómica	11
ESTUDIOS PREVIOS	12
OBJETIVOS	13
Objetivo General	
Objetivos Particulares	
HIPÓTESIS	14
METODOLOGÍA	15
Material biológico	16
Preparación de las semillas	16
Cuantificación de proteína	17
Electroforesis 2-D	17
Comparación de patrones electroforéticos	18
Digestión y secuenciación de la proteína	19
Identificación <i>in silico</i> de las proteínas	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

El ácido giberélico (AG_3) regula la movilización de reservas en cebada, a través de estimular la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas en la aleurona, así como la degradación de proteínas de reserva (Jacobsen et al., 1988). El ácido abscísico (ABA) inhibe estas respuestas y al mismo tiempo induce otros cambios específicos de esta hormona (Bethke et al., 1997).

Con la finalidad de estudiar proteínas involucradas en la movilización de reservas, en este trabajo se identificaron proteínas inducidas por cada fitorregulador y el efecto antagónico de ABA en las proteínas inducidas por AG_3 . Para lo cual se compararon patrones electroforéticos 2-D de proteínas aisladas de aleuronas de semilla de cebada tratadas con ABA o con AG_3 . Así como con AG_3 y ABA de manera simultánea ($AG_3 + ABA$).

Entre las proteínas inducidas por AG_3 y que probablemente participan en la movilización de reservas se identificaron: proteínas antioxidantes (la superóxido dismutasa dependiente de manganeso; MnSOD), proteínas que participan en el ciclo del glioxilato (la Isocitrato liasa; ICL), proteínas de reserva (la globulina del embrión), proteínas que participan en la degradación de pared celular (la arabinoxilan-arabinofurano hidrolasa; AXAH-I) y proteínas reguladoras (una proteína perteneciente a la familia de las 14.3.3) que participan en diversos procesos metabólicos y fisiológicos.

Sorprendentemente, algunas de las proteínas que participan en la movilización de reservas están presentes en los tratamientos de ambos fitorreguladores, pero su intensidad en los patrones electroforéticos fue diferente. Tal es el caso de las proteínas que participan en las vías metabólicas como oxidación de la glucosa (la 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 6PGDH), glucólisis (la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; G3PDH), destoxificación de subproductos metabólicos tóxicos (la lactoilglutatin liasa), degradación o reforzamiento de pared celular (la glicosil hidrolasa u oxalato oxidasa 2), mantenimiento de funcionalidad y energía (la subunidad α de la ATP sintasa, la β -alanina sintasa), regeneración de metabolitos compatibles en el estrés (la aldehído deshidrogenasa, espermidina sintasa), proteólisis (protepsina) y regulación en la señalización (proteína con dominio C2).

Además se identificaron proteínas a las que no fue posible asumirles una función metabólica (dextrinasa límite y una proteína de la familia de las cupinas). Por otro lado, entre las proteínas inducidas por ABA se identificaron proteínas de respuesta a condiciones anaerobias (piruvato deshidrogenasa), proteínas auxiliares en la síntesis de biopolímeros (la amilogenina y la HSP70), proteínas que proveen energía y mantienen la funcionalidad del sistema en condiciones de estrés (la subunidad β de la ATP sintasa y la piruvato descarboxilasa).

INTRODUCCIÓN

En las semillas de cereales, las membranas celulares están involucradas de manera importante en la movilización de reservas a través de su participación en dos de las funciones inducidas por el ácido giberélico (AG_3) en la aleurona: síntesis de hidrolasas y secreción de diversas moléculas. También se sabe que la funcionalidad de las membranas se debe principalmente a las proteínas que la constituyen. Por lo que en el laboratorio se desarrolla un programa de proteómica que tiene como finalidad identificar proteínas membranales involucradas en la movilización de reservas.

En un proyecto realizado previamente, se localizaron 271 proteínas inducidas por AG_3 y 83 cuya intensidad disminuyó por el tratamiento con el mismo fitorregulador. De las primeras se identificaron las 10 más conspicuas (Zamudio, 2007). Con la finalidad de definir cuáles de las proteínas inducidas eran estimuladas por AG_3 y por tanto posiblemente involucradas en la movilización de reservas, se utilizó como herramienta al ácido abscísico (ABA). Este fitorregulador se utilizó debido a que inhibe los procesos que conducen a la movilización de reservas.

La estrategia fue generar los patrones electroforéticos-2D de las proteínas microsomales de aleuronas tratadas con ABA y con AG_3 y ABA simultáneamente (AG_3 +ABA). Estos patrones se compararon entre sí y con los generados del tratamiento con y sin AG_3 , elaborados por Zamudio (2007). Esto permitió localizar proteínas específicas de cada fitorregulador y aquellas que forman parte de la reorganización que el metabolismo del tejido debe sufrir para apoyar la acción fisiológica que evoca cada uno.

SISTEMA BIOLÓGICO

La aleurona

La aleurona está formada por una (avena, maíz, trigo) o varias (arroz, cebada) capas uniformes de células altamente diferenciadas. La capa de aleurona puede ser removida y desprendida del endospermo almidonoso. Este tejido aislado mantiene su viabilidad y funcionalidad. Las células de aleurona del grano de cebada maduro y seco están rodeadas por una pared gruesa, rica en hemicelulosa. El citoplasma de estas células se caracteriza por sus numerosas vacuolas de almacenamiento (PVS; figura 1) que contienen proteínas de reserva y complejos cristalinos de minerales como fosfato (PO_4^{3-}), potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}) y calcio (Ca^{2+}) asociados al ácido fítico. Otro de los organelos en este compartimento son los cuerpos lipídicos u oleosomas, los cuales son muy abundantes (ocupan el 30% del volumen) y contienen las reservas de lípidos neutros. Los oleosomas se encuentran unidos al retículo endoplásmico, del cual se originan, y a la superficie de las PVS. Las células de aleurona también contienen numerosos glioxisomas que presentan actividad (Bethke et al., 1997).

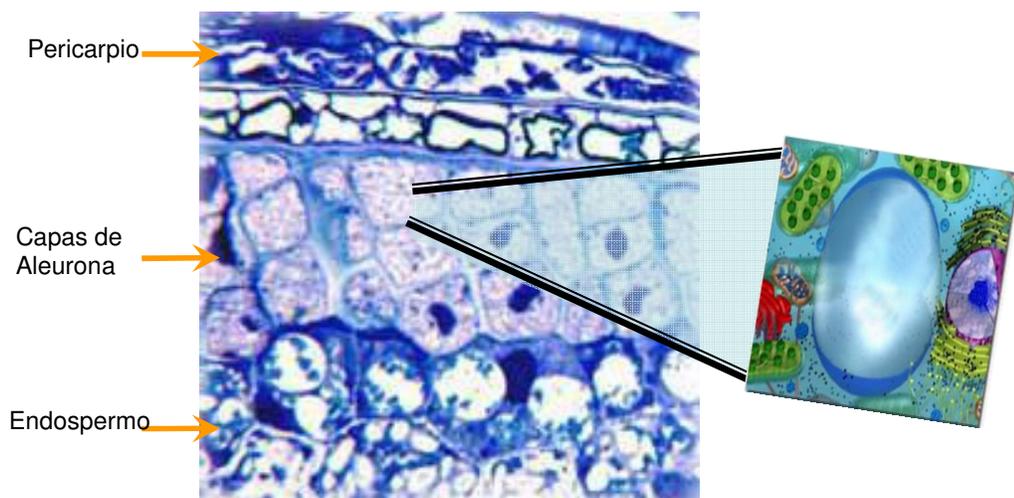


Figura 1. Capas de aleurona de la semilla de cebada y acercamiento de la estructura celular.

MOVILIZACIÓN DE RESERVAS

Fisiología y bioquímica de la movilización de reservas

Durante el desarrollo de la semilla, ésta acumula reservas, las cuales se almacenan en forma de proteínas, polisacáridos, lípidos y minerales en el endospermo y en la aleurona (Lovegrove y Hooley, 2000). Durante la germinación, las reservas de estos compartimentos son degradadas. Los productos de esta degradación son utilizados en la aleurona para la síntesis de hidrolasas; mientras que los del endospermo son transportados hacia el escutelo para la nutrición y el crecimiento del embrión (Bethke et al., 1997). Trabajos anteriores demuestran que algunas reservas de la aleurona son secretadas al endospermo y se propone, aunque no está demostrado, que también son sustratos para el crecimiento del embrión (Caspers et al., 2001). La hidrólisis y la difusión de las reservas hacia el embrión, para proveer energía y nutrimentos necesarios para su desarrollo, constituyen el proceso de movilización de reservas (Jacobsen et al., 1988).

Regulación del proceso de movilización de reservas.

La hidrólisis de las reservas es la fase del proceso de movilización que está finamente regulado por fitohormonas como el ácido giberélico (AG_3). Éste es un tipo de giberelina, que se distingue por tener como estructura, un ácido carboxílico diterpenoide tetracíclico con un grupo hidroxilo como sustituyente en cada radical (R1 y R2; figura 2). El AG_3 es sintetizado *de novo* por el escutelo (Chen et al., 1997) y difunde hacia la aleurona. El fitorregulador estimula a las células de la aleurona para sintetizar *de novo* enzimas hidrolíticas (como α -amilasa, β -amilasa, glucosidasa, etc.; Skadsen, 1998). Éstas participan en la ruptura del almidón, proteínas, lípidos y paredes celulares del endospermo almidonoso (figura 3). También, el AG_3 regula la secreción de las hidrolasas, así como otras enzimas y moléculas de bajo peso molecular (Caspers et al., 2001).

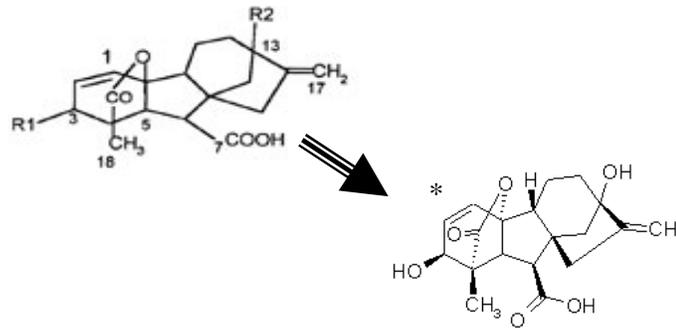


Figura 2. Estructura química del ácido giberélico* (AG_3).

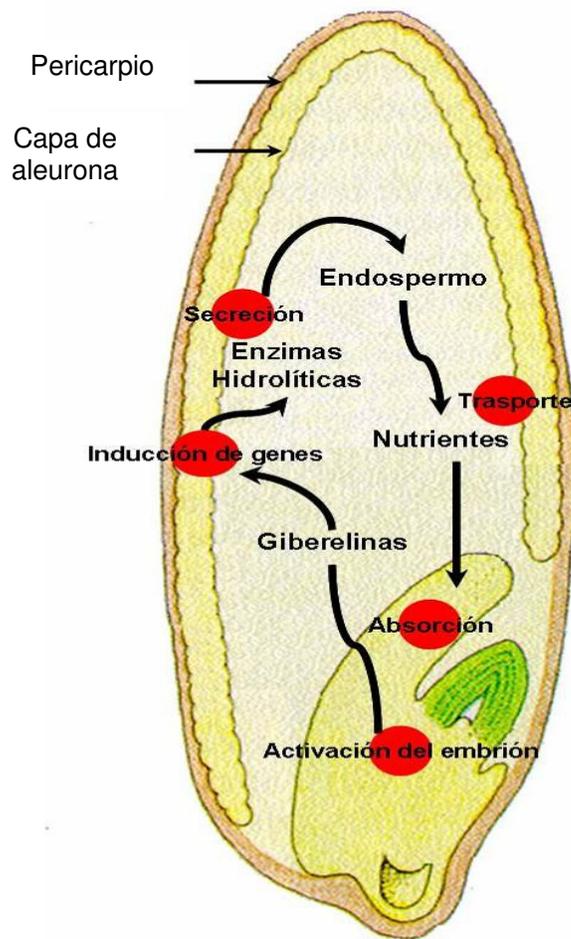


Figura 3. Esquema de la movilización de reservas en la semilla.

Además de estos cambios bioquímicos, el AG₃ induce modificaciones estructurales en los organelos de la aleurona. En presencia del AG₃ la velocidad de fusión de las PVS, para la formación de una gran vacuola central se incrementa. Asimismo, las proteínas de reserva que se encuentran en estas vacuolas comienzan a hidrolizarse suministrando aminoácidos, utilizados en la síntesis de las hidrolasas. Mientras que los minerales de los complejos cristalinos son liberados por las fitasas, enzimas cuya actividad también es regulada por AG₃. El retículo endoplásmico está altamente organizado como sacos aplanados llenos de ribosomas (característico de un sistema secretor). El aparato de Golgi es prominente, incrementado tanto el tamaño de las cisternas como el número de vesículas asociadas a él (Bethke et al., 1997).

Debido a que, como antes se mencionó, la capa de aleurona puede ser removida y desprendida del endospermo almidonoso sin perder su viabilidad y funcionalidad, este tejido se ha establecido como un sistema modelo para el estudio de la regulación hormonal (Gilroy y Jones, 1994). Existe evidencia de que tanto en la percepción del AG₃, como en la biosíntesis y secreción de las enzimas inducidas por este fitorregulador, participan las membranas celulares. En particular, en la membrana plasmática se lleva a cabo la percepción y en las endomembranas, la biosíntesis y secreción (Jones y Jacobsen, 1990; Hooley et al, 1991).

Estos efectos biosintéticos y secretores son inhibidos por el ácido abscísico (ABA). El ABA es un sesquiterpenoide (15 carbonos; figura 4) derivado de la ruta de ácido mevalónico.

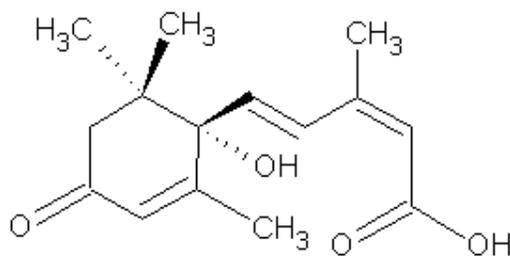


Figura 4. Estructura química del ácido abscísico (ABA).

A lo largo de toda la vida de la planta, el ABA controla diversos procesos fisiológicos (estrés abiótico, Finkelstein et al., 2002; acumulación de reservas, Grill y Himmelbach, 1998). En este trabajo se exploró su efecto inhibitorio sobre la germinación (Merlot y Giraudat, 1997). Esta inhibición se establece tanto a nivel de la aleurona como del embrión. En el primer tejido inhibe la síntesis y secreción de hidrolasas con lo cual no se realiza la movilización de reservas (Jacobsen y Chandler, 1988). Mientras que en el segundo, inhibe la elongación (Domash et al., 2006) del eje embrionario.

Señalización de ácido giberélico y abscísico en la síntesis de hidrolasas

La interacción entre los fitorreguladores, AG_3 y ABA, constituye un factor de control importante desde la formación hasta la germinación de la semilla ya que muchos de sus efectos son antagónicos (Bethke et al., 1997). Se ha propuesto que la membrana plasmática de la aleurona posee los receptores para ambos fitorreguladores (figura 5; Lovegrove y Hooley, 2000). El mecanismo de percepción y unión de ambos fitorreguladores al receptor, es independiente. Cuando ambos receptores se encuentran ocupados por su ligando, la respuesta del AG_3 es inhibida por ABA. En la figura 5 se observan dichos eventos marcados por una cruz roja, indicando la inhibición por ABA. Una de las respuestas rápidas del AG_3 (2-5 min) en este sistema es el incremento en la concentración de calcio citoplásmico ($[Ca^{2+}]_i$). El cual proviene, tanto del calcio externo como de los reservorios internos (Bethke et al., 1997).

A continuación se describe el mecanismo propuesto para la transducción de señales dependientes de AG_3 . El primer componente de la cascada de señales que se activa en respuesta al AG_3 es la proteína G heterotrimérica la cual una vez activada interacciona con la fosfolipasa C (PLC), en la membrana plasmática, activándola. La acción de la PLC resulta en la producción del inositol-1,4,5-trifostato (InsP3) que rápidamente se difunde a otras partes de la célula, uniéndose y activando a los transportadores endomembranales de calcio. Con lo cual, el calcio secuestrado en el

retículo endoplásmico y la vacuola (Bush et al., 1993) se libera produciendo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Además de esta fuente interna de calcio se activa el canal de calcio de la membrana plasmática con lo cual el calcio externo también contribuye al incremento en la concentración de este ión, en el citoplasma. Esta alta concentración de calcio actúa como un segundo mensajero que activa proteínas cinasas y proteínas fosfatasa que a su vez modulan la actividad de enzimas o transportadores requeridos para la síntesis y secreción de hidrolasas como α -amilasa, proteasas, nucleasas y enzimas que degradan la pared celular (Chen et al., 1997).

El mecanismo de inhibición por ABA se caracteriza por la activación de una Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, lo que previene el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por AG_3 . Además el ABA estimula la síntesis de una proteína serina/treonina cinasa, PKABA1, la cual suprime la inducción de la α -amilasa (metaloenzima que requiere de Ca^{2+} para su actividad y estabilidad enzimática; Bush et al., 1993; Kashem et al., 2000) y otras enzimas hidrolíticas (figura 5; Gómez-Cadenas et al., 2001). Otro parámetro fisiológico que ABA modifica es el pH citoplásmico. Éste se incrementa en 0.14 unidades, mientras que el AG_3 lo disminuye en 0.18 unidades. Cuando ambos fitorreguladores se adicionan simultáneamente el pH no varía significativamente. Este bloqueo en el cambio de pH parecería estar involucrado en el antagonismo del ABA en la respuesta inducida por AG_3 .

Algunos otros elementos de señalización que se encuentran río abajo ya han sido descritos, pero dado que el efecto antagónico del ABA no los involucra, se decidió no describirlos.

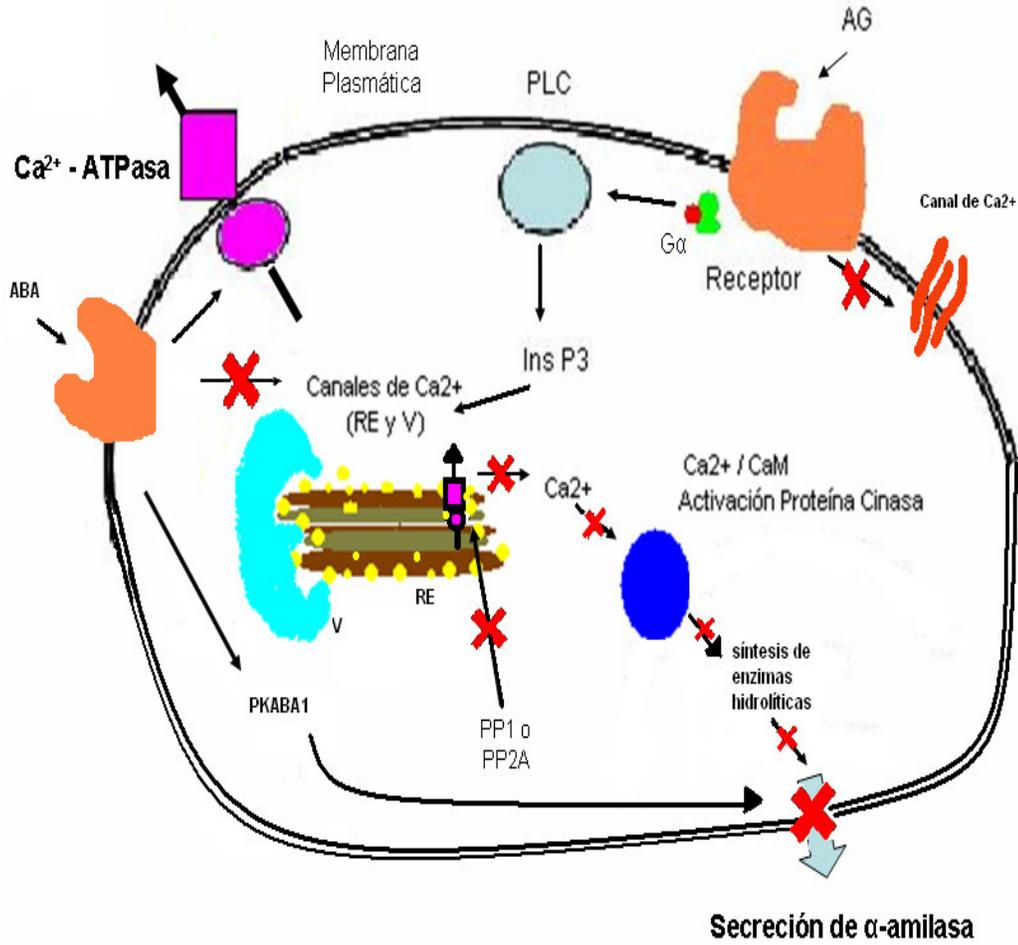


Figura 5. Modelo de la señalización inducido por los fitoreguladores AG_3 y ABA en células de aleurona. $G\alpha$, subunidad α de una proteína G; PLC, fosfolipasa C; $InsP_3$, inositol-1,4,5-trifosfato; RE, retículo endoplásmico; V, vacuola; PP1, fosfoproteína fosfatasa 1; PP2A, fosfoproteína fosfatasa 2 A; PKABA1, proteína cinasa.

✗ Representa los eventos inhibidos por ABA en aleuronas de cebada tratadas con AG_3 .

PROTEÓMICA

El *proteoma* es el conjunto de proteínas expresadas por un organismo (o por un tejido, en este caso la aleurona) bajo ciertas condiciones. Tiene un carácter dinámico: la expresión de proteínas experimenta numerosas modificaciones en las diferentes etapas del desarrollo del organismo; así como también en respuesta a estímulos externos. Al conjunto de herramientas que se utilizan para estudiar los proteomas se le denomina proteómica.

A diferencia de las técnicas clásicas utilizadas en la bioquímica, la proteómica se basa en la separación, localización y cuantificación de la magnitud en los cambios de muchas proteínas, de manera simultánea; y su posterior identificación. Para lograr lo anterior, las proteínas se separan por electroforesis bidimensional. Iniciando con una separación por punto isoeléctrico (pI; gradientes de pH) y posteriormente con una separación por peso molecular (PM; SDS PAGE). Las proteínas obtenidas en estas separaciones son cortadas de los geles, digeridas y analizadas por espectrometría de masas (MS). La identidad de las proteínas se consigue comparando las secuencias de aminoácidos obtenidas de MS contra una base de datos pública (NCBI y ExPASy/SWISS PROT). Para confirmar la identidad de las proteínas, se realizan diversas pruebas, entre las que se encuentra la caracterización de su actividad biológica (Castellanos et al., 2004). Una manera de establecer las diferencias en el patrón de expresión proteico entre diversas condiciones es comparar los proteomas obtenidos en cada condición

ESTUDIOS PREVIOS

El subproteoma microsomal de la aleurona está constituido por 271 proteínas que son inducidas por AG_3 y 83 que disminuyen su intensidad (Zamudio, 2007). Con la finalidad de identificar en este subproteoma, algunas de las proteínas involucradas en la movilización de reservas, se utilizó como herramienta al ABA, ya que algunos de los procesos que conducen a la movilización de reservas son inhibidos por este fitorregulador. De forma tal que los cambios observados en el subproteoma del AG_3 , estarían ausentes en el subproteoma de $AG_3 + ABA$. Asimismo, en el subproteoma de ABA se localizarían los cambios específicos de este fitorregulador además de los compartidos con AG_3 .

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar proteínas del subproteoma microsomal de aleuronas de cebada que pudieran estar involucradas en la movilización de reservas.

Objetivos Particulares

- A) Detectar e identificar algunas de las proteínas microsomales inducidas por AG_3 y por ABA en aleuronas de cebada.
- B) Definir si las proteínas identificadas en A se encuentran o no presentes en los patrones electroforéticos 2-D obtenidos de microsomas aislados de aleuronas tratadas con $AG_3 + ABA$.
- C) Cuantificar la magnitud del cambio, si existe alguno, en los patrones electroforéticos de A.
- D) Sugerir los procesos metabólicos comunes y específicos para cada fitorregulador.

HIPÓTESIS

La movilización de reservas es regulada antagónicamente por AG_3 y ABA. Por lo que la comparación de los subproteomas microsomaes aislados de tejido tratado con o sin estos fitorreguladores y su combinación, permitirá identificar proteínas involucradas en dicho proceso fisiológico.

METODOLOGÍA

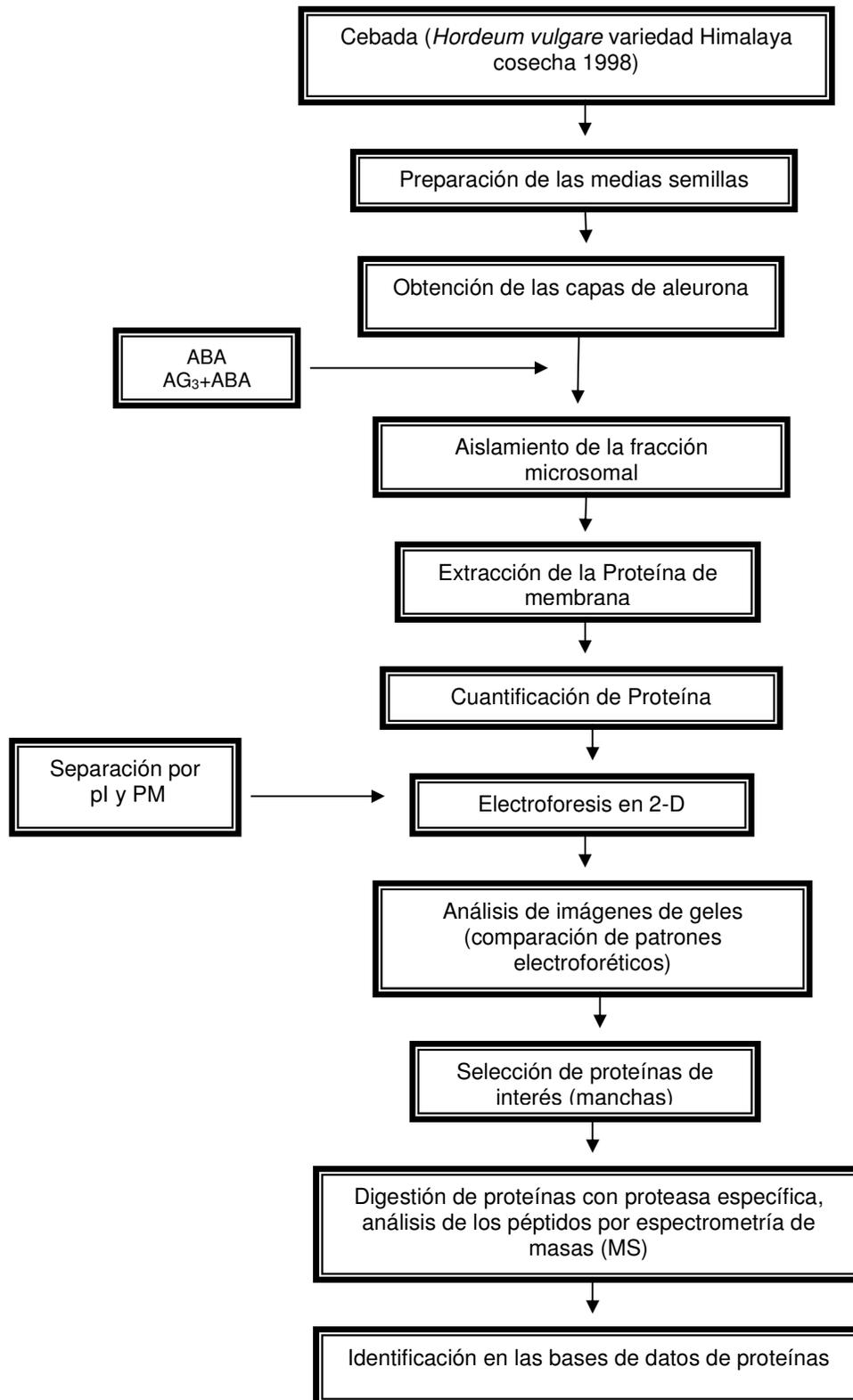


Figura 6. Metodología General de la investigación.

Material biológico

Se utilizó semilla de cebada *Hordeum vulgare*, variedad Himalaya cosecha 1998, obtenidas del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA, almacenadas a 40% de H.R. y 4°C.

Preparación de las semillas

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

Imbibición: Se colocaron las medias semillas en cajas petri con dos círculos de papel filtro estéril humedecidos con 20 ml de agua estéril y antibióticos (Estreptomicina 20 µg / ml y Cloranfenicol 20 µg / ml). Se incubaron a 25°C por 96 h.

Obtención de capas de aleurona: Al término de este tiempo, se eliminó el endospermo almidonoso con la ayuda de dos espátulas en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

Inducción hormonal: Se colocaron las aleuronas en matraces de 125 ml estériles (400 aleuronas / matraz) y se incubaron en 25 ml de solución amortiguadora de incubación (ácido succínico 20 mM pH 5.0, CaCl₂ 20 mM) más ABA (50 µM) con y sin AG₃ (5 µM) por 3 h a 25°C.

Aislamiento de la fracción microsomal: Después de este tiempo de incubación, la solución amortiguadora de incubación se decantó y con papel absorbente se eliminó la humedad en exceso de las capas de aleurona. Las capas de aleurona se homogeneizaron en un mortero con 25 ml de solución amortiguadora de homogeneización 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) y un poco de arena. El homogeneizado se filtró a través de 6 capas de gasa absorbente (de hilo de algodón con tejido de 12 x 20) y se centrifugó a 10,000 rpm a

4°C por 10 min con rotor SL-50T en una Centrífuga Sorvall Super T21. Se colectó el sobrenadante en tubos de ultracentrífuga (Centrifuge Bottles Polycarbonate with Cap Assemblies Beckman, Cat. BC355618) previamente fríos y se centrifugó a 55,000 rpm a 4°C por 1 h en una Ultracentrífuga Beckman XL-100K en un rotor 60Ti (Maya, 1997).

Extracción de proteína membranal: El sobrenadante resultado de esta centrifugación se descartó y la pastilla se resuspendió en 200 µl de solución amortiguadora de resuspensión (Tris-HCl 5 mM pH 7.0, EGTA 1 mM, CHAPS 2% y urea 4 M). La muestra se agitó en un vórtex y se centrifugó en una microfuga a 14,000 rpm a 4 °C por 10 min. El sobrenadante se colectó en un tubo eppendorff y la pastilla se re-extrajo con otros 250 µl de solución amortiguadora de resuspensión. Se repitió la centrifugación y se colectaron los sobrenadantes en el mismo tubo (Maya y Bernal, 2006).

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 500 µg de proteína con TCA al 10% en acetona. Se centrifugó la proteína durante 15 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados de la muestra con 500 µl de acetona cada uno. Se disgregó la pastilla, centrifugando y decantando el sobrenadante. La muestra se secó completamente evaporando la acetona residual.

Las muestras se solubilizaron en una solución rehidratante (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, solución amortiguadora 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 (primera dimensión) 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, las tiras fueron guardadas en plástico adherente -80°C . Para el gel de segunda dimensión (separación por peso molecular, PM) las tiras de gel se sacaron de -80°C y se dejaron descongelar. Una vez descongeladas se incubaron en tubos de ensaye de 25 mL con 10 mL de solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y 1% de azul de bromofenol) adicionado con DTT 10 mg/ml y se agitó en un agitador orbital durante 15 min. Pasado este tiempo, la solución se decantó y se le adicionaron 10 mL de solución amortiguadora de equilibrio conteniendo iodoacetamida 25 mg / ml. Este tratamiento también se realizó con agitación durante 15 minutos. Subsecuentemente, las tiras hidratadas fueron colocadas horizontalmente en un gel de Tris-glicina SDS poliacrilamida (15%). La electroforesis del SDS-PAGE se realizó en una cámara de electroforesis vertical (Slab Gel Electrophoresis Unit SE600 Hoeffer) aplicando 30 mA por 15 minutos y 60 mA por 4.75 h. El gel 2-D se tiñó con una solución de azul de Coomassie coloidal (Bradford, 1976) por tiempo variable según la cantidad de proteína en el gel.

Tabla 1. Preparación de Gel de acrilamida (15%).

Descripción	Volumen
acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%	40.0 ml
solución F (Tris HCl 1.5 M pH 8.8)	20.0 ml
SDS 10%	0.8 ml
H ₂ O	18.8 ml
persulfato de amonio 10%	400 μl
TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina)	26.4 μl

Análisis de imágenes de geles (Comparación de Patrones electroforéticos)

Las imágenes de los patrones de manchas de proteínas (spots) de los geles se adquirieron con un equipo Fluor-S Multiimager (Bio-Rad). Para identificar los cambios en el patrón de proteínas entre las diferentes condiciones experimentales se utilizó el

programa Quantity One Software, PD-QUEST (Bio-Rad). Las manchas que se presentaron diferencialmente de forma cuantitativa o cualitativa entre ambos geles se seleccionaron y se recortaron pequeños cilindros de gel conteniendo dichas proteínas.

Digestión de la proteína y Secuenciación por Espectrometría de masas (MS)

Para la digestión y secuenciación (Ms/Ms-MALDITOF) de las manchas seleccionadas se solicitó el servicio de la Unidad de Proteómica de la Universidad de Missouri y de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Identificación por comparación con las bases de datos de proteínas

La identificación de las proteínas se realizó *in silico* por medio de la comparación de las secuencias parciales obtenidas o del espectro de masas, en dos de las bases de datos públicas; NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y ExpASY/SWISS PROT (<http://au.expasy.org/sprot/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las proteínas membranales de la aleurona participan en la elaboración de la respuesta al AG_3 y con esto en la movilización de reservas durante la germinación (Hooley et al., 1991; Gilroy y Jones, 1994).

Estudios recientes de proteómica han demostrado que el AG_3 modifica la composición proteica de los microsomas aislados de aleurona de cebada. Algunas de estas proteínas son enzimas y su presencia se induce con el tratamiento hormonal mientras que en otros casos, el tratamiento sólo incrementa o disminuye su intensidad, respecto a la detectada en la aleurona sin tratamiento alguno ($-AG_3$) o bien, modifica su estado REDOX (Maya y Bernal, 2006; Zamudio, 2007). Sin embargo, no se ha determinado si alguna de estas proteínas participa de manera directa en la movilización de reservas.

Para lograr este objetivo se pueden emplear cuando menos dos estrategias: la primera, utilizar aleuronas que muestren una menor respuesta al AG_3 y la segunda utilizar como herramienta el tratamiento con ABA que tiene un efecto antagónico sobre el AG_3 (Bethke et al., 1997). La primera estrategia se exploró utilizando aleuronas aisladas de semillas que presentaban solo el 50% de la respuesta al AG_3 , cuantificada como actividad de α -amilasa. Desafortunadamente, en este sistema no fue posible obtener los patrones electroforéticos, debido a que la composición de la muestra no permitió el enfoque adecuado de las proteínas (Zamudio, 2007). Por tanto no fue posible identificar cambios cualitativos o cuantitativos respecto de su control. En este trabajo, se desarrolló la segunda estrategia. Inferimos que los cambios cualitativos y cuantitativos inducidos por AG_3 , en algunas de las proteínas, serían revertidos por ABA cuando los microsomas se obtuviesen de aleuronas tratadas con $AG_3 + ABA$. Identificando así, proteínas que responden específicamente al tratamiento con AG_3 , que podrían participar en la movilización de reservas, así como proteínas comunes a los tratamientos con AG_3 y ABA. En otros tejidos, ambos fitorreguladores afectan procesos metabólicos comunes, como son la síntesis de proteínas, el metabolismo de carbohidratos, la remodelación de la pared celular, etcétera, por lo que

planteamos la hipótesis que el efecto de ambos fitorreguladores sobre la movilización de reservas acumuladas en las semillas de cebada, puede ser el resultado de efectos antagónicos sobre procesos metabólicos comunes. Con la comparación de los patrones electroforéticos 2-D de aleuronas tratadas con ABA y las tratadas con o sin AG₃ o con la mezcla de ambos fitorreguladores, se pueden identificar proteínas pertenecientes a dichos procesos.

En la figura 7, se pueden observar las imágenes digitalizadas de los patrones electroforéticos de proteínas membranales aisladas de aleurona de semilla de cebada, obtenidas en los diversos tratamientos.

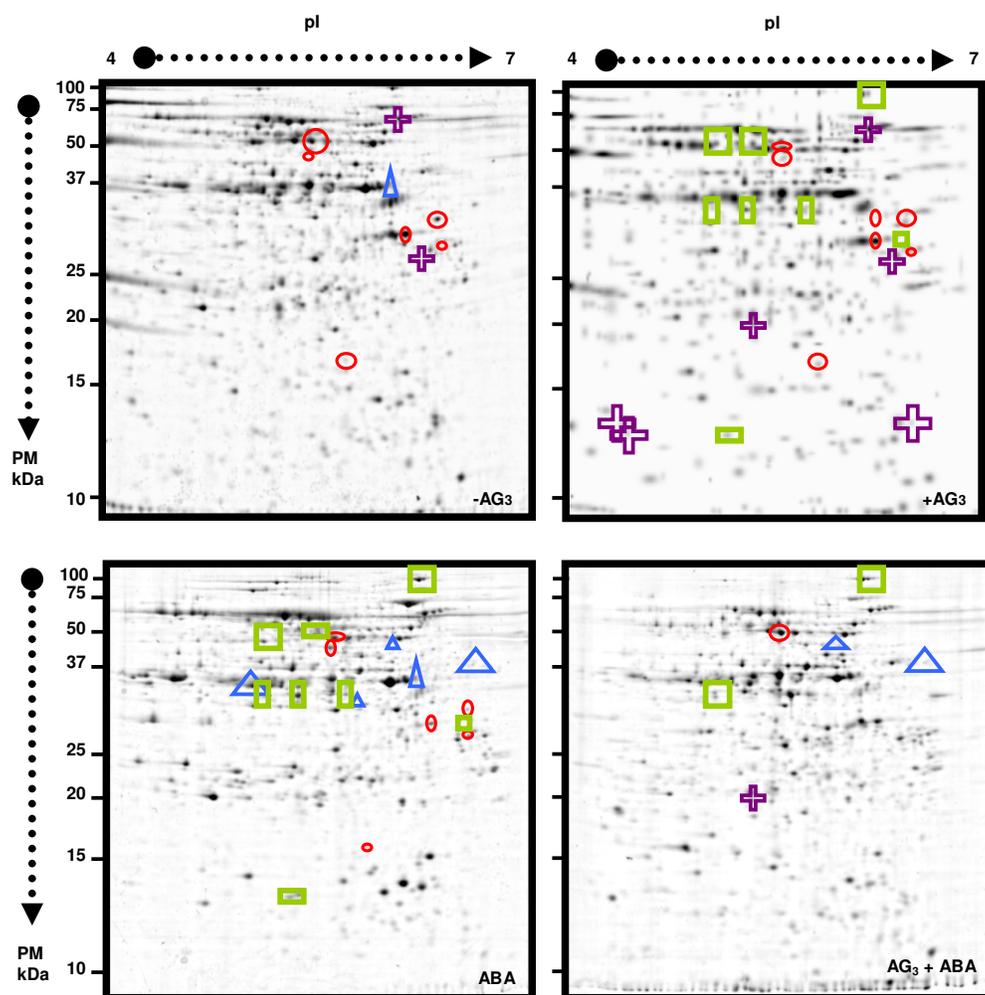


Figura 7. Patrones electroforéticos de proteínas membranales aisladas de aleuronas incubadas por 3h en presencia de AG₃, ABA, AG₃+ABA o ningún fitorregulador (control;-AG₃). PROTEÍNAS ESPECÍFICAS; Cruces moradas: Proteínas de AG₃; Triángulos azules: Proteínas de ABA; PROTEÍNAS COMUNES; Cuadros verdes: Proteínas inducidas por ambos fitorreguladores de manera independiente; Círculos rojos: Proteínas pertenecientes al subproteoma constitutivo modificadas por los fitorreguladores.

De las proteínas detectadas en dichos patrones, se seleccionaron 14, en función de su intensidad relativa y su presencia en la mayoría de los geles, además de estar aislada de otras proteínas para poder recortarla, sin problema de contaminación o mezcla de la muestra. Otras 10 proteínas detectadas, secuenciadas e identificadas anteriormente (Zamudio, 2007) también fueron incluidas en este trabajo para su análisis.

Con ayuda del programa PD-QUEST, se realizó el análisis cualitativo, comparando los patrones electroforéticos de cada tratamiento. De las proteínas localizadas, aquellas que no fueron detectadas en el tratamiento control (-AG₃), las consideramos inducidas o que modifican su intensidad por AG₃ (cruces moradas) o por ABA (triángulos azules). Mientras que las proteínas presentes en ambos fitorreguladores, ya sea inducidas (cuadros verdes) o constitutivas (círculos rojos), pero con distinta intensidad, las consideramos comunes (figura 7).

Tabla 2. Clasificación de las proteínas aisladas según su comportamiento.

Inducción y Abundancia de las proteínas en los diversos tratamientos				
No. ID	-AG ₃	+AG ₃	ABA	AG ₃ +ABA
4		X		
5		X		
25		X		
14		0.08*		0.18*
49	0.053*	0.32*		
50	0.046*	0.27*		
74			X	
78			X	
82			0.071*	0.22*
84			0.081*	0.05*
71	0.094*		0.86*	
13		0.56*	0.25*	
17		1.9*	1.7*	
10		0.37*	0.28*	
15		0.21*	0.84*	
16		0.27*	2.2*	
24		0.54*	0.26*	
12		0.34*	0.09*	0.26*
22		0.14*	0.23*	0.51*
67	1.75*	2.6*	0.22*	
48	0.9*	0.9*	0.1*	
70	0.05*	0.1*	0.3*	
72	0.014*	0.02*	0.09*	
19	0.9*	0.18*	3.05*	1.91*

■ Tratamiento del cual se aislaron e identificaron por secuenciación las proteínas
 * Intensidad relativa de la mancha de proteína en el subproteoma

El análisis cuantitativo se realizó de forma independiente, con el programa antes mencionado, para cada tratamiento, utilizando las intensidades relativas de las manchas seleccionadas y calculando el porcentaje que cada una de estas representaba del total. Finalmente, se compararon los porcentajes de intensidad entre los distintos tratamientos (tabla 2).

En la tabla 3 se muestran los tratamientos de donde se seleccionaron las proteínas para su secuenciación. En esta tabla, también se puede observar que dos manchas semejantes, en su posición (pI y pM), fueron aisladas de distintos tratamientos y secuenciadas, tal es el caso de la proteína 22 y la 48.

Tabla 3. Aislamiento de las proteínas para su secuenciación.

No. ID	Tratamientos			No. ID	Tratamientos		
	+AG ₃	ABA	AG ₃ +ABA		+AG ₃	ABA	AG ₃ +ABA
4	X			49	X		
5	X			50	X		
10	X			48	X	X	
12	X			67		X	
13	X			70		X	
14	X			71		X	
15	X			72		X	
16	X			74		X	
17	X			78		X	
22	X		X	82		X	
24	X			84		X	
25	X			19			X
X Proteínas idénticas aisladas en distintos tratamientos							

Una vez obtenidas las secuencias de los oligopéptidos, de cada proteína, estas se identificaron utilizando las bases públicas de datos. En la tabla 4 se muestran los dos conjuntos de proteínas secuenciadas e identificadas, las que fueron identificadas por Zamudio (2007) y las obtenidas en este trabajo. Sólo para estas últimas se muestran todos los parámetros.

Tabla 4. Identificación de las proteínas *in silico*.

No. ID	Proteína	Exp PM(kDa)/ pI	Teo PM(kDa)/pI	No. Acceso	Secuencia	Valor / ε
4	Mn Superóxido Dismutasa glioisomal (MnSOD)	**	**	**	**	**
5	Isocitrato liasa (ICL)	**	**	**	**	**
10	20S proteasoma (sub B)	**	**	**	**	**
12	β- alanina sintasa	**	**	**	**	**
13	glicosil hidrolasa	73.5/4.8	114.44/5.84	NCBI 108864437 Swiss Prot Q2R3E0	+	1956/0.0
14	Proteína de la Fam. Cupinas	**	**	**	**	**
15	Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (G3PDH)	**	**	**	**	**
16	lactoilglutación liasa	**	**	**	**	**
17	subunidad α ATP sintasa	72.9/5.1	55.56/5.70	NCBI 81176509 Swiss Prot Q332R4	+	984/0.0
22	dextrinasa limite	**	**	**	**	**
24	precursor Oxalato oxidasa 2	**	**	**	**	**
25	globulina de embrión	**	**	**	**	**
49	isoenzima I arabinoxilan arabinofurano hidrolasa (AXAH-I)	81.1/5.6	72.56/5.05	NCBI 13398412 Swiss Prot Q9ATV8	+	1295/0.0
50	14.3.3	33.5/5.8	29.36/4.83	NCBI 100554 Swiss Prot P29305	MGDYGLFQLNSR Mascot	508/E-143
48	Prot. Con dominio C2	44.6/5.8	32.68/5.58	NCBI 61889374 Swiss Prot Q5DVL6	LDVVHADAADGKPLVESAR LVVPLPPSTAR YYDPSYPPPYEQSAR YEVEVTVTNR	259/8E-68

No. ID	Tabla 4 Continuación... Proteína	Exp PM(kDa)/ pI	Teo PM(kDa)/pI	No. Acceso	Secuencia	Valor / ε
67	cadena A de profitepsina	36.3/5.7	51.93/5.28	NCBI 5822248 Swiss Prot P42210	+	946/0.0
70	6 –fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)	65.1/5.2	53.31/5.92	NCBI 3342800 Swiss Prot O81237	+	961/0.0
71	Subunidad E1 β Piruvato Deshidrogenasa	53.1/5.6	40.23/5.56	NCBI 3851001 Swiss PProt Q9ZQY2	MAVPQVDDIVR Mascot	729/0.0
72	espermidina sintasa	43.9/5.7	34.79/4.95	NCBI 49425361 Swiss Prot Q4LOW6	QFPHLAVGFEDPR Mascot	625/E-178
74	amilogenina	50.7/4.8	39.24/6.19	NCBI 4158230 Swiss Prot Q9ZR34	SDIDGLLGATTINFSGHSCR TAVTVDDCVKELAGIVK Mascot	715/0.0
78	piruvato descarboxilasa	45.1/5.4	65.76/5.53	NCBI 115452421 Swiss Prot P51848	VPEGHPLQGEANEPLR VALGLPFFPR	1160/0.0
82	sub β ATP sintasa	67.7/5.5	59.33/5.56	NCBI 525291 Swiss Prot Q41534	+	1011/0.0
84	HSP 70	57.4/6.0	71.93/5.30	NCBI 115452237 Swiss Prot Q10NA1	MDKTQVHELVLVEESTR	1135/0.0
19	Aldehído Deshidrogenasa	69.8/5.4	59.28/6.25	NCBI BAB62757.1 Swiss Prot Q93X16	SGVDSGATLVTGGDK VGPALACGNTIVLK TAEQTPLSALYVSK RANASQYGLAAGVFTNNLDTANTLTR IAQEEIFGPVQSIFK LLHEAGLPEGVLNIISGFGPTAGAALAGHMDVDK	1003/0.0

** Véase Zamudio, 2007.
+ Identidad obtenida por comparación de espectros en la base de datos de Mascot

Las proteínas aisladas de distintos tratamientos pero en la misma posición (PM y pl) resultaron ser la misma proteína al identificarlas *in silico*. Tal es el caso de la dextrinasa límite y la proteína con dominio C2. Por tanto, se asumió que las proteínas que compartían PM y pl en los distintos tratamientos también tendrían la misma identidad.

Obsérvese que el PM y pl determinados experimentalmente, son mayores o menores que los valores teóricos reportados (tabla 4). Es posible que sean fragmentos de proteínas en formación, obtenidas del RE o de una actividad proteolítica específica del sistema. También estas diferencias podrían deberse a un error en la alineación de los geles al determinar estos parámetros.

Por todo lo anterior, las proteínas propuestas como candidatas a participar en la movilización de reservas, son las proteínas identificadas consideradas como específicas de AG₃, debido a que fueron inducidas o modificadas en intensidad por este fitorregulador y este efecto fue revertido por ABA. Así como aquellas constitutivas revertidas por ABA. En el grupo de las proteínas comunes, también se pudieron detectar proteínas que participan en la movilización de reservas, aunque no de manera específica (tabla 5).

Tabla 5. Proteínas específicas de AG₃ involucradas en una eficiente movilización de reservas.

No. ID	Proteína
4	MnSOD glioxisomal
5	ICL
49	AXAH-I
50	14.3.3

Tabla 6. Proteínas comunes que participan en la movilización de reservas.

No. ID	Proteína
13	Glicosil hidrolasa
15	G3PDH
16	Lactoilglutación liasa
24	Precursor oxalato oxidasa 2
48	Proteína con dominio C2
67	Cadena A de profitepsina
70	6PGDH

Las proteínas comunes identificadas que sobresalen por su comportamiento ante los fitorreguladores, son aquellas que pudieran ser indispensables para el mantenimiento del sistema, y lograr que la célula responda de una manera metabólica adecuada a sus requerimientos básicos desembocando en una efectiva síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas (tabla 6).

Adicionalmente, las proteínas identificadas específicas de ABA que se destacan en este trabajo, posiblemente están involucradas en la respuesta del sistema a actividades propias de este fitorregulador (tabla 7).

Tabla 7. Proteínas específicas de ABA.

No. ID	Proteína
71	Sub β piruvato deshidrogenasa
74	Amilogenina
78	Piruvato descarboxilasa
84	HSP 70

Tomando en cuenta las enzimas y las proteínas que fueron identificadas, podemos proponer las vías metabólicas y los procesos activos que posiblemente están involucrados en la respuesta fisiológica evocada en la capa de aleurona y cuya función puede modificarse por la presencia de AG₃, ABA o ambos.

En un estudio paralelo realizado en el laboratorio, se analizaron aleuronas de semilla de cebada del lote 1998 tratadas con AG₃, determinando la actividad de las enzimas Fosfofructocinasa-1 (PFK-1) y Fructuosa-1,6 bifosfato fosfatasa (FBPasa), lo cual sugiere que la gluconeogénesis permanecía activa hasta las seis horas de incubación, mientras que la glucólisis se activa después de este tiempo. Por otro lado, también se analizó la actividad del ciclo del glioxilato, después de tres horas de incubación con AG₃. El catabolismo de lípidos en la capa de aleurona, produce energía y esqueletos carbonados para poder iniciar la producción y secreción de hidrolasas, manteniendo activa a la gluconeogénesis. Se observó que la actividad de la Isocitrato liasa (ICL), una enzima regulada por AG₃ e inducida

a tiempos cortos, se incrementa en un 60% por presencia del fitorregulador (Zamudio, 2007).

Regulación metabólica en aleuronas tratadas con AG₃

Una de las respuestas promovidas por AG₃, es la modificación de la pared celular de las células de la aleurona, integrada por hemicelulosas y arabinoxilano. Estos polímeros mayoritarios son capaces de crear enlaces entrecruzados entre las microfibrillas a través de puentes de hidrógeno. La pared celular debe hidrolizarse y en esta hidrólisis participa la enzima glicosil hidrolasa sobre enlaces glicosídicos (Davies y Henrissat, 1995) y removilizar los carbohidratos de la pared celular (Lee et al., 2001). La AXAH-II cuya función es la de hidrolizar el arabinoxilano, colaborando en la hidrólisis de la pared celular (Lee et al., 2001). La hidrólisis de este polímero facilita la secreción de las hidrolasas. Sin embargo esta hidrólisis impide la capacidad de la célula para retener su turgor y por tanto su viabilidad. Una manera de compensar esta incapacidad sería el reforzar la pared celular a través del entrecruzamiento de los residuos de arabinosa y ácidos ferúlicos presentes en algunos de los polímeros de la pared celular. En este entrecruzamiento participaría la Oxalato Oxidasa 2, cuya actividad de peroxidasa ayudaría a polimerizar los productos de la condensación inicial de los monolignoles, restableciendo las propiedades de la pared celular, manteniendo la rigidez y la viabilidad (Buchanan et al., 2000).

Al igual que otros autores, con los datos obtenidos podemos sugerir que una de las vías que se encuentra activa en este tejido es la gluconeogénesis, debido a que es alimentada por sustratos que se obtienen a partir del ciclo del glioxalato, dado que la Isocitrato liasa está presente (Eastmond y Jones, 2005). En la mayoría de los tejidos vegetales, las hexosas formadas a partir de la degradación de los ácidos grasos se utilizan principalmente para la formación de sacarosa, que las aleuronas secretan mediante un proceso regulado por AG₃ (Eastmond et al., 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la célula debe tener otra fuente alterna de sacarosa y ésta podría provenir del

ciclo de las pentosas fosfato, ya que el hecho de haber identificado a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa permite sugerir que la transformación de 6-fosfogluconato a ribulosa 5-fosfato la cual es catalizada por esta enzima, sostiene dicha propuesta. El ciclo podría estar sostenido por las pentosas (fuente de carbono) provenientes de la hidrólisis de la pared celular, antes mencionada. Además se ha demostrado que la 6-fosfogluconato deshidrogenasa es fuente de la coenzima reducida NADPH que se utiliza para la síntesis de nucleótidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, al mismo tiempo que mantiene un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo (Corpas et al., 1998), de esta manera se explica el incremento de esta proteína en el tratamiento con ABA en comparación al de AG₃.

En este tejido rico en triacilgliceroles, la gluconeogénesis se realiza con la participación del ciclo del glioxalato por lo que no fue sorprendente la identificación de algunas otras enzimas complementarias a esta actividad, tal es el caso de la superóxido dismutasa dependiente de Manganeseo (Mn²⁺), asociada a las membranas de los glioxisomas (Sandalio y Del Rio, 1988). Esta enzima se encarga de la inactivación del radical superóxido (O₂⁻; catalizando su conversión a H₂O₂) formado durante la degradación de los ácidos grasos por la β-Oxidación (Takahashi y Asada, 1983).

Otra enzima que incrementó sus niveles en el tratamiento con AG₃, fue la β-alanina sintasa, la cual puede estar asociada al metabolismo de lípidos. Para que la β-oxidación en los glioxisomas se lleve a cabo, 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 podría acelerar 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, quizá esta sea la razón por la que en el tratamiento con AG₃ se detectó una mayor intensidad con respecto al de ABA.

Alusión especial merece la proteína Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, ya que también participa activamente en la gluconeogénesis catalizando la oxidación y fosforilación del D-gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato y aún cuando se ha reportado que es

una enzima soluble, en este trabajo la encontramos unida a membranas. Si bien es cierto que esta localización celular podría ser producto de una contaminación citoplásmica, se ha demostrado que esta proteína se une por interacciones electrostáticas a la porción citoplasmática de una proteína de membrana (Rich et al., 1984) y su función está relacionada con el transporte de vesículas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, involucrando la vía de secreción temprana en células de riñón de rata (Tisdale, 2001). En este caso, se ha demostrado que la proteína transfiere el fosfato del 1,3-bifosfoglicerato a una de las proteínas de la vesícula y así permite la adhesión de la vesícula a membrana plasmática y la secreción de su contenido (Tisdale et al., 2004). Dado que la aleurona es un sistema secretor, la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa podría desempeñar una función similar en la secreción temprana inducida por AG_3 .

Otra proteína identificada fue una Aspártico proteasa de vacuola (Cadena A de la profitepsina). Esta proteína indica que el tejido está realizando proteólisis en la que participa de manera activa. Se une a un receptor de membrana del aparato de Golgi. Después es envuelta en una vesícula y es transportada a una vacuola lítica. También se ha encontrado en vacuolas que contienen proteínas de reserva (Kervinen et al., 1999; Neuhaus y Rogers, 1998). Ambas localizaciones reportadas para esta proteína serían posibles en la capa de aleurona, puesto que en este tejido, el AG_3 induce la formación de una gran vacuola central a partir de los cuerpos proteicos, en donde se realiza la proteólisis de las proteínas de reserva que proporcionan los aminoácidos para la síntesis de las hidrolasas. Evidencia adicional a esta actividad proteolítica, la complementa el haber identificado un fragmento de las proteínas de reserva de este tejido (globulina de embrión; Heck et. al., 1993).

Al mismo tiempo pudimos identificar dos proteínas cuyas funciones descritas en la literatura son de tipo regulatorio. Por ejemplo, la proteína con dominio C2 identificada en este trabajo podría desempeñar funciones similares a las descritas en la literatura para otras proteínas que presentan este dominio y que son relevantes para el sistema de la aleurona. Los dominios C2 están involucrados en la unión a fosfolípidos regulada por Ca^{2+} , por esta razón son denominados como dominios de unión a lípidos dependientes de calcio (Rizo y

Südhof, 1998), sin embargo no son obligatoriamente módulos de unión a Ca^{2+} o a fosfolípidos. Este dominio intracelular representa a una familia de proteínas versátiles con diversas funciones y propiedades, como el reclutamiento de proteínas hacia la membrana dependiente de calcio (se induce un cambio en el potencial electrostático, en la carga de la superficie y/o cambio conformacional en la membrana de la proteína, regulando la interacción con los fosfolípidos; (Rizo y Südhof, 1998), la hidrólisis en el enlace terminal del fosfodiéster de fosfolípidos membranales generado glicerofosfolípidos (las fosfolipasas; Zheng et al., 2000), la transducción de señales promoviendo la hidrólisis de lípidos obteniendo segundos mensajeros (proteínas cinasas; Newton, 1995), así como el tráfico vesicular dependiente de calcio (proteínas sensoras de calcio para tráfico vesicular; Rizo y Südhof, 1998).

La otra proteína regulatoria identificada fue la 14.3.3. Esta pertenece a una extensa familia cuyas funciones son la regulación de la actividad de ATPasas de membrana plasmática en el proceso de germinación de las semillas, auxiliar en la regulación de la síntesis de almidón, así como integrar el metabolismo de Carbono y Nitrógeno para su asimilación en diversos sistemas celulares (Fulgosi et al., 2002). A través de la interacción con algunas enzimas citosólicas de las vías metabólicas mediante la fosforilación, evita su degradación por proteasas vacuolares no selectivas (Moorhead et al., 1999; Cotelle et al., 2000). El caso particular de la aleurona se ha demostrado que el AG_3 regula la actividad de una ATPasa de membrana, que a su vez regula la actividad de los canales de calcio (Chen et al., 1997; Hetherington y Brownlee, 2004).

Regulación metabólica en aleuronas tratadas con ABA

El tratamiento con ABA podría activar: la oxidación de la glucosa para la formación de NADPH (poder reductor en el sistema), la vía de respuesta a condiciones de estrés y la biosíntesis de productos para reserva.

Dado el aumento en intensidad con ABA de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, anteriormente mencionada, sugiere que la formación del NADPH citoplasmático (nucleótido reducido) es más importante en el tratamiento con ABA para mantener el balance del sistema en comparación con el de AG₃, ya que la intensidad de esta enzima es mayor en el primer caso (tabla 4). La formación del NADPH sumado a la identificación de la subunidad E1β de la Piruvato deshidrogenasa (enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato para producir acetilCoA; Jan et al., 2006) alimenta la actividad del Ciclo de Krebs. Para realizar reacciones biosintéticas implicadas en esta actividad, la aleurona cuenta con los precursores carbonados. Quizá por esta razón, entre las proteínas detectadas en presencia de ABA se encuentre la amilogenina. Esta proteína ayuda a la biosíntesis de polisacáridos como el almidón y componentes de la pared celular (Farré et al., 2001).

Además, el hecho de que la abundancia de la lactoilglutación liasa sea mayor en tejido de aleurona tratada con ABA, apoya indirectamente que en esas condiciones ocurre la formación de metilglioxal (MG). Este es un compuesto tóxico que modifica los ácidos nucleicos y las proteínas, además de promover la muerte celular programada. Se forma a partir de la eliminación espontánea de fosfato de la dihidroxiacetona fosfato, saturando a las enzimas de la segunda parte de la glucólisis, cuando es muy activa (Kingkeohoi y Chaplen, 2005). En tejidos en estrés abiótico se ha demostrado la síntesis de ácido abscísico y que la glucólisis es muy activa (Plaxton, 1996).

El haber observado una intensidad mayor en la G3PDH en el tratamiento con ABA comparada con el de AG₃, soporta el planteamiento anterior. Esta enzima se induce por la deficiencia de fósforo inorgánico (P_i; interviene en la síntesis y emigración de los monosacáridos y en el metabolismo de los lípidos) así como la fosfoenol piruvato fosfatasa. Ambas mantienen el flujo de sustratos carbonados de la glucólisis hacia la mitocondria, alimentando también el ciclo de Krebs. De esta manera, contribuye a la activación del mecanismo de defensa a este estrés (Poirier y Bucher, 2002).

El ABA también tiene la función de inducir proteínas que permitan que el tejido contienda de manera exitosa con diferentes tipos de estrés abiótico (Merlot y Giraudat,

1997). Tal vez esta sea la razón por la que en las aleuronas tratadas con ABA se hayan detectado las subunidades α y β de la ATP sintasa, las cuales bajo condiciones de estrés, se inducen para mantener el balance de energía en la célula (Hamilton et al., 2001). Esto refuerza la actividad del ciclo de Krebs.

En las aleuronas tratadas con ABA también se identificaron chaperonas moleculares como la proteína HSP 70 que estabiliza a las cadenas polipépticas desplegadas y previene su agregación con otras durante la síntesis de proteínas (Buchanan, 2000). Adicionalmente, se ha observado que esta se localiza en la matriz del glioxisoma e interviene en el transporte de proteínas a través de su membrana (Crookes y Olsen, 1998). La espermidina sintasa está involucrada en la biosíntesis de poliaminas que inhiben la apertura del estoma además estabiliza la estructura del DNA cuando la célula se encuentra en estrés, facilitando la expresión de los genes en respuesta a estas condiciones (Kasukabe et al., 2004). De igual manera, el conjunto de proteínas como la aldehído deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa permiten que el tejido sea viable en condiciones de hipoxia (Das y Uchimiya, 2002).

Por otro lado, una proteína que contiene un dominio C2 y es activada por ABA, es la fosfolipasa D. El ácido fosfatídico, se obtiene como uno de los productos de la reacción que cataliza, el cual se ha observado que activa las respuestas tempranas en la célula de aleurona. Algunas de estas respuestas son la inhibición en la producción de α -amilasa dependiente de AG_3 así como la reducción en la concentración del calcio en el citoplasma. Esta requiere estar intacta para el funcionamiento del sistema dependiente de Ca^{2+} en la transducción de señales catalizando reacciones de fosforilación (fosfatidilinositol 3-cinasa; Kopka et al., 1998; Ritchie y Gilroy, 1998). Sin embargo, la posibilidad de que se tratara de esta proteína fue descartada, debido a que su comportamiento en el tratamiento con ABA es mucho menor que con AG_3 , suponiendo entonces que esta proteína no respondía específicamente a ABA.

De acuerdo con la información presentada y la clasificación propuesta de las proteínas obtenidas de aleuronas aisladas después de tres horas de incubación con diferentes fitorreguladores, suponemos que la actividad metabólica que presenta es diversa, por un lado al percibir al AG₃ las vías que se encontrarían activas son la degradación de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis. Por el otro, al percibir al ABA se activarían los mecanismos de defensa, protección y mantenimiento para el equilibrio del sistema, así como la glucólisis, como se muestra en la figura 8.

CONCLUSIONES

- ⊙ El tratamiento de alueronas con AG_3 y ABA permitió identificar grupos de proteínas que responden específicamente a cada fitorregulador.
- ⊙ De las proteínas estimuladas por AG_3 algunas participan en la síntesis y secreción de hidrolasas (la MnSOD, la ICL, la AXAH-I y la 14.3.3). En cambio, algunas de las estimuladas por ABA están involucradas en la acumulación de reservas y en la defensa contra el estrés abiótico (la amilogenina, piruvato descarboxilasa, piruvato deshidrogenasa, subunidad β de la ATP sintasa y la HSP70).
- ⊙ También hay proteínas que podrían estar involucradas en la movilización de reservas y que responden a ambos fitorreguladores, son: la glicosil hidrolasa, G3PDH, Oxalato oxidasa 2, la proteína con dominio C2, la profitepsina y la 6PGDH.
- ⊙ El tratamiento con AG_3 permitió identificar que este fitorregulador estimula enzimas que participan en diversas vías metabólicas, entre las que se encuentran el catabolismo de lípidos, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis, mientras que el ABA induce a las enzimas de las vías de glucólisis, control, protección y respuesta a condiciones de estrés, las cuales pueden ser importantes para inhibir las respuestas al AG_3 .
- ⊙ Las proteínas de tipo regulatorias identificadas en este trabajo (proteína de la familia 14.3.3 y las que contienen un dominio C2) se estimularon en respuesta al tratamiento con AG_3 y por tanto es probable que contribuyan a que la movilización de reservas sea efectiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Bethke, P.C., Schuurink, R., Jones, R. L. (1997). Hormonal signalling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany* 48 (312): 1337-1356.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.
- Brown, P., David, Th. (1986). Barley aleurones layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid. *Plant Physiology* 82: 801-806.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Courier Companies. Pp 1367.
- Bush, D. S., Biswas, A. K., Jones, R. L. (1993). Hormonal regulation of Ca^{2+} transport in the endomembrane system of the barley aleurone. *Planta* 189: 507-515.
- Caspers, M., Lok, F., Sinjorgo, K., Zeijl, M., Nielsen, K., Cameron-Mills, V. (2001). Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo-b-1,4-xylanase from barley aleurone during germination. *The Plant Journal* 26(2): 191-204.
- Castellanos, L., González, L.J., Padrón, G. (2004). *Combinatorio Molecular*. Capítulo 20. Proteómica. Ed. Elfos Scientiae 367-403.
- Chen, X., Chang, M., Wang, B., Wu, R. (1997). Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene and the role of cytosolic Ca^{2+} in the gibberellin-dependent signalling pathway in aleurone cells. *The Plant Journal* 11 (3): 363-371.
- Corpas, F., Barroso, L., Distefano, S., Palma, J., Lapiáñez, J., Del Río, L. (1998). A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemistry Journal* 330: 777-784.
- Cotellet, V., Meek, S., Provan, F., Milne, F., Morrice, N., Mackintosh, C. (2000). 14.3.3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *The EMBO Journal* 19(12): 2869 – 2876.
- Crookes, W., Olsen, L. (1998). The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *The Journal of Biological Chemistry* 273(27): 17236–17242.
- Das, A., Uchimiya, H. (2002). Oxygen stress and adaptation of a semi-aquatic plant: rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Research*. 115: 315-320.
- Davies, G., Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853 – 859.

- Domash, V., Protsko, R., Vasyuk, V., Shumikhin, S., Ermolitskaya, L., Sharpio, T. (2006). The content of abscisic acid and the activities of proteinases and trypsin inhibitory proteins, in the germinating seed of common beans under water stress conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42(1): 97-100.
- Eastmond, P.J., Germain, V., Lange, P.R., Bryce, J.H., Smith, S.M., Graham, I.A. (2000). Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 5669–5674.
- 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.
- Farré, E., Tiessen, A., Roessner, U., Geigenberger, P., Trethwey, R., Willmitzer, L. (2001). Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiology* 127: 685-700.
- Finkelstein, R., Gampala, S., Rock, Ch. (2002). Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 15-45.
- Fulgosi, H, Soll, J., Maraschin, SdeF., Korthout, H., Wang, M., Testerink, C. (2002). 14-3-3 proteins and plant development. *Plant Molecular Biology* 50: 1019–1029.
- 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 Physiology* 104: 1185-1192
- Gómez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M., Ho, T. (2001). Gibberellin/Abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *The Plant Cell* 13: 667-679.
- Grill, E., Himmelbach, A. (1998). ABA signal transduction. *Plant Biology* 1: 412-418.
- Hamilton, Ch., Good, A., Taylor, G. (2001). Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiology* 125: 2068–2077.
- 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*. *Molecular and General Genetics*. 239 (1-2): 209-218.
- Hetherington, A., Brownlee, C. (2004). The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annual Review Plant Biology*. 55: 401–427.

- Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J. (1991). Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* 183: 274-280.
- Jacobsen, J. V., Chandler, P. M. (1988). Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. In plant hormones and their role in plant growth development. Kluwer Acad. Publishers, Ed. P. Davies pp.164-193.
- Jan, A., Nakamura, H., Handa, H., Ichikawa, H., Matsumoto, H., Komatsu, S. (2006). Gibberellin regulates mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase activity in rice. *Plant Cell Physiology* 47(2): 244-253.
- 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.
- 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.
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., Tachibana, S. (2004). Overexpression of Spermidine Synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 45(6): 712-722.
- Kervinen, J., Tobin, G., Costa, J., Waugh, D., Wlodawer, A., Zdanov, A. (1999). Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacular targeting. *The EMBO Journal* 18(14): 3947-3955.
- Kingkeohoi, S., Chaplen, F. (2005). Analysis of methylglyoxal metabolism in CHO cells grown in culture. *Cytotechnology* 48: 1–13.
- Kopka, J., Christophe Pical, Ch., Hetherington, A., Bernd Müller-Röber, B. (1998). Ca^{2+} /phospholipidbinding (C2) domain in multiple plant proteins: novel components of the calciumsensing apparatus. *Plant Molecular Biology* 36: 627–637.
- Lee, R., Burton, R., Hrmova, M., Fincher, G. (2001). Barley arabinoxylan arabinofuranohydrolases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones. *Biochemistry Journal* 356: 181-189.
- Lovegrove, A., Hooley, R. (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science* 5 (3): 102-110.
- Maya, V.R. (1997). Aislamiento y purificación de membrana plasmática de capa de aleurona de cebada. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Maya, V., Bernal, I. (2006). Redox-sensitive target detection in gibberellic acid-induced barley aleurone layer. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 1362 -1368.

- Merlot, S., Giraudant, J. (1997). Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiology* 114: 751-757.
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A., Mackintosh, C. (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14.3.3 proteins. *The Plant Journal* 18(1): 1-12.
- Neuhaus, JM., Rogers, J. (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Molecular Biology* 38: 127–144.
- Newton, A. (1995). Protein Kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 270(48): 28495–28498.
- Plaxton, W. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 185-214.
- Poirier, Y., Bucher, M. (2002). Phosphate transport and homeostasis in arabidopsis. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. 1a edición. 35 pp.
- 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. *Plant Physiology* 109: 225–231.
- Rich, G., Dawson, A., Pryor, J. (1984). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase release from erythrocytes during Haemolysis. *Biochemistry Journal* 221: 197-202.
- Ritchie, S., Gilroy, S. (1998). Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Plant Biology* 95: 2697–2702.
- Ritchie, S., Gilroy, S. (1998). Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiology* 116: 765-776.
- Rizo, J., Südhof, T. (1998). Minireview. C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} -binding domain. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (26): 15879–15882.
- Skadsen, R.W. (1998). Physiological and molecular genetic mechanisms regulating hydrolytic enzyme gene expression in cereal grains. *Plant Physiology*. 104:486-502.
- Takahashi, M., Asada, K. (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 226(2): 558-66.

- Tisdale E. (2001). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 276(4): 2480-6.
- Tisdale, E., Kelly, C., Artalejo, C. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *Journal of Biological Chemistry* 279(52): 54046-52.
- Zamudio, R. (2007). Proteómica de aleurona: Identificación de proteínas membranales inducidas por ácido giberélico (AG₃). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M., Wang, X. (2000). Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β . *The Journal of Biological Chemistry* 275(26): 19700–19706.