



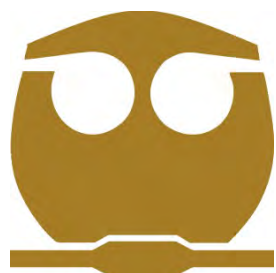
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE
UNA LÍNEA DE *Arabidopsis thaliana* DEFECTUOSA EN
LA HIDROXILACIÓN DE BASES DE CADENA LARGA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
LIZETH MEZA BERNAL



MÉXICO, D.F.

2009



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	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Vocal	Dr. Eleazar Martínez Barajas
Secretario	Dr. José Ignacio Páramo Ramírez
1er suplente	Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2º suplente	M. en C. Laura Carmona Salazar

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Lab.101, Depto. de Bioquímica, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM

Asesora

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor técnico

Q.A. Christian Alejandro Vázquez Vázquez

Sustentante

Lizeth Meza Bernal

AGRADECIMIENTOS

Lizeth Meza Bernal, recibió una beca de CONACYT para realizar este trabajo de tesis por parte del proyecto No. 55610

El financiamiento de este trabajo de tesis estuvo a cargo de los proyectos PAPIIT DGAPA (UNAM) No. IN207806 e IN211409 y del proyecto de CONACyT No. 55610.

Agradecemos la ayuda del Dr. Edgar B. Cahoon del Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, EU. por haber proporcionado las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 y en especial de la mutante *Atsbh1-1* para la realización de este trabajo de tesis. Así mismo, la ayuda de los Dres. Luis E. González de la Vera (CINVESTAV. Irapuato) y Dra. Rosario Vera Estrella (Instituto de Biotecnología, UNAM), por haber proporcionado los anticuerpos contra la ATPasa de H⁺.

Agradecemos al Dr. Diego González Halphen y el Dr. Rodolfo Paredes Díaz del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el trabajo de microscopía electrónica de las fracciones membranales.

Agradecemos la ayuda técnica de la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo, de la M.C. Laura Carmona Salazar, de la P.Q.A Guadalupe Ponce Leyva, de la Q. Priscila Rodríguez Mejía y de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado del esfuerzo, trabajo y dedicación que ha sido apoyado por un gran numero de personas a todas ellas les escribo unas breves palabras de agradecimiento.

Quiero agradecer a:

A Dios por haberme permitido gozar de una vida plena y feliz a lado de las personas que más amo "Mi familia".

A mis padres Z. Cristina Bernal y Roberto Meza quienes con amor, cariño y apoyo infinito me otorgaron la mejor herencia. Admiro su gran esfuerzo y dedicación con la que me educaron, haciendo de mí lo que hasta hoy soy.

A mi hermano J. Manuel y su esposa Adela Gutiérrez por la motivación y apoyo incondicional que me mostraron durante mi formación académica

A mi hermano Beto quien desde pequeña me entrego su cariño, apoyo y amor. Llenándome de cuidados, alentándome y haciéndome reír en los momentos más difíciles de mí vida junto con mí casi hermana Claudia Rivas quien de igual forma estuvo conmigo siempre en las buenas y en las malas.

A los grandes amores de mi vida mis sobrinos: Ariana, David, Josué y N. Galilea que con su llegada oportuna me llenaron de alegrías, impulsándome a terminar este sueño tan anhelado.

A mi abuelita Vicky† gran persona de la cual siempre estuve orgullosa por mostrarme grandes valores como la humildad, honestidad y constancia. Aún cuando hoy este ausente sé que me cuida desde el cielo.

A mis tíos Jesús Meza y Carmen Garduño por todas sus palabras de aliento.

A todos esos grandes amigos quienes me dieron la oportunidad de entrar a su vida, aprendiendo y disfrutando cosas inolvidables en el momento oportuno.

A mis casi hermanas CCHeras Pau, Gris, Sharone, Lety y Mary por estar conmigo hasta el final.

A esos grandes amigos de la Facultad de Química quien aprecio mucho por los grandes momentos compartidos, por su paciencia, consejos, logros y buen compañerismo: Lilly Torres, Lupita Ponce, Rubén Monsalvo, Pedro Montaña, Víctor Gamero, Adrian Zúñiga, Mayell Soto, Anabel Rodríguez, Lianka, Guillermo, Karlitroz y Agustín.

A una gran persona a Rogelio Ibarra Balcazar quien me apoyo en todo, por creer en mí, apoyándome mostrándolo con amor, paciencia y carácter marcando mi vida de momentos inolvidables. Gracias por estar conmigo

A mí profesor y amigo Miguel Ángel Chávez, por su apoyo y consejos académicos como personales. ¡Mil Gracias!, por permitirme conocer a ese gran ser humano que llevas dentro.

A mis amigos Hugo Enrique Mendoza y Marco Antonio Alarcón por brindarme su amistad y apoyo infinito.

A la Doctora Marina Gavilanes Ruíz quien apoyo en todo momento este trabajo de tesis así como la supervisión de Christian Alejandro Vázquez y Laura Carmona.

A esa gran persona que me supervisó y me brindo su amistad durante mi estancia en el laboratorio 101 a mi querida Chelo.

A mí querida Facultad de Química quien me dio sabiduría junto con sus profesores y asesores.

Y finalmente a mi Universidad, quien me dio la oportunidad de pertenecer a esta gran comunidad...

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”

CONTENIDO

Índice de Tablas.....	pp. 9-10
Índice de Figuras.....	pp. 11-13
1. Resumen.....	pp. 14-15
2. Introducción.....	pp. 16-39
2.1 Membranas biológicas.....	pp. 16
2.2 Estructura de las membranas.....	pp. 16-17
3. Componentes membranales.....	pp. 17-34
3.1 Lípidos	
3.2 Glicerofosfolípidos.....	pp. 18-21
3.3 Esfingolípidos	
Estructura.....	pp. 21-23
Estructura de bases de cadena larga (BCL).....	pp. 23-24
Biosíntesis de esfingolípidos.....	pp. 24-25
Síntesis y modificaciones enzimáticas de bases de cadena larga BCL.....	pp. 25-31
Funciones de esfingolípidos.....	pp. 31-32
3.4 Esteroles.....	pp. 32-34
3.5 Ácidos grasos.....	pp. 34
4. La membrana plasmática de células vegetales.....	pp. 34-36
5. Balsas lipídicas o microdominios membranales.....	pp. 36-37
6. Asociación de proteínas con esfingolípidos membranales.....	pp. 37-38
7. Antecedentes inmediatos.....	pp. 39
8. Hipótesis.....	pp. 40
9. Objetivo general.....	pp. 41
Objetivos particulares.....	pp. 41
10. Materiales y métodos.....	pp. 42-62
10.1 Material biológico.....	pp. 42
10.2 Cultivo de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	pp. 42-44

10.3	Obtención de membranas plasmáticas	
	Obtención de microsomas.....	pp. 44-48
10.4	Obtención de vesículas de membrana plasmática.....	pp. 48-49
10.5	Determinación de proteína.....	pp. 49
10.6	Medición de enzimas marcadoras.....	pp. 50-52
10.7	Análisis de las fracciones membranales por microscopía electrónica.....	pp. 52-53
10.8	Separación electroforética de proteínas.....	pp. 53-59
10.9	Replica en Western.....	pp. 59-62
11.	Resultados.....	pp. 63-91
	1 Análisis de características fenotípicas de <i>Atsbh1-1</i>	pp. 63-67
	2 Rendimientos de las fracciones subcelulares de las líneas Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 68
	3 Determinación de pureza. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.....	pp. 69-70
	4 Actividad de ATPasa de H ⁺ de las fracciones membranales de las líneas Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 70-74
	5 Comparación de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de vesículas de membrana plasmática en la línea control y la mutante de acuerdo a su grado de pureza.....	pp. 75-86
	6 Análisis electroforético de las proteínas de la línea mutante en SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y nitrato de plata.....	pp. 87-90
	7 Detección de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática por medio de replica Western.....	pp. 90-91
12.	Discusión.....	pp. 92-102
	1 Análisis sobre características fenotípicas encontradas en la línea <i>Atsbh1-1</i>	pp. 93-94
	2 Análisis sobre los Rendimientos obtenidos de las	

fracciones subcelulares de las líneas Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 94-96
3 Análisis sobre la de pureza por microscopía electrónica de transmisión.....	pp. 96-97
4 Análisis de la actividad de ATPasa de las fracciones membranales de las líneas Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> . Enzimas marcadoras.....	pp. 97-99
5 Comparación de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de vesículas de membrana plasmática en la línea control (Col-0) y la línea mutante (<i>Atsbh1-1</i>) de acuerdo al grado de pureza de la preparación.....	pp. 99-100
6 Análisis electroforético de las proteínas de la línea mutante en SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y nitrato de plata.....	pp. 100
7 Detección de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática por medio de replica Western.....	pp. 101-102
Conclusión.....	pp. 103
Perspectivas.....	pp. 104
Bibliografía.....	pp. 105-110

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Composición y preparación del medio sólido de Gamborg	pp. 43
Tabla II	Composición de amortiguadores para la obtención y purificación de VMP de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	pp. 46
Tabla III	Composición de soluciones empleadas para la preparación del cocktail de inhibidores de proteasas	pp. 47
Tabla IV	Composición de las soluciones empleadas para preparar la mezcla de fases para la obtención de VMP.	pp. 48
Tabla V	Determinación de proteína en las fracciones membranales de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	pp. 50
Tabla VI	Determinación de Pi liberado a partir de la hidrólisis de ATP	pp. 52
Tabla VII	Composición del gel para la separación electroforética de proteínas en geles de SDS	pp. 55
Tabla VIII	Pesos moleculares de estándares de proteínas	pp. 56
Tabla IXa y b	Reactivos utilizados en la técnica de réplica en Western	pp. 60-61
Tabla X	Rendimientos en homogenado, microsomas y vesículas de membrana plasmática en líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 68
Tabla XI	Intervalos de dimensiones medidas en vesículas en preparaciones de FM y VMP en línea silvestre y mutante	pp. 70
Tabla XII	Ejemplo de determinación de hidrólisis de ATP en fracción microsomal y vesículas de membrana plasmática en líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0	pp. 74
Tabla XIII	Ejemplo de determinación de hidrólisis de ATP en fracción microsomal y vesículas de membrana plasmática en líneas de <i>Arabidopsis thaliana Atsbh1-1</i>	pp. 76

Tabla XIV	Agrupamiento 1 de preparaciones de membrana plasmática en líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> de acuerdo a su pureza expresada en porcentaje	pp. 77
Tabla XV	Agrupamiento 2 de preparaciones de membrana plasmática en líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> de acuerdo a su pureza expresada en porcentaje	pp. 81
Tabla XVI	Relación de actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 76
Tabla XVII	Comparación de rendimientos de fracciones subcelulares de distintas especies y líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	pp. 95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Disposición de lípidos en una bicapa biológica	pp. 17
Figura 2	Estructura de glicerolípidos de membrana de plantas.	pp. 19
Figura 3	Estructura de un esfingolípidio complejo	pp. 21
Figura 4	Estructura de esfingolípidos reportados en plantas	pp. 22
Figura 5	Estructuras de BCL encontradas en plantas	pp. 25
Figura 6	Diagrama de síntesis de <i>novo</i> de esfingolípidos	pp. 26
Figura 7	Productos formados a partir de la esfinganina.	pp. 27
Figura 8	Modificaciones químicas en BCL por formación de dobles ligaduras y por hidroxilaciones enzimáticas.	pp. 29
Figura 9	Modificaciones en BCL por efecto de hidroxilasas $\Delta 4$ en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	pp. 31
Figura 10	Estructura básica de un esteroles.	pp. 33
Figura 11	Modelo de la estructura de una membrana biológica.	pp. 35
Figura 12	Modelo de estructura de balsas lipídicas en la membrana plasmática de plantas	pp. 37
Figura 13	Asociación de proteínas ancladas a Glicosilfosfatidilinositol (GPI) a microdominios membranales.	pp. 38
Figura 14	Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	pp. 43
Figura 15	Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	pp. 45
Figura 16	Comparación del crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> .	pp. 63
Figura 17	Comparación de las características de clorosis y senescencia de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> .	pp. 64
Figura 18	Comparación de características fenotípicas de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> .	pp. 65

Figura 19	Comparación de color y forma de hojas de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> .	pp. 66
Figura 20	Comparación de pérdida de turgencia de hojas de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> .	pp. 67
Figura 21 A	Análisis de pureza de fracciones membranales de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 por microscopía de transmisión	pp. 71
Figura 21 B	Análisis de pureza de fracciones membranales de <i>Arabidopsis thaliana Atsbh1-1</i> por microscopía de transmisión	pp. 72
Figura 22	Agrupación de preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> de acuerdo a su sensibilidad a vanadato	pp. 78
Figura 23	Actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática sensible a vanadato de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> en preparaciones de vesículas de membrana plasmática agrupadas según su pureza	pp. 79
Figura 24	Actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática sensible a nitrato/molibdato de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> en preparaciones de vesículas de membrana plasmática agrupadas según su pureza	pp. 80
Figura 25	Agrupación de preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> de acuerdo a su sensibilidad a vanadato	pp. 83
Figura 26	Actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática sensible a vanadato de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> en preparaciones de vesículas de membrana plasmática agrupadas según su pureza	pp. 84

Figura 27	Actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática sensible a nitrato/molibdato de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> en preparaciones de vesículas de membrana plasmática agrupadas según su pureza	pp. 85
Figura 28	Separación de proteínas SDS-PAGE, teñido con Coomassie en preparaciones de homogenado, microsomas y vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 87
Figura 29	Separación de proteínas SDS-PAGE, teñido con nitrato de plata en 6 preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 88
Figura 30	Separación de proteínas SDS-PAGE, teñido con nitrato de plata control de cargado de vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 89
Figura 31	Inmunodetección de la ATPasa de H ⁺ en vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 91
Figura 32	Modelo final sobre la actividad biológica de la ATPasa de H ⁺ en membrana plasmática en las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y <i>Atsbh1-1</i>	pp. 102

1. RESUMEN

Tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en plantas se han utilizado mutantes generadas por la inserción de transposones y/o el empleo de RNAi (RNA de interferencia) para alterar los genes de las enzimas del metabolismo de esfingolípidos y dilucidar la función de éstos dentro de la membrana plasmática. En estudios de este tipo en mutantes de *Arabidopsis thaliana* se reportó modificación en la estructura de esfingolípidos y de sus precursores. Así mismo, en comparación con células de mamíferos, en plantas se encontró: 1) variabilidad en la composición de bases esfingoideas, con una longitud de 18 átomos de carbono (C₁₈) derivadas de D-eritro-esfinganina, 2) con desaturaciones en posiciones cis o trans en C-8, 3) con variación en la longitud de bases de cadena larga (BCL), 4) y con variable grado de hidroxilación. Todo esta infinidad de cambios en la estructura de esfingolípidos dentro de la membrana de plantas conlleva a una diversidad de funciones importantes para el control y mantenimiento celular, entre ellas la regulación de la programación de la muerte celular (Liang *et al.*, 2003) y el cierre de los estomas.

En este trabajo se utilizó una línea de *Arabidopsis thaliana* que ha sido manipulada genéticamente para tener un defecto en una de las enzimas hidroxilasas de las bases esfingoideas, moléculas que forman parte de la estructura de los esfingolípidos complejos. Esta línea, denominada *Atsbh1-1* ha sido facilitada por el grupo del Dr. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, EU). Este material biológico es interesante, pues se ha propuesto que la presencia de hidroxilos en la estructura de la base esfingoidea de los esfingolípidos es un factor que influye en las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos y por tanto puede afectar las características de las membranas. Dos posibles alteraciones de la falta de hidroxilación de esfingolípidos pueden expresarse en la actividad de proteínas membranales y en la formación de DRM (membranas resistentes a la solubilización por detergente). En este trabajo se reporta el aislamiento y la caracterización de membranas plasmáticas de hojas de la línea de *Arabidopsis thaliana Atsbh1-1*(SALK_090881) que tiene una mutación en el gene *sbh1* que codifica para la hidroxilasa SBHA.

Para lo anterior, se ha cultivado la línea *Atsbh1-1* (SALK_090881) de *Arabidopsis thaliana* en invernadero y se han optimizado las condiciones de aislamiento y purificación de las fracciones de la membrana plasmática por medio de técnicas de fraccionamiento subcelular, centrifugación diferencial y distribución en fases de polímeros acuosos. Las fracciones obtenidas se examinaron en cuanto a su pureza determinando la actividad de enzimas marcadoras y efectuando el análisis de la ultraestructura por microscopía electrónica de las fracciones membranales. Asimismo, se determinó el perfil proteico de las fracciones membranales comparándose con la línea silvestre Col-0.

En las características fenotípicas de ambas líneas estudiadas encontramos diferencia en: 1) el período de crecimiento variando de 2 a 4 semanas en la línea mutante, 2) en la forma y color de la hoja de la línea *Atsbh1-1* (SALK_090881), presentando una hoja más alargada y delgada, de un verde más intenso. En la obtención de las fracciones subcelulares de homogenado no presentaron cambios en el rendimiento de proteína en la línea *Atsbh1-1* (SALK_090881) con respecto a los obtenidos en la línea control (ecotipo Col-0). En la obtención de microsomas y Vesículas de Membrana Plasmática (VMP), a diferencia de la línea silvestre, la línea *Atsbh1-1* (SALK_090881) mostró rendimientos más bajos en términos de proteína membranal que los encontrados con la línea control (Col-0). Las VMP obtenidas se encontraron con muy buena pureza observándose una cantidad reducida de contaminantes pertenecientes a otras organelas, tanto en la línea control como en la mutante. En términos de actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, la línea mutante presentó una baja actividad comparada con la línea silvestre. Sin embargo, este descenso en la actividad no se debió a una menor cantidad de enzima en la membrana. Las diferencias encontradas entre las VMP de la línea mutante *Atsbh1-1* con las plantas del genotipo silvestre, ecotipo Col-0, indican que la hidroxilación de esfingolípidos es importante para la actividad de por lo menos algunas enzimas membranales y puede determinar la presencia selectiva de ellas en la membrana.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Membranas biológicas

Las membranas biológicas realizan muchas funciones importantes para la célula, como el transporte de solutos, la transducción de energía y la transmisión de información entre los compartimentos que separan. En estas funciones tienen parte activa los lípidos y las proteínas asociadas a las membranas (Stryer, 2003).

Las membranas son estructuras dinámicas en las que las proteínas flotan en un mar de lípidos. Los lípidos a su vez tienen una gran movilidad lateral. Los componentes lipídicos de la membrana constituyen la barrera de permeabilidad, mientras que las proteínas funcionan como sistemas de transporte que, bien actúan como conductos o bombas para proporcionarle a la membrana su capacidad de transporte selectivo (entrada y salida de moléculas específicas, en general con carga eléctrica, polares o apreciable masa molecular), contribuyendo así a mantener el equilibrio entre el interior y exterior de células.

2.2 Estructura de las membranas

Las membranas de las células difieren tanto en su estructura como en sus funciones. Sin embargo, tienen en común un cierto número de características y propiedades importantes:

- 1.- Las membranas son estructuras laminares, el grosor de la mayoría de las membranas está comprendido entre 60 y 100 Å (6 y 10 nm).
- 2.- Las membranas constan principalmente de lípidos y proteínas, conteniendo hidratos de carbono unidos a lípidos y proteínas.
- 3.- Los lípidos de membrana son pequeñas moléculas anfipáticas; estos lípidos forman bicapas que constituyen obstáculos al flujo de moléculas polares.
- 4.- Las proteínas funcionan como bombas, compuertas, receptores, transductores de energía o enzimas; estas proteínas están intercaladas en las bicapas lipídicas, las cuales crean un ambiente adecuado para la acción de estas proteínas.

5.- Las membranas constituyen asociaciones no covalentes pero muy estables. Las moléculas proteicas y lipídicas integrantes se mantienen juntas por efecto de muchas interacciones no covalentes de carácter cooperativo.

6.- Las membranas son asimétricas. Las caras interna y externa de las membranas biológicas son diferentes debido a la composición y proporción de sus lípidos, carbohidratos y proteínas.

7.- Las membranas son estructuras fluidas, se puede considerar a las membranas como disoluciones bidimensionales de proteínas y lípidos orientados, ya que están asociados por interacciones específicas no covalentes.

8.- La mayoría de las membranas están polarizadas eléctricamente, con carga negativa en el interior (-60 mV). El potencial eléctrico desempeña un papel clave en el transporte, la conversión de energía y la estabilidad de las células (Stryer, 2003).

3. COMPONENTES MEMBRANALES

3.1 Lípidos

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos como el cloroformo. Los lípidos tienen diferentes funciones biológicas: como compuestos que al oxidarse constituyen combustibles energéticos, como moléculas de señalización y como componentes de las membranas. En éstas, los tres tipos principales de lípidos son: glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides (Fig.1) (Stryer, 2003).

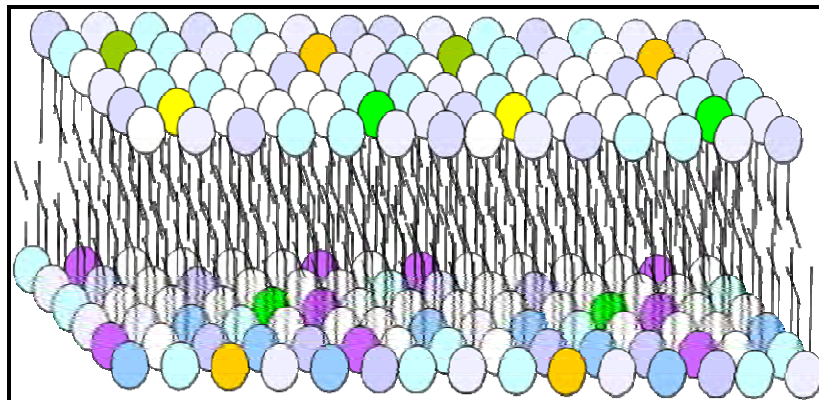


Figura 1. Disposición de lípidos en una bicapa biológica.

3.2 Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos son un tipo de lípidos compuestos por un esqueleto de glicerol, cuyo tres hidroxilos unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato que se une a su vez a otro grupo mediante enlaces éster, como colina, serina o etanolamina y que muchas veces posee una carga eléctrica. Los glicerofosfolípidos más conocidos son la fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidilserina (Fig.2) (Stryer, 2003).

La composición de lípidos de las monocapas interna y externa no es la misma, ni tampoco las proporciones de cada lípido en cada monocapa (asimetría), lo que puede tener relación con la presencia de proteínas que requieren unirse a determinados lípidos (Stryer, 2003).

Ácido fosfatídico (PA)

El ácido fosfatídico (PA; 1,2-diacyl-sn-glicerol-3-fosfato) fue aislado primero en hojas de col por Chibnall y Chanoon en 1927, esta molécula es central en el metabolismo de fosfolípidos. La acumulación de PA puede activar la fosolipasa D durante la extracción de lípidos.

Galactolípidos

Fueron descubiertos por Carter y colaboradores en 1956, encontrándose a los 2 galactolípidos identificados como 1,2-diacil-3- α -(β -D-galactopiranosil)-sn-glicerol (**MGD**) o nombrado también como monogalactosildiacilglicerol (Chen *et al.*, 2008) y 1,2-diacil-3- α -(β -D-galactopiranosil 1 \rightarrow 6- α -D-galactopiranosil)-sn-glicerol (**DGDG**) ó denominado también como digalactosilacelglicerol, conteniendo oligosacáridos mayoritariamente de 3 o más galactosas como cabeza polar (**TriGDG y TetraGDG**). Los ácidos grasos poliinsaturados como ácido α -linolénico (18:3) y ácido hexadacatrienoico (16:3) son abundantes en galactolípidos; cabe mencionar que el segundo se encuentra en cierto grupo de plantas (Ej. espinacas, Arabidopsis; (Heinz and Roughan, 1983).

Los galactolípidos son lípidos predominantes en membranas fotosintéticas de plantas y cianobacterias constituyendo un 85% del total de glicerolípidos (Block *et al.*, 1983). Sobre la membrana de cloroplasto muestra una composición similar a la membrana tilacoidal, sin embargo contienen más especies DGDG.

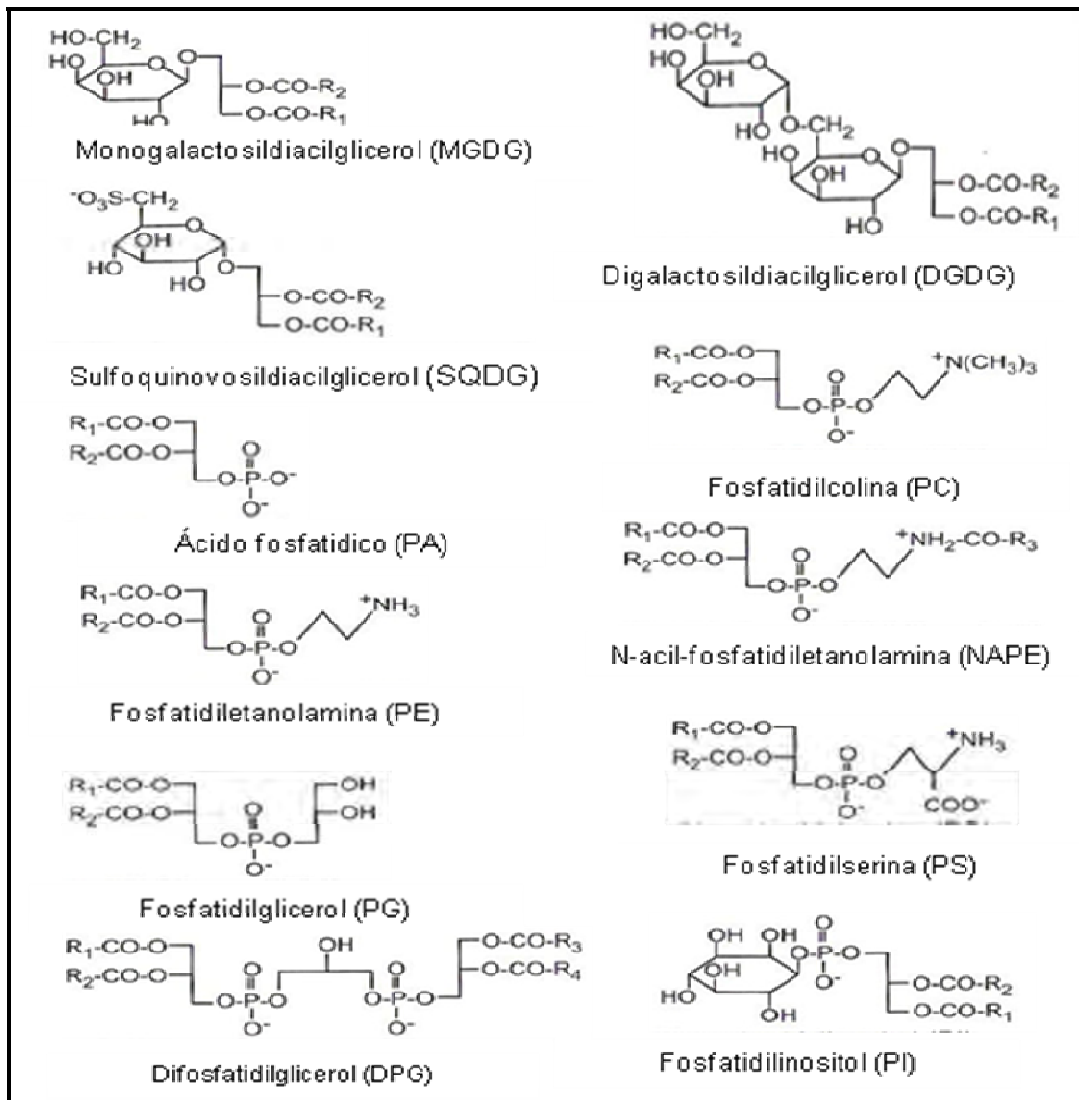


Figura 2. Estructura de glicerolípidos de membrana de plantas, algunos son predominantes en cloroplasto como son: monogalactosildiacylglicerol (MGDG), digalactosildiacylglicerol (DGDG) y sulfoquinovosildiacylglicerol (SQDG). Y Otras son predominantes en membrana extraplastídica como son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidietanolamina (PE) y fosfatidilglicerina (PG); los demás son fosfolípidos adicionales que están en menor proporción en membrana de plantas y se encuentran en organelas específicas.

Fosfatidilglicerol (PG) y difosfatidilglicerol (DPG)

La estructura de PG fue descrita como 1,2-diacil-sn-glicerol-3-(fosfo-1',sn-glicerol) por Benson y Mauro en 1958. Se presenta en membranas extraplastídicas como retículo endoplásmico (RE), membrana plasmática (MP) y mitocondria en la mayoría de las especies de plantas conteniendo ácidos grasos trans (16:1δ3 trans), siendo ausente de los otros lípidos. El DPG fue aislado primero de músculo de corazón en bovino, después en otros tejidos y finalmente en plantas. El DPG se encuentran en el interior de la membrana mitocondrial (Bligny y Douce, 1980); esta estructura fue determinada como 1-3-bis (sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol por MacFarlane *et al.* (1958).

Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE) y Fosfatidilserina (PS)

La fosfatidil colina (PC:1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina) ha sido aislada de huevo y de tejido de cerebro, y denominada también como lecitina (Gobley, 1874). La fosfatidiletanolamina (PE: 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina) y la fosfatidilserina (PS:1,2-diacil-sn-glicerol-3-(fosfo-L-serina), llevan un grupo amino primario encontrándose en lípidos aislados de tejido de cerebro (cefalin) por Folch (1942). Estas estructuras están relacionadas porque tienen anclado un aminoalcohol con cabeza polar de colina, etanolamina o L-serina respectivamente. Además, ha sido mostrado que pueden intercambiarse por reacciones enzimáticas para sufrir un cambio de bases (PS y PE), o descarboxilación (PS y PE) y metilaciones (PE y PC).

La clase de fosfolípidos más abundante en muchos organismos incluyendo plantas son PC y PE, estos dos esfingolípidos siempre se encuentran juntos conformando el 50 % de glicerolípidos en membranas extraplastídicas como lo es la membrana plasmática, la mitocondrial, la del tonoplasto y la del Golgi; mientras que la PS representa menos del 1% de glicerolípidos.

Fosfatidilinositol (PI).

Fue descubierto en soya por Klenk y Sakalli en 1939, y fue su estructura determinada como 1,2-diacil-sn-glicerol-3-(fosfo-1-D-mio-inositol) por Pizer y Ballao en

1959. El PI fue detectado en niveles mínimos en todas las células membranales de plantas. Se ha mostrado que en membrana plasmática y retículo endoplasmático juegan un rol en la transducción de señales.

3.3 Esfingolípidos

Los esfingolípidos se han encontrado en todos los animales, plantas y hongos. Encontrándose comúnmente en la membrana, son también constituyentes de las lipoproteínas. Los esfingolípidos contribuyen a la formación de regiones membranales denominadas microdominos o balsas lipídicas, que son regiones enriquecidas en algunos receptores, transportadores y otras proteínas, especialmente las ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Borner *et al*, 2005).

Estructura

Los esfingolípidos son el segundo grupo de lípidos membranales después de los glicerofosfolípidos y contienen en su esqueleto el amino-alcohol de cadena larga o base de cadena larga (BCL) llamada esfingosina (1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno) y que en plantas puede ser variable. Los carbonos 1, 2 y 3 de esta molécula son portadores de grupos funcionales (NH_2 , OH) y cuando se une al Carbono 2 un ácido graso saturado o insaturado de cadena larga por medio de un enlace amida, se obtiene una ceramida, la cual es la unidad estructural fundamental de todos los esfingolípidos (Stryer, 2003).

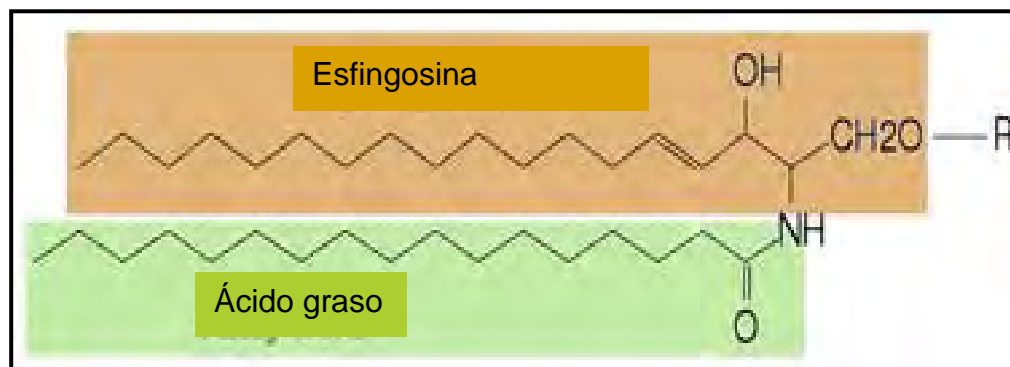


Figura.3 Estructura de un esfingolípido complejo.

Todos los esfingolípidos poseen tres componentes básicos característicos: la molécula de un ácido graso, la de la LCB y un grupo o cabeza polar (grupo R) (Fig.3). Se encuentran presentes en cantidades especialmente altas en los tejidos nervioso y cerebral.

Los esfingolípidos son lípidos complejos anfipáticos y extraordinariamente diversos, cuyas estructuras van desde las más simples como las de las bases esfingoideas, también llamadas bases de cadena larga o LCB, pasando por las de las ceramidas y llegando a las de los esfingolípidos complejos; encontrándose principalmente en la parte extracelular de la membrana (Stryer, 2003). Reportes de esfingolípidos en plantas indican que los presentes en mayor proporción son la glucosilceramida (GlcCer) y esfingolípidos derivados del inositolfosforilceramida (IPC) (Fig. 4) (Lynch *et al.*, 2003).

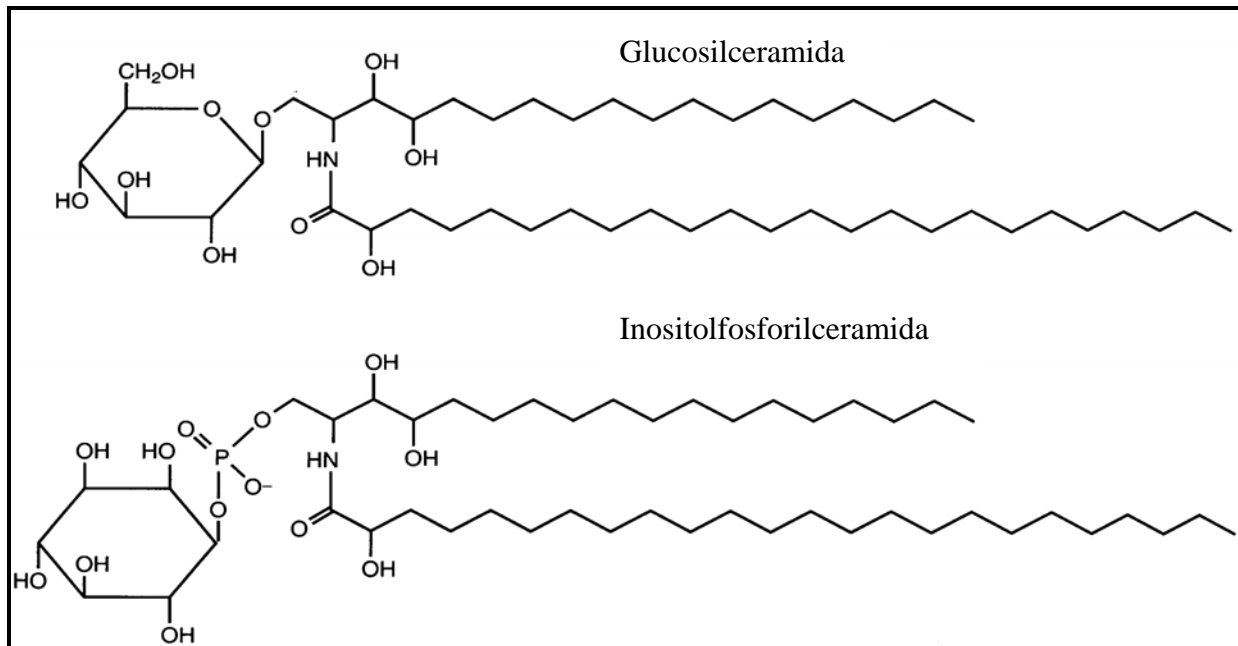


Figura 4. Estructura de esfingolípidos complejos reportados en plantas (Lynch *et al.*, 2003).

Los esfingolípidos son también miembros de sistemas señalización y activación de algunos receptores de la membrana plasmática. La activación del receptor por

agonistas modifica la concentración de ceramidas o esfingosina 1- fosfato; estos productos pueden activarse o inhibir algunos blancos como lo son: proteína cinasas, fosfatasas de las fosfoproteínas y otras, que son importantes para el mantenimiento y control celular (Merril y Sandhoff, 2002). Ejemplo de algunos agonistas son la utilización de toxinas Fumonisina B₁ y AAL que son producidas por los hongos *Fusarium verticillioides* y *Alternaria alternata*, ambas toxinas llevan a una acumulación de esfinganina y 4- hidroxiesfinganina (Lynch *et al.*, 2004).

El análisis cromatográfico de *Arabidopsis thaliana* ha revelado la presencia de diferentes tipos de esfingolípidos importantes entre los que destacan: un esfingolípido aniónico importante nombrado hexosa-hexurónico-.inositolfosfoceramida, esfingolípidos neutros como: monohexosilceramida, y en menor cantidad ceramida; y los esfingolípidos polares donde el principal es *N*-acetil-hexosamina-hexurónico-inositolfosfoceramida (Markham *et al.*, 2006).

Estructuras de Bases de Cadena Larga (BCL)

Las BCL típicas de plantas contienen 18 átomos de carbonos (C18) y son sintetizadas a partir de la condensación de la serina y la palmitoil-CoA, reacción catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT) (Dietrich *et al.*, 2008).

Tanto las BCL como los ácidos grasos, componentes de los esfingolípidos varían en longitud, número y posición de insaturaciones e hidroxilaciones (Fig. 5). La variedad en cada uno de los componentes de estos lípidos genera una gran riqueza combinatorial que se expresa en su heterogeneidad, estimándose más de 300 formas diferentes de estos lípidos complejos (Kolter *et al.*, 2002).

En hojas de plantas la fracción de las glucosilceramidas esta enriquecida en bases de cadena larga trihidroxiladas, isómeros *cis* (*Z*) y 4-hidroxi-8- esfinganina, así como en ácidos grasos de 20-26 átomos de carbono, algunos de los cuales presentan hidroxilaciones (hidroxipalmítico). Sin embargo, las BCL más frecuentes son las que tienen 22 átomos de carbono (C22) en su estructura sin presentar alguna insaturación (Lynch y Dunn, 2004). Otros análisis muestran que las BCL se encuentran enriquecidas

de forma diferente dependiendo de la especie; en *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, predominan en un 95 % las BCL trihidroxiladas, mientras que en fracciones de esfingolípidos neutros, un 65 % (Markham *et al.*, 2006). Para el caso de mamíferos, la BCL predominante es la E-esfing-4-ina (esfingosina, d18:14), y para el caso de *Sacharomyces cerevisiae* se encuentra la 4 hidroxiesfinganina o fitoesfingosina (Sperling y Heinz, 2003).

Ya que las bases esfingoideas son estructuralmente variables pueden presentar diferentes interacciones con las proteínas de la membrana plasmática para llevar a cabo funciones importantes y específicas para la célula. La hidroxilación de los esfingolípidos tanto en la parte del ácido graso como en la de la BCL contribuye a que estos lípidos se enlacen con otros y con proteínas mediante puentes de hidrógeno, favoreciendo la formación de dominios lipídicos en la membrana, conocidos como microdominios membranales.

Biosíntesis de Esfingolípidos.

Hay dos vías principales por las que se puede generar ceramida: la síntesis de novo (Fig 6), se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. La vía se inicia por la condensación de la serina y la palmitoil-CoA para producir la 3-cetoesfinganina, reacción catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT), complejo heterodimérico que consta de dos subunidades: LCB1 y LCB2, localizado en el RE. La 3-cetoesfinganina se reduce primeramente a esfinganina o dehidroesfinganina por la enzima 3-cetoesfinganina reductasa y es acilada entonces por la ceramida sintasa (Shi Lihua, 2007). La dihidroceramida generada es desaturada para generar ceramida, la cual sirve como precursor para la síntesis esfingomielina y otros esfingolípidos complejos como cerebrósidos y gangliósidos, que se forman por la adición de sustituyentes hidrofílicos específicos en la posición C1 de la ceramida (Sánchez y Laviada, 2006).

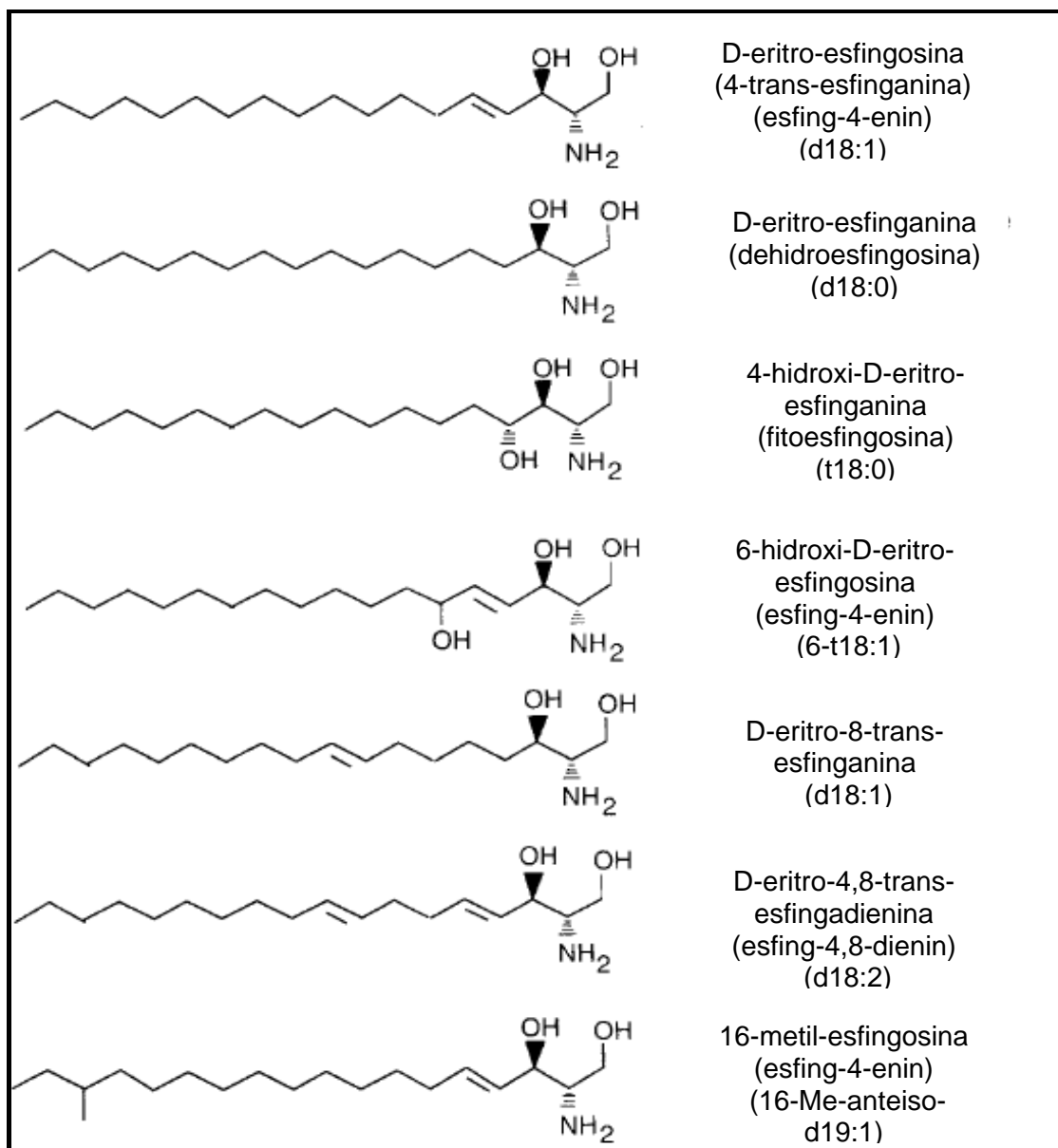


Figura 5. Estructuras de LCB encontradas en plantas (Merrill y Sandhoff, 2002)

Síntesis y modificaciones enzimáticas de BCL

El estudio sobre el metabolismo, función, biosíntesis de las BCL, así como la identificación de genes involucrados en su metabolismo, se ha realizado primeramente en *S. cerevisiae* y posteriormente en plantas en donde se ha presentado una gran diversidad de estructuras (Kazayuk *et al.*, 2007).

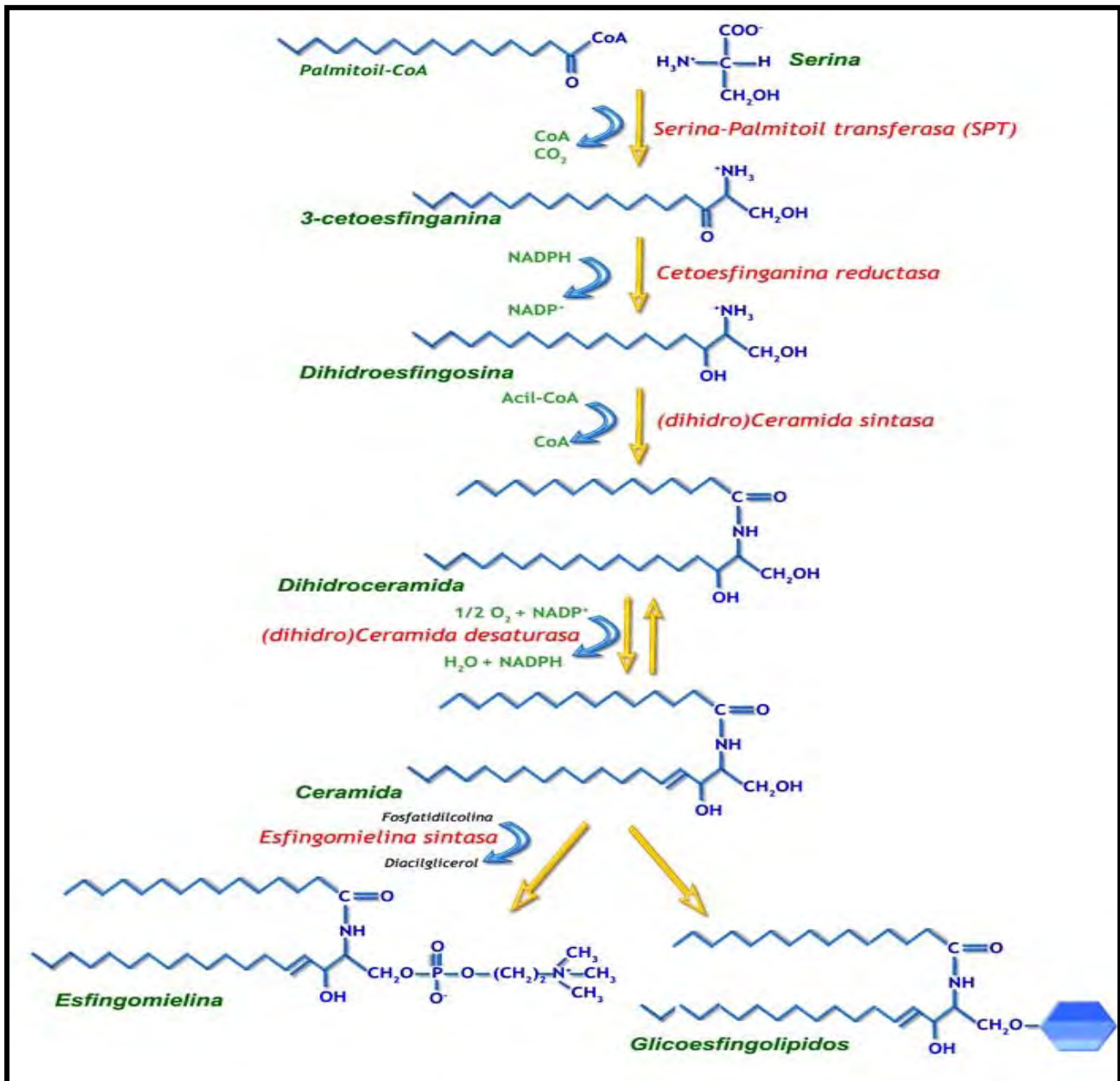


Figura 6. Diagrama de síntesis de *novo* de esfingolípidos (Sterin-Speziade y Leocata, 2007)

Cabe mencionar que las enzimas involucradas en el metabolismo de esfingolípidos en plantas están poco estudiadas y muchas de estas enzimas pierden actividad (Ej. cuando son solubilizadas por detergente), por lo tanto muy pocas de estas enzimas se han purificado. Sin embargo, la mayoría de los genes se han clonado y

expresado en levadura (Lynch y Dunn, 2003). Recientemente en plantas también se han generado mutantes en algunas de las enzimas de la vía de síntesis de esfingolípidos (Chen *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae* y en plantas se han observado cambios en la estructura de ceramida, esta modificación puede ser desde el cambio en la longitud de cadena, metilación, inserción de grupos adicionales (Ej. hidroxilos) y grados de insaturación. Las especies moleculares de residuos de ceramida han mostrado que la combinación de BCL y ácidos grasos ocurre de manera natural para los esfingolípidos complejos (Kazayuk *et al.*, 2007).

El camino metabólico para la síntesis de esfingolípidos consta de 3 pasos:

- 1.- Síntesis
- 2.- Conversión de ceramida a esfingolípidos complejos
- 3.- Modificación de BCL y de cadenas aciladas.

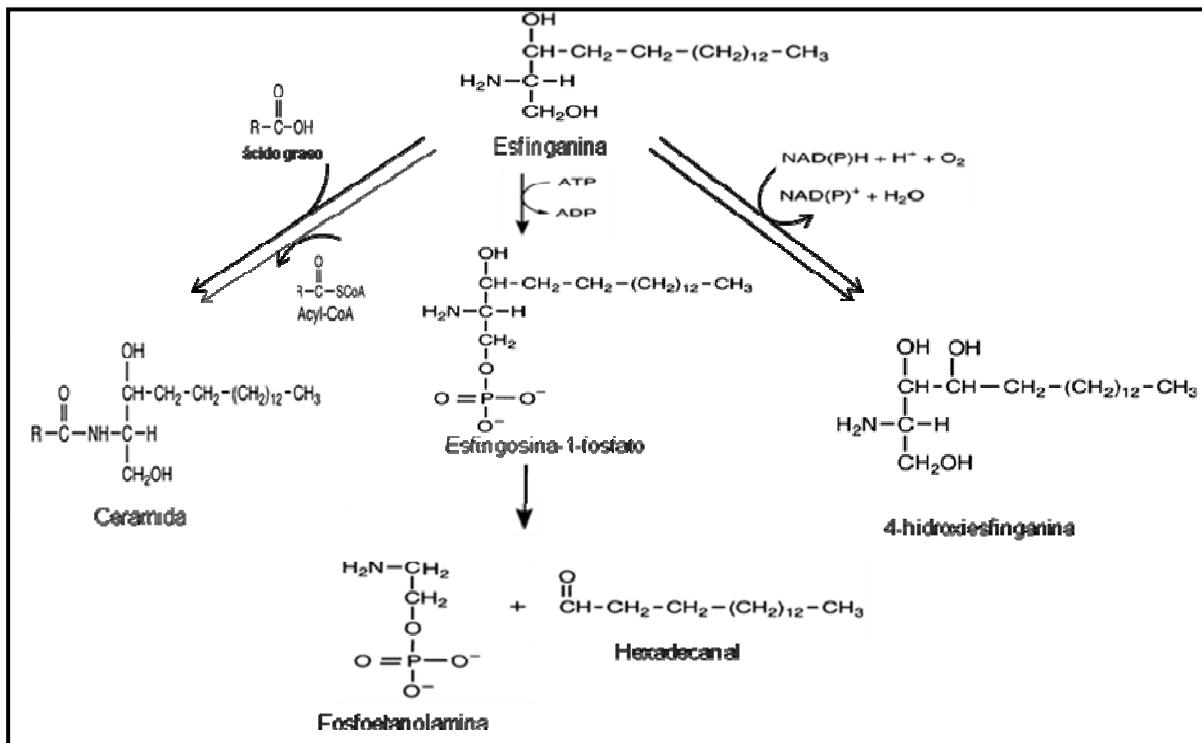


Figura 7. Productos formados a partir de la esfingina (Lynch y Dunn, 2003)

La síntesis de esfinganina implica 2 reacciones catalizadas secuencialmente por la serina palmitoil transferasa (SPT) y la reductasa 3-cetoesfinganina (3KSR). La SPT cataliza la condensación de la serina con la palmitoil CoA. La actividad de la SPT en tejidos vegetales localizado en el RE exhibe una preferencia fuerte por la palmitoil-CoA con una base de cadena larga C-18, piridoxal 5-fosfato. El producto es la ceto-esfinganina, que es actuada por una reductasa que utiliza NADPH para formar a la esfinganina. Formada la esfinganina, tiene 3 destinos posibles (Fig.7):

- 1.- Puede ser acilada para formar ceramida, que es sustrato para la síntesis de lípidos complejos.
- 2.- Fosforilarse para formar esfingosina-1-fosfato (S1P)
- 3.- Hidroxilarse para formar la 4-hidroxisfinganina.

La síntesis de ceramida implica la formación de un enlace a la amida en la vía de condensación de una cadena grasa-acilada con el grupo amino de la BCL. Hay dos mecanismos de síntesis de ceramida debido a 2 diferentes mecanismos enzimáticos (Lynch y Dunn, 2003) que utilizan:

- 1.- Un acil-CoA que utiliza como donante un grupo acil y que es catalizado por la esfinganina-*N*-aciltransferasa (SAT) o bien
- 2.- Un ácido graso libre como sustrato y que es catalizado por la ceramida sintasa (CS).

Sin embargo, en el primer mecanismo, la enzima parece tener una alta especificidad por el sustrato, desempeñando un papel importante en la determinación de la composición de la cadena acilada de la glucosilceramida (GlcCer) de diversos tejidos vegetales (longitud de la cadena de 16-24 átomos de carbono y distribución de los grupos hidroxilo en la GlcCer). En el segundo caso, la actividad de la CS muestra una actividad mayor con el ácido palmítico y una actividad baja con los ácidos esteárico, oleico o lignocérico; esta actividad enzimática es estimulada por la adición de D-eritro-esfinganina y esfingosina (Lynch y Dunn, 2003).

Mientras que la acilación de la esfinganina para formar ceramida es crítica para la síntesis de esfingolípidos complejos, el catabolismo de la esfinganina y otras BCL

comienza con su fosforilación, catalizada por la esfinganina cinasa o BCL cinasa (SK/LCBK) en Golgi y RE. La reacción inversa la lleva a cabo una fosfatasa o bien una liasa, produciendo un aldehído de cadena larga que es posteriormente convertido a un ácido graso y a fosfoetanolamina. La actividad de la esfinganina cinasa sugirió que también fosforilaba a la esfingosina debido a estudios encontrados en maíz (Lynch y Dunn, 2003).

Las otras dos modificaciones químicas que sufren las BCL en plantas, la insaturación (en las posiciones 4 y 8), y la hidroxilación son catalizadas por tres tipos de actividades enzimáticas (Fig.8):

- 1.- $\Delta 8$ -desaturasa
- 2.- $\Delta 4$ -desaturasa
- 3.- C-4 hidroxilasa

En animales, la $\Delta 4$ -(E)-desaturación ocurre en la cara citosólica de la membrana del RE a nivel de la N-acilación de la esfinganina, requiriéndose NADPH o NADH y oxígeno molecular como cofactores, mientras que el CN, Cu^{2+} , ditiotretol y anticuerpos específicos inhiben la actividad de $\Delta 4$ -(E)-desaturasa (dihidroceramida desaturasa) (Kazayuk *et al.*, 2007).

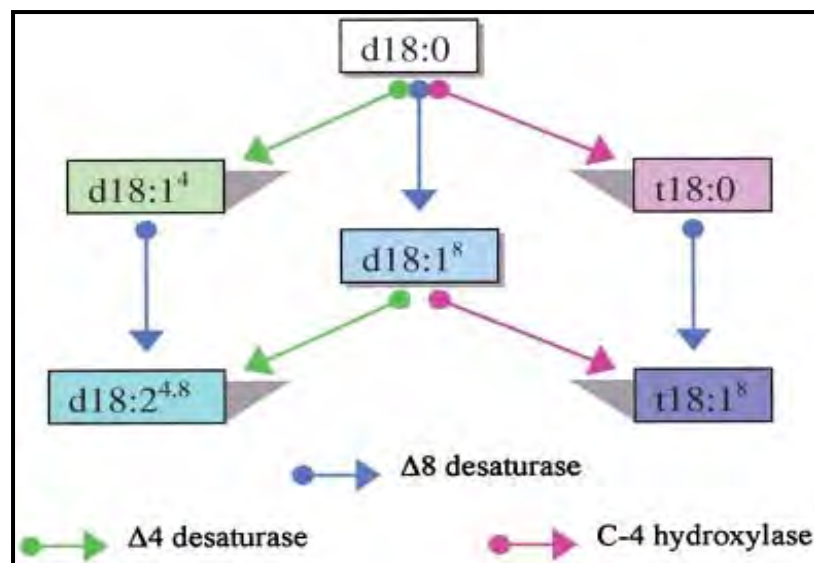


Figura 8. Modificaciones químicas en BCL por formación de dobles ligaduras y por hidroxilación enzimáticas (Lynch y Dunn, 2003).

La desaturación de BCL en la posición $\Delta 8$ de la cadena no es detectable en mamíferos y levadura pero sí en plantas (ej. *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Borago* y *Aquilegia vulgaris*) (Lynch y Dunn, 2003).

La hidroxilación se lleva a cabo directamente sobre la esfinganina. La actividad de la hidroxilasa está asociada al RE. Las BCL trihidroxiladas están presentes en esfingolípidos complejos, pero la 4-hidroxiesfinganina al parecer no es sustrato para la SAT (Lynch y Dunn, 2003).

Las modificaciones químicas se hacen a partir de sustratos específicos y de ciertas reacciones seleccionadas generando los perfiles moleculares distintos de esfingolípidos complejos. Mientras que en la esfingosina ocurre la hidroxilación libre, en las BCL sucede la hidroxilación y la desaturación, posteriormente la formación de la ceramida (Fig. 9) (Lynch y Dunn, 2003).

Mientras que en arroz hay cinco genes que codifican para las respectivas enzimas hidroxilasas, en *Arabidopsis thaliana* hay dos genes para las enzimas *SBH1* y *SBH2* que catalizan la reacción de hidroxilación específicamente en el carbono de la posición 4 de las BCL (BCL C-4). La función de estos dos genes fue establecida a través de la generación de mutantes simples (en uno de los dos genes de las dos hidroxilasas) o de mutantes dobles (mutantes en los dos genes de las hidroxilasas). Las mutantes que se generaron fueron de dos tipos: mutantes de inserción de T-DNA y mutantes de supresión por RNA de interferencia (RNAi). A partir de los experimentos con las mutantes anteriores se observó que las plantas deficientes en la hidroxilación de BCL presentaban una reducción marcada en el crecimiento y pequeñas zonas necróticas. En el caso de la mutante doble, ésta sufría una muerte prematura. A nivel celular se encontró que las mutantes presentaban células menos alargadas y un menor número de células meristemáticas. A nivel molecular se observó que la baja de bases trihidroxiladas en las mutantes aumentaba la proporción de otras bases, especialmente de esfinganina, así como la transcripción de genes de defensa y la disminución en algunos glicerolípidos. Todos estos efectos llevan a la conclusión de que la hidroxilación

de las bases de cadena larga de los esfingolípidos son esenciales para la viabilidad, el crecimiento y la regulación del metabolismo de glicerolípidos (Chen *et al.*, 2008).

Con respecto a las funciones membranales de los esfingolípidos trihidroxilados, hay un reporte en el que a partir de una mutante de levadura en un gen responsable de la hidroxilación en la base esfingoídea del C4 (*sur2Δ*), se aislaron membranas resistentes a la solubilización por detergente. Esta preparación que estaba enriquecida en glicolípidos, esfingolípidos y esteroides, presentó cambios tanto en la densidad y morfología como en la fluidez y estructura. En relación con esta última, la preparación no presentó las estructuras vesiculares y curvadas típicas, en su lugar aparecieron estructuras lineales con longitudes diferentes. Sin embargo, dos proteínas típicamente asociadas a balsas, la Gas1p (una proteína anclada a GPI) y la Pma1p (una ATPasa de H⁺), no cambiaron su distribución en las membranas resistentes a la solubilización por detergente obtenidas de la mutante (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004).

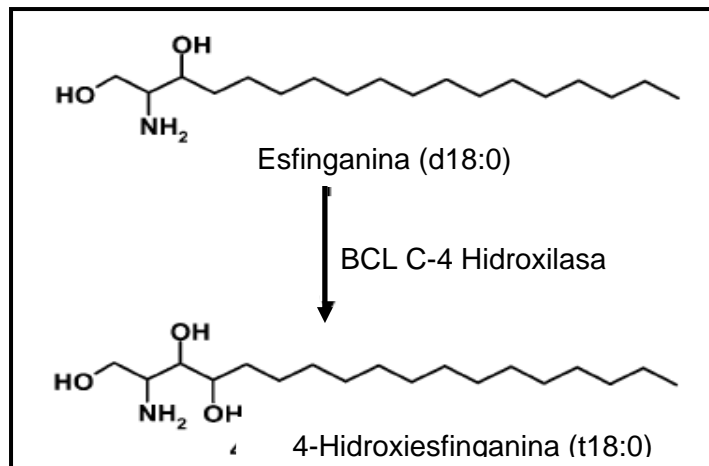


Figura 9. Modificaciones en BCL por efecto de la hidroxilasa $\Delta 4$ en *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 2008)

Funciones de Esfingolípidos.

Los esfingolípidos se han revelado recientemente como elementos clave en las cascadas de transducción de señales que regulan procesos importantes de la fisiología celular tales como crecimiento, diferenciación y muerte celular. Los esfingolípidos tienen

doble papel como moléculas bioactivas: por un lado, actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, pero además, regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las membranas llamados balsas lipídicas o lipid rafts (Sánchez y Laviada, 2006).

Los principales esfingolípidos bioactivos incluyen, ceramida, esfingosina, ceramida-1-fosfato y esfingosina-1-fosfato en células animales. Entre todos ellos destaca la ceramida, que es el centro de la ruta de síntesis y degradación de esfingolípidos y se podría considerar como regulador del destino celular. Por un lado, la generación de ceramida por estímulos de estrés, activa rutas encaminadas a producir la muerte celular, pero por otro lado su transformación en ceramida 1-fosfato (C-1P) o en esfingosina y posteriormente en esfingosina 1-fosfato (S-1P) activando vías mitogénicas y regulando, diferenciación y proliferación celulares (Sánchez y Laviada, 2006). Las BCL fueron las primeras en demostrar su función como moléculas bioactivas (Lynch y Dunn, 2004). La glucosilceramida es un lípido abundante que forma parte de la membrana plasmática y del tonoplasto en células de plantas. También existen esfingolípidos glicosilados complejos como lo es la inositolfosforilceramida, que son incluidos en estudios de perfiles lipídicos en órganos de plantas y organelos membranales (Sperling *et al.*, 2005).

3.4 Esteroles

El tercer grupo de lípidos de las membranas está constituido por los esteroles, que son moléculas que se insertan entre los otros lípidos en ambas monocapas de la membrana (Stryer, 2003). Las moléculas de esteroles confieren una mayor cohesión a las membranas aunque disminuyen su flexibilidad. Las membranas de las plantas carecen de colesterol, pero tienen otros esteroles como estigmasterol, sitosterol, lanosterol, etc. (Horton, 1995; Stryer, 2003). Las moléculas de colesterol son pequeñas y más hidrófobas en comparación con otros lípidos. El grupo hidroxilo se dispone hacia el exterior de la membrana (interactuando con el agua) (Fig.10).

El colesterol es un factor importante en la fluidez y permeabilidad de la membrana, ya que ocupa los espacios que dejan las estructuras de otros lípidos membranales. A mayor cantidad de colesterol, menos permeable y fluida es la membrana (Stryer, 2003).

Los esteroides también pueden participar en el control de procesos metabólicos asociados a la membrana. Por otra parte, los esteroides son precursores de compuestos implicados en el desarrollo y procesos celulares en animales (hormonas, esteroides, ácidos biliares). En el caso de plantas, los esteroides son substratos para la síntesis de gran número de metabolitos secundarios (Ej.: cardenolidos, glucoalcaloides, derivados del pregnano y saponinas) (Hartmann, 1998).

La nomenclatura de esteroides se basa en gran parte en la recomendación de IUPAC-IUB 1989 (Fig.5)

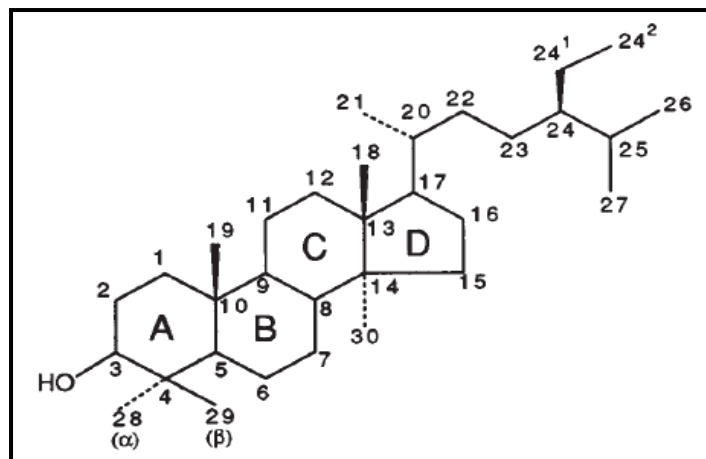


Figura 10. Estructura básica de un esteroide numerando el carbono estándar recomendado por IUPAC-IUB (Hartmann, 1998).

En plantas la biosíntesis de esteroides comprende más de 30 reacciones catalizadas por enzimas que se encuentran en su mayor parte en RE. Todos los tejidos vegetales pueden formar sus propios esteroides, las variaciones estructurales que resultan de diversas substituciones en la cadena lateral así como en el número y posición de nuevos enlaces generan una mezcla de compuestos con propiedades

diferentes. En cuanto a su distribución celular la membrana plasmática tiene mayor proporción de esteroides y en el RE, tonoplasto y membranas mitocondriales el contenido es menor (Hartmann, 1998).

3.5 Ácidos Grasos

Dos de las clases de lípidos que forman las membranas, los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos, contienen en su estructura ácidos grasos.

Los ácidos grasos constan de cadenas hidrocarbonadas de longitud y de grado de insaturación variables, en ocasiones con hidroxilaciones y que terminan en grupos carboxilo. Los ácidos grasos están ionizados a pH fisiológico, y, por tanto, es más adecuado referirse a ellos como carboxilatos: ejemplo, palmitato y hexadecanoato (ácido palmítico). Las cadenas de ácidos grasos en los sistemas biológicos contienen normalmente un número par de átomos de carbono, generalmente entre 14 y 24. Sin embargo, hay una gran variedad de ellos, que difieren en su longitud, número y posición de las insaturaciones e hidroxilaciones (Stryer, 2003).

Las propiedades de los ácidos grasos y sus derivados lipídicos dependen de la longitud de su cadena y del grado de insaturación. Las longitudes de la cadena de los ácidos grasos y sus derivados cuando se encuentran rodeados de ácidos grasos más cortos y las insaturaciones aumentan la fluidez de las membranas (Stryer, 2003).

4. La Membrana Plasmática de células vegetales

La membrana plasmática o plasmalema de las células vegetales tiene las mismas características estructurales y funcionales que tienen las membranas de cualquier organismo vivo: es una lámina continua y formada por dos monocapas de fosfolípidos que se contraponen entre sí y en la que se insertan, en mayor o menor profundidad, proteínas. También existen carbohidratos asociados a la parte hidrofílica de estos lípidos y proteínas. La fuerza que mantiene unido y estable a este arreglo supramolecular se deriva de las interacciones hidrofóbicas entre los lípidos y las porciones hidrofóbicas de las proteínas membranales. Al igual que todas las

membranas, las dos monocapas son asimétricas en composición, es decir, tienen los mismos elementos lipídicos, pero en diferente proporción, así como en cuanto a las regiones proteicas, que no son idénticas en ambos lados de la membrana (Leshem., *et al*, 1992). Los elementos estructurales que integran a la membrana plasmática le confieren sus propiedades y sus funciones. La parte lipídica le permite actuar como una envoltura impermeable al medio acuoso, pero con propiedades de microviscosidad y fluidez esenciales para que la membrana sea una estructura dinámica y plástica (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Dentro de las proteínas que se encuentran en la membrana plasmática están las proteínas integrales y periféricas. Prácticamente todas las primeras atraviesan la membrana, mientras que las últimas están asociadas a uno u otro lado de la membrana. Las funciones de las proteínas de la membrana plasmática en células vegetales son variados: enzimáticas, de translocación de iones y de unión de ligandos (Gutiérrez *et al.*, 2001) (Fig.11).

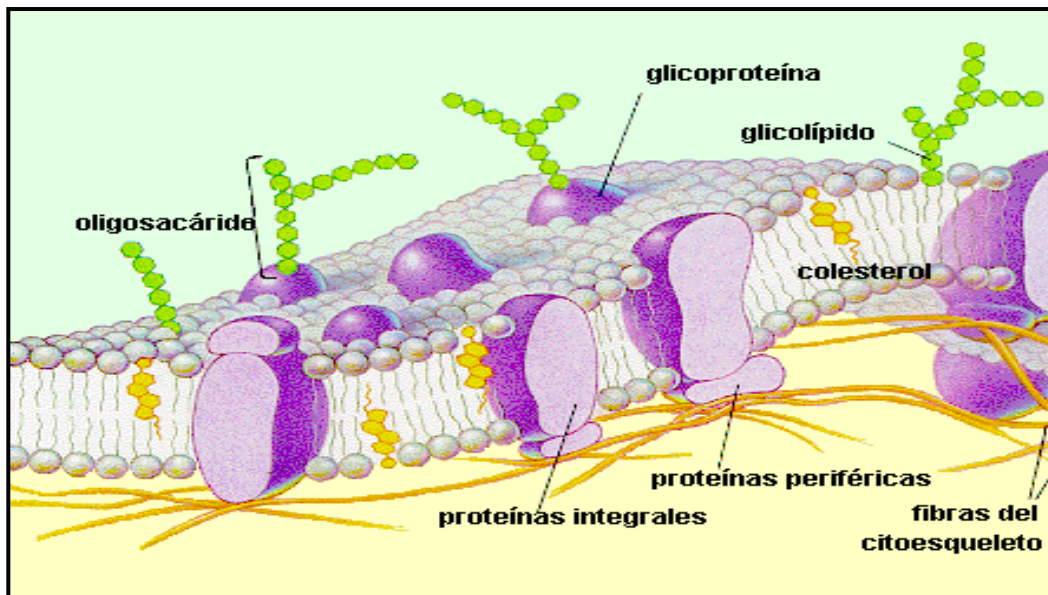


Figura 11. Modelo de la estructura de una membrana biológica

Al igual que todas las membranas celulares, la membrana plasmática de las células vegetales es una estructura continua y dinámica cuyos componentes (lípidos y

proteínas) juegan papeles fundamentales en la fisiología de la planta, como los que suceden en las etapas iniciales de una infección por patógenos, donde la implementación de la respuesta de defensa, requiere de la participación de componentes específicos ubicados en la membrana (Gutiérrez *et al.*, 2001). Las interacciones que se generan entre el patógeno y la membrana plasmática de la célula vegetal están escasamente estudiadas. Causa de ello es la dificultad experimental de acceder libremente a los espacios intracelulares y de obtener fracciones subcelulares (en especial la de la membrana plasmática), con una buena integridad (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Cuando el patógeno hace contacto con la membrana plasmática de la célula hospedera, se desencadenan en ésta un gran número de reacciones en las que se ven involucrados dos de los constituyentes más abundantes de la membrana: los lípidos y las proteínas. Éstos experimentan cambios en sus funciones de transporte de iones, actividad enzimática, unión a moléculas del patógeno de forma específica, etc. Es en la membrana en donde se perciben los primeros indicios de la presencia del patógeno y también en donde se generan los primeros eventos de los mecanismos que la célula implementa para responder al patógeno y que desembocan, o bien en una respuesta con el patrón de la enfermedad, o bien de resistencia a la misma (Gutiérrez *et al.*, 2001).

5. Balsas lipídicas o microdominios membranales

Se ha descrito que las membranas biológicas no tienen una homogeneidad de sus componentes lipídicos y membranales, sino que hay ciertas regiones que están enriquecidas en esfingolípidos y esteroides y que también contienen proteínas específicas (Fig. 12). Estas regiones tienen características fisicoquímicas diferentes a las del resto de la membrana: el mayor ordenamiento molecular y a la rigidez de sus componentes (dada justamente por la estructura de los esfingolípidos y los esteroides) se traduce en una menor fluidez (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Los microdominios participan en muchos procesos celulares (migración, adhesión), señalización celulares de proteínas tipo, sitios de reconocimiento para patógenos y toxinas (Morel *et al.*, 2006f).

Una de las formas de estudiar estas regiones es aislando membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM) (Carmona Salazar, 2006). Hasta ahora se han aislado DRM de plantas en las especies de tabaco; *Nicotiana tabacum* (Peskan *et al.*, 2000, Mongrand *et al.*, 2004), y *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2005), *Solanum tuberosum* (Morel *et al.*, 2006), *Nicotiana Excelsior* (Morel *et al.*, 2006), *Medicago truncatula* (Lefebvre *et al.*, 2007), por mencionar solo algunas. En plantas, la única función que se ha sugerido es la de servir como plataformas en las que se concentran elementos de defensa contra patógenos (Gutiérrez *et al.*, 2001).

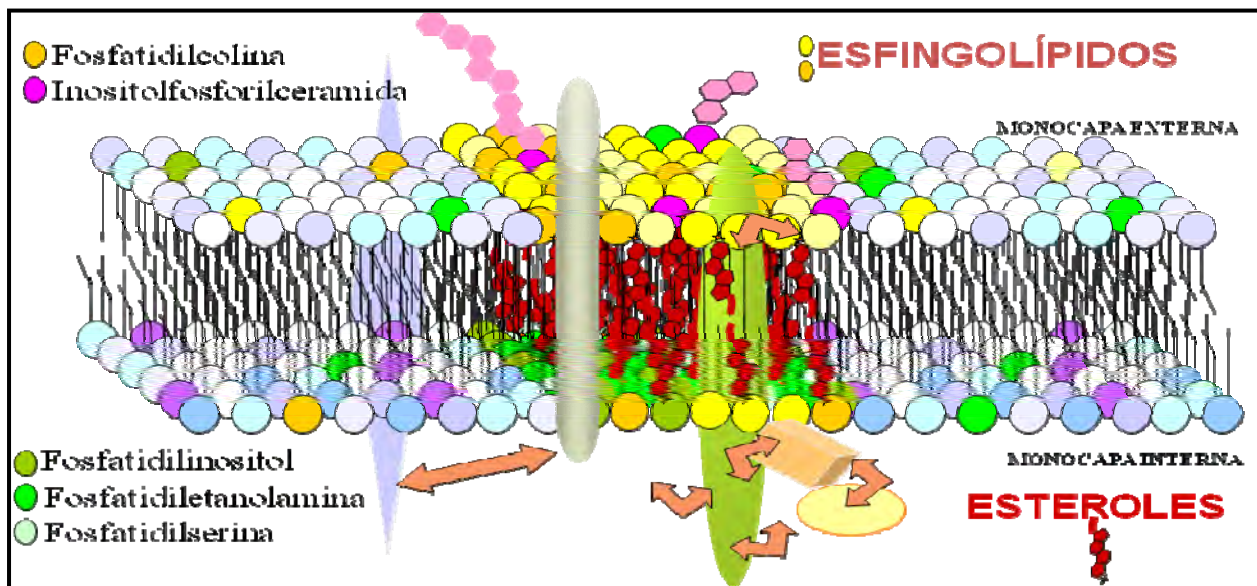


Figura 12. Modelo de estructura de balsas lipídicas en la membrana plasmática de plantas (Carmona, 2007)

6. Asociación de proteínas con esfingolípidos membranales

Los microdominios tienen proteínas específicas que pueden ser reclutadas selectivamente para desempeñar funciones específicas en estas regiones. Las proteínas que se encuentran en los microdominios pueden ser proteínas integrales (que

contienen una parte de su estructura en la región hidrofóbica de la membrana), proteínas periféricas (que se asocian sólo con la parte hidrofílica de la membrana) o bien proteínas ancladas a lípidos como residuos de ácido palmítico, de geranyl-geranyl o de farnesil o a glicosilfosfatidilinositol (GPI). En plantas, las proteínas GPI se han encontrado mayoritariamente unidas a ceramidas (Fig.13) (Peskan *et al.*, 2000).

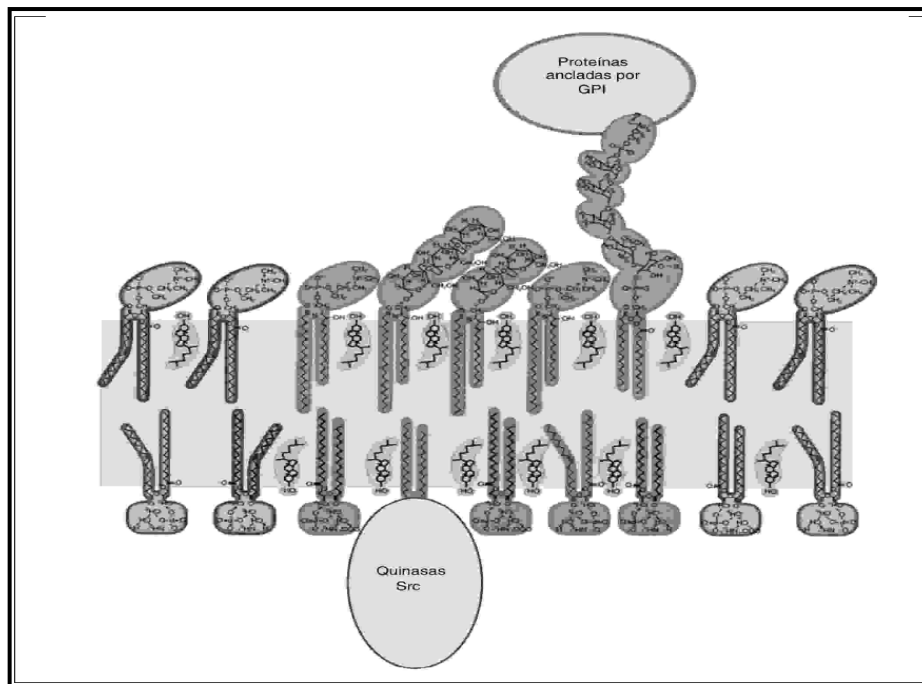


Figura 13. Asociación de proteínas ancladas a glicosil fosfatidil inositol (GPI) a microdominios membranales (Belmonte y Millan, 2001)

7. ANTECEDENTES INMEDIATOS

El presente trabajo se fundamenta en antecedentes directos derivados de experimentos de nuestro grupo de trabajo y que se mencionan a continuación:

1. Gutiérrez (2005) encontró que la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de embriones de maíz disminuía su actividad en condiciones en las que la concentración de la base de cadena larga esfinganina estaba incrementada y en la que los esfingolípidos complejos y la ceramida podrían estar disminuídos ya que los embriones estaban expuestos a la fumonisina B_1 , y esta disminuyo la síntesis de esfingolípidos.
2. Vázquez (2007, 2008), trabajando con hojas de Arabidopsis interpreto que el efecto encontrado por Gutiérrez (2005) podía deberse a que el aumento de esfinganina en la membrana plasmática perturbaba la interacción de ceramidas o esfingolípidos complejos con la ATPasa de H^+ o con lípidos como los esteroides que están asociados a la enzima y que modulan la actividad de la enzima.
3. Carmona (2006) encontró que las membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM) obtenidos de membranas plasmáticas mostraban diferente rendimiento y ultraestructura cuando los tejidos de embriones de maíz y hojas de frijol se exponían a un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos.

Las anteriores evidencias experimentales sugieren que los esfingolípidos son moléculas importantes en la estructura de la membrana plasmática, así como en la funcionalidad de sus proteínas, de tal manera que es posible suponer que cambios en la estructura química de los esfingolípidos como la hidroxilación de las bases de cadena larga, pueden tener un impacto en la estructura y en la función de la membrana plasmática. Por lo tanto es importante crear modelos experimentales que puedan explorar el papel de los esfingolípidos en la estructura de las membranas de plantas. En este trabajo de tesis lo anterior se abordará estudiando una mutante en una de las enzimas que hidroxilan a una de las partes estructurales de los esfingolípidos complejos.

8. HIPÓTESIS

La disminución en la hidroxilación de bases de cadena larga de los esfingolípidos afecta las características de la membrana plasmática.

9. Objetivo general

Aislar y caracterizar membranas plasmáticas de una línea de *Arabidopsis thaliana* mutante en el gene de una hidroxilasa de bases de cadena larga.

Objetivos particulares

A partir de una línea de *Arabidopsis thaliana* defectuosa en la hidroxilación de esfingolípidos complejos *Atsbh1-1* (SALK_090881) y de su control (ecotipo silvestre Col-0) se determinara:

- Los rendimientos en cada una de las fracciones subcelulares.
- La pureza de las membranas plasmáticas obtenidas.
- La ultraestructura de las membranas plasmáticas.
- Los perfiles electroforéticos de las proteínas de las membranas plasmáticas.
- La actividad de una proteína de la membrana plasmática (ATPasa de H⁺ de membrana plasmática).
- Los niveles de una enzima membranal (ATPasa de H⁺ de membrana plasmática) por inmunoréplica

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Material biológico

- Se utilizaron plantas de aproximadamente 2 meses de edad de dos líneas de *Arabidopsis thaliana*: una línea silvestre (Col-0) y una línea de defectuosa en la hidroxilación de BCL (*Atsbh1-1*), proporcionada por el Dr. E. B. Cahoon (Danforth Center, St Louis MO, EU), para obtener fracciones sub celulares.

10.2 Cultivo de las líneas de *Arabidopsis*

- Se germinaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0 y *Atsbh1-1*) en agar y se crecieron de acuerdo al siguiente procedimiento:
 1. Las semillas se colocan en un tubo ependorff y se le agrega 1 mL de NaHClO₄ al 20% (estéril) y 1 mL de Tween 20 (cf. 0.1%). Se agitan vigorosamente por 20 min.
 2. Posteriormente, las semillas se lavan con NaHClO₄ al 20% por 10 min con agitación suave.
 3. El tubo con las semillas se centrifuga por aproximadamente 10 seg y se elimina el NaHClO₄ con micropipeta usando siempre puntas estériles.
 4. Las semillas se enjuagan varias veces (mínimo 5 veces) cada vez con 1 mL de agua estéril y agitando suavemente durante 30 seg hasta eliminar completamente el NaHClO₄ y el Tween. Cada vez se centrifugan en la minifuga por 10 seg y se elimina el sobrenadante con una pipeta. Después del último lavado las semillas se resuspenden en agua estéril.
 5. Las semillas desinfectadas se siembran en cajas petri conteniendo el medio de Gamborg B-5/agar al 1% de preferencia en una campana de flujo laminar. El medio de Gamborg se prepara como se indica en la siguiente tabla.

Tabla I. Composición y preparación del medio sólido de Gamborg. Se indican las concentraciones finales.

Para preparar 1 litro de medio		
Medio de Gamborg SIGMA (G5893)	Agarosa 1%	Sacarosa 1%
3.2 g/L	10 g	10 g

6. Las cajas con las semillas sembradas se cubren con aluminio y se mantienen por 48 h a 4°C, posteriormente se pasan a la cámara de incubación a 22°C en un fotoperíodo de 16 h oscuridad y 8 h de luz.

7. Después de 2 semanas, las plántulas se trasplantan a macetas con sustrato hecho de la mezcla de Mix-4 Agreggate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canadá Ltd.), agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlanepantla, Edo. De México) y vermiculita (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canadá Ltd.). La proporción fue la siguiente 1 ½ de Mix-4, ½ de vermiculita y ½ de agrolita, humedecida con agua estéril. Se mantuvieron en el invernadero a 25°C con un fotoperíodo natural, entre 6 a 12 semanas (las plántulas fueron regadas cada tercer día).

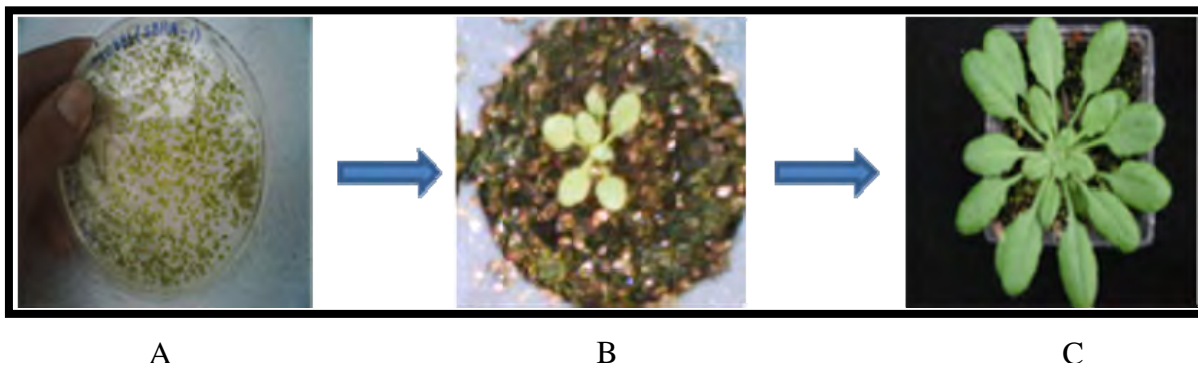


Figura 14. Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. A) Obtención de plántulas en agar B) trasplante de plántulas a tierra y C) plantas de 4 semanas de edad.

Al cabo de dos meses y medio se cosechan las hojas de las plantas. Para ello, sólo se utiliza la roseta (parte aérea) de las plantas, se les quitan los restos de sustrato con una brocha y se cortan con tijera las hojas adultas y las jóvenes de buen tamaño e

inmediatamente se sumergen en nitrógeno líquido. Se almacena el material biológico a -70°C hasta su uso.

10.3 Obtención de membranas plasmáticas

Una vez que fueron obtenidas las hojas correspondientes a las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*, se realizó la obtención de la fracción microsomal de cada una, según el método reportado por Packer y Douce (1987) y modificado por Sánchez-Nieto *et al.* (1997) y Carmona (2006).

A) La obtención de la fracción microsomal de las líneas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento mostrado en la Figura 14.

Las soluciones empleadas para la obtención de fracciones subcelulares de hojas de *Arabidopsis thaliana* se muestra en la Tabla II.

Para la preparación de los diferentes amortiguadores se usaron las siguientes soluciones concentradas:

-HEPES 500 mM ajustado a pH de 7.8 con BTP

-HEPES 500 mM ajustado a pH de 7.8 con Mes

-DTT 300 mM

-KH₂PO₄ 200 mM ajustado a pH 7.8 con KOH

-EDTA 100 mM ajustado a pH 7.8 con KOH

- KCl 50 mM.

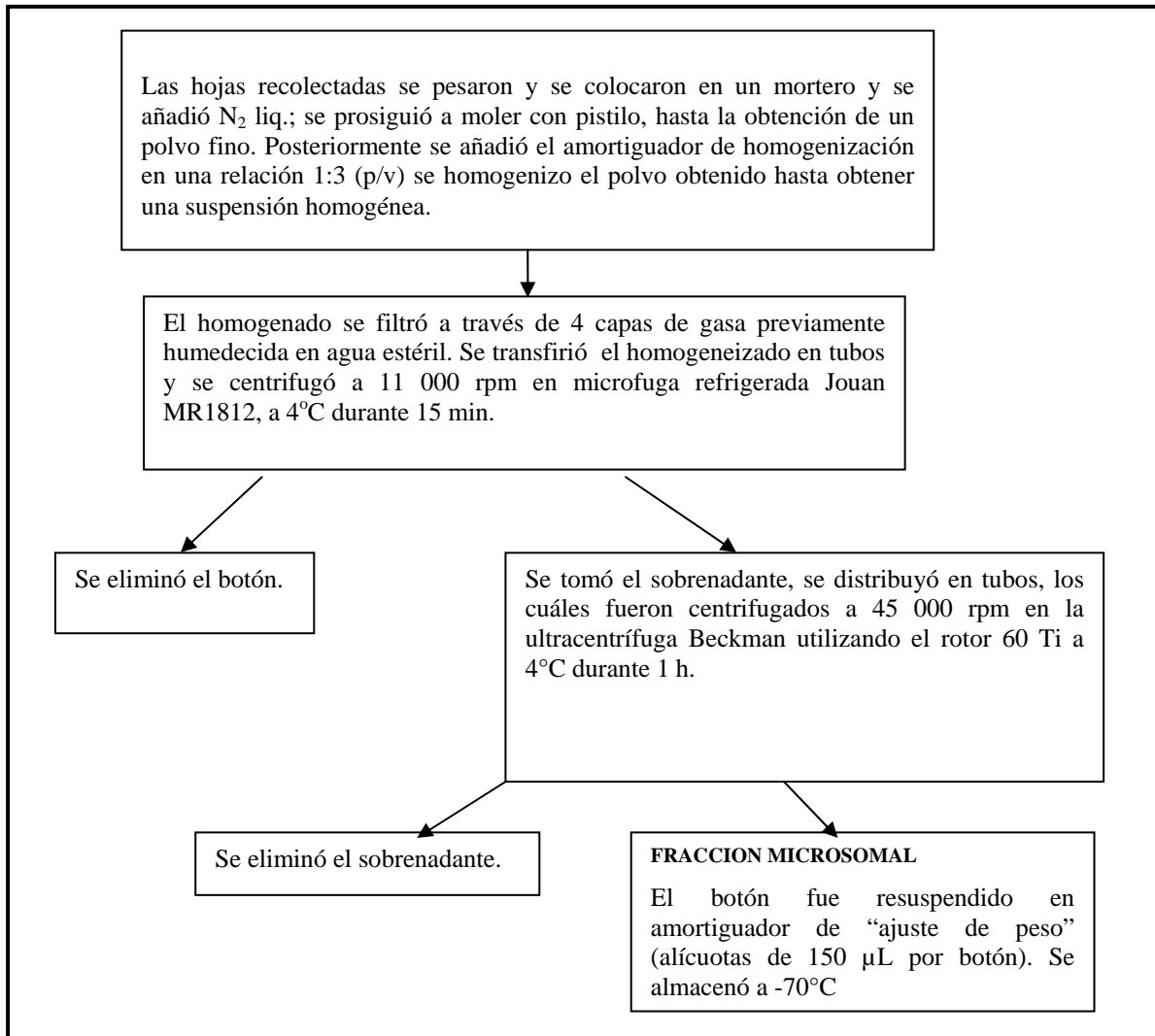


Figura 15. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Preparación del cocktail de inhibidores

Para la preparación del cocktail de inhibidores se utilizaron los siguientes reactivos (las concentraciones de los reactivos se muestran en la Tabla III).

- Quimostatina
- Leupeptina, Sigma (L2884-50MG)
- PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoruro), Biochemika (78830)

- TLCK (N-*p*-Tosyl-phenylalanine-Chloromethyl ketone), Sigma (T-4376)
- TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine-Chloromethyl-ketone), Sigma (T-4376)

Tabla II. Composición de amortiguadores para la obtención y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Amortiguador	Composición de la solución
De homogenización	Sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, β -mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, KCl 1 mM, PVP 0.6% , BSA 0.2% y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, o bien el preparado en el laboratorio) 1.6 μ g/mL
De resuspensión del botón microsomal (ajuste de peso)	Sorbitol 620 mM, KH_2PO_4 5mM, pH 7.8, DTT 1 mM, y EDTA 0.1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, o bien el preparado en el laboratorio) 1.6 μ g/mL
De resuspensión del botón de VMP (TNE)	NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 5 mM, pH 7.8 y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche o bien el preparado en el laboratorio) 1.6 μ g/mL
De lavado	Sorbitol 350 mM, HEPES/Mes 2 mM, pH 7.6, DTT 1 mM, KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche o bien el preparado en el laboratorio) 1.6 μ g/mL

Para la preparación del cocktail se partió de soluciones concentradas

- Leupeptina 4.204 mM

- Quimostatina 10.3 mM

Tabla III. Composición de soluciones empleadas para la preparación del cocktail de inhibidores de proteasas

Cocktail A		Cocktail B	
Reactivo	Concentración final	Reactivo	Concentración final
PMSF	0.1 mM	Leupeptina	0.01 mM
TLCK-HCl	0.1 mM	Quimostatina	0.01 mM
TPCK-	0.1 mM		

Peso molecular de los inhibidores

- PMSF 174.19 g/mol
- TLCK-HCl 369.31 g/mol
- TPCK 351.85 g/mol
- QUIMOSTATINA 604.7 g/mol
- LEUPEPTINA 475.59 g/mol

Pasos a considerar en la preparación.

1.- Se pesan el PMSF (0.087 g), TLCK (0.185 g) y TPCK (0.176 g) para preparar 50 mL y obtener una concentración 0.1 mM. Se disuelven en DMSO y se afora. Esta preparación corresponde al cocktail A.

2.- Se pesa por separado la Leupeptina para preparar 25 mL a una concentración de 4.204 mM, pesando 0.01 g/mL

3.- En el caso de la quimostatina se prepararon 4 mL, disolviéndose en DMSO, 0.05 g. Se alicuota en tubos eppendorf etiquetados.

A partir de las soluciones anteriores se hizo una mezcla para tener el cocktail final, agregando las siguientes proporciones a tubos eppendorf de 1.5 mL.

- 1 mL de cocktail A
- 50 μ L de la Solución de Quimostatina
- 50 μ L de la Solución de Leupeptina

Se etiquetan y se guardan a -20°C . Cada tubo preparado sirva para adicionarlos a 100 mL de amortiguador de homogenización, de ajuste de peso, de lavado, TNE, etc.

10.4 Obtención de membranas plasmáticas (VMP) de las fracciones microsomales.

Después de obtener la fracción microsomal se hizo la determinación de la concentración de proteína según el método descrito en el punto 10.5 de Materiales y Métodos, para continuar con la obtención de la preparación enriquecida en vesículas de membrana plasmática (VMP), y que se describe a continuación.

1.- Se prepararon las mezclas de fases así como el sistema de fases como se describe en la Tabla IV.

Tabla IV. Composición de las soluciones empleadas para preparar la mezcla de fases.

REACTIVOS	Mezcla de fases (concentración final)
Dextran T500	6.2%
Polietilenglicol (PEG)	6.2%
KH_2PO_4	5 mM
KCl	3 mM
DTT	1 mM
EDTA	0.01 mM
Sorbitol	620 mM

Para preparar la mezcla de fases se usaron las siguientes soluciones concentradas

- Dextran T500 al 20%
- Polietilenglicol (PEG) al 40%

-KH₂PO₄ 200 mM ajustado a pH 7.8 con KOH

-KCl 50 mM

-DTT 300 mM

-EDTA 100 Mm

2.- Se agregaron 10 mg de proteína a cada fase de acuerdo al método de partición de fases (Briskin *et al.* 1987, Larsson *et al.* 1994). Una vez depositada la proteína a los tubos con la mezcla de fases, se ajustó el peso de cada uno de los tubos, se mezcló por inversión 25 veces y se centrifugó a 4 000 rpm a 4°C durante 15 min en microfuga refrigerada Jouan MR 1812, utilizando el rotor para tubos de 50 mL de capacidad.

3.- Al término de la centrifugación se transfirió la fase superior a los tubos de ultracentrífuga y se adicióno aproximadamente 12 mL de buffer de lavado. Se centrifugó a 45 000 rpm por 80 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los botones en buffer de lavado y se determinó la cantidad de proteína. Se añadió el cocktail de inhibidores de proteasas y se almacenó a -70°C (Sánchez-Nieto *et al.* 1997).

10.5 Deter minación de proteína. Se empleó la técnica de Lowry modificada por Peterson (1977)

Elaboración de curva estándar para la determinación de proteína

Se elaboró una curva estándar con albúmina sérica bovina (Tabla V) para posteriormente obtener la concentración de proteína en las fracciones subcelulares de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. La albúmina forma un complejo colorido con el reactivo B (reactivo de Folin Ciocalteau), este complejo absorbe la luz de una longitud de onda de 750 nm, pudiéndose leer la absorbencia en un espectrofotómetro. Posteriormente se obtiene el gráfico y se calcula la regresión para obtener la ecuación de la recta. Se calcula la cantidad de proteína por gramo de muestra. En la Tabla III se muestra la preparación de cada uno de los tubos con el estándar.

Tabla V. Determinación de proteína en las fracciones membranales de las líneas de *Arabidopsis thaliana*

Tubo	H ₂ O (μ L)	BSA (μ L)	BSA (μ g)	Muestra (μ L)	Buffer (μ L)	Na- DOC	Reactivo A	Reactivo B	U.D.O (750nm)
1	900	-----	----	-----	-----	100	1000	500	
2	900	-----	----	-----	-----	100	1000	500	
3	899	1	3	-----	-----	100	1000	500	
4	898	2	6	-----	-----	100	1000	500	
5	897	3	9	-----	-----	100	1000	500	
6	895	5	15	-----	-----	100	1000	500	
7	894	6	18	-----	-----	100	1000	500	
8	892	8	24	-----	-----	100	1000	500	
9	890	10	30	-----	-----	100	1000	500	
10	898	-----	----	2	-----	100	1000	500	
11	898	-----	----	2	-----	100	1000	500	
12	898	-----	----	2	-----	100	1000	500	
13	898	-----	----	-----	2	100	1000	500	
14	898	-----	----	-----	2	100	1000	500	
15	898	-----	----	-----	2	100	1000	500	

Donde Na-DOC es desoxicolato de sodio 0.15%

Reactivo A.- Carbonato-tartrato-cobre, NaOH 0.8 N, SDS 10%, y H₂O

Reactivo B.- Folin Ciocalteau y H₂O.

10.6 Medición de enzimas marcadoras

La actividad de varias enzimas marcadoras que hidrolizan ATP se midió por un método colorimétrico (González Romo *et al.* 1992). Los inhibidores empleados en este ensayo fueron los siguientes: a) Ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 200 mM, como inhibidor de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. b) Azida de sodio (NaN₃) 2 mM, como inhibidor de la ATPasa de la mitocondria. c) Nitrato de potasio (KNO₃) 50 mM, como inhibidor de la ATPasa del tonoplasto. d) Molibdato de amonio

($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2 mM, como inhibidor de fosfatasa. La reacción comenzó con la adición de 3 μg de proteína membranal de la fracción microsomal o de la membrana plasmática. Se prepararon 8 tubos con diferentes concentraciones de Pi (K_2HPO_4 1 mM), para elaborar la curva estándar (Tabla VI) y se midieron las absorbencias después de 20 min de agregar el reactivo E a una longitud de onda de 850 nm. Se elaboró el gráfico y se calculó la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta, misma que nos ayudará a calcular la actividad de hidrólisis de ATP en términos de nmoles de Pi liberado del ATP en presencia de los diferentes inhibidores y por lo tanto a determinar la pureza de las diferentes preparaciones membranales obtenidas (Sánchez-Nieto *et al.* 1997, Carmona 2006).

La mezcla de reacción de 150 μL presentó la siguiente composición (todo el material utilizado en este ensayo fue lavado con un detergente libre de fosfatos, Extran y tratado con ácido sulfúrico):

Sacarosa 250 mM, PIPES 20 mM ajustado a pH 6 con NaOH, ATP 10 mM ajustado a pH 6 con PIPES, MgCl_2 10 mM y Carbonilcianida-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) 7 μM , partiéndose de las siguientes soluciones concentradas:

PIPES 500 mM ajustado a pH 6 con NaOH, ATP 300 mM ajustado a pH 6 con PIPES, MgCl_2 300 mM y CCCP 1 mM en Etanol.

- Solución BC: Consistió de la solución B (Ácido ascórbico al 12% en HCl 1 N) y la C (Molibdato de amonio al 2% en HCl 1 N) en una relación de 1:1 (v/v), se debe añadir la solución B a la C, la mezcla presentó un color ámbar intenso.

Solución E: Citrato de sodio al 2%, metaarsenito de sodio al 2% y ácido acético al 2%.

Tabla VI.- Determinación de Pi liberado a partir de la hidrólisis de ATP (González-Romo *et al.* 1992) La composición de las soluciones empleadas para la determinación de Pi fue la siguiente:

Curva patrón									
Tubo	P _i (μ L)/ nmol es	H ₂ O (μ L)	Muestr a	Medio de hidróli sis	VO ₄ (5mM)	NO ₃ /Mo O ₄	SDS 24 % (μ L)	Reactiv o B-C (μ L)	Reacti vo E (μ L)
1C	-----	150	----	----	----	----	150	300	450
2C	-----	150	----	----	----	----	150	300	450
3C	10	140	----	----	----	----	150	300	450
4C	20	130	----	----	----	----	150	300	450
5C	30	120	----	----	----	----	150	300	450
6C	40	110	----	----	----	----	150	300	450
7C	60	90	----	----	----	----	150	300	450
8C	80	70	----	----	----	----	150	300	450
1	----	----	3 μ L	150 μ L				300	450
2	----	----	3 μ L	150 μ L				300	450
3	----	----	3 μ L	150 μ L				300	450
4	----	----	3 μ L	144 μ L	6 μ L			300	450
5	----	----	3 μ L	144 μ L	6 μ L			300	450
6	----	----	3 μ L	144 μ L	6 μ L			300	450
7	----	----	3 μ L	139.5 μ L		7.5/3 μ L		300	450
8	----	----	3 μ L	139.5 μ L		7.5/3 μ L		300	450
9	----	----	3 μ L	139.5 μ L		7.5/3 μ L		300	450
10	----	----	3 μ L	150 μ L			150 μ L	300	450
11	----	----	3 μ L	150 μ L			150 μ L	300	450
12	----	----	3 μ L	150 μ L			150 μ L	300	450

10.7 Análisis de las fracciones membranales por microscopía electrónica.

Se analizarón las ultraestructuras de las vesículas de membrana plasmática por la técnica de microcortes. Las preparaciones fueron observadas por medio de microscopía electrónica de transmisión.

Para la técnica de microcortes se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se colocaron 50 μ L de las fracciones subcelulares obtenidas del tejido vegetal, se centrifugaron y los botones obtenidos fueron cubiertos con glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 a 4°C durante 2 h.
2. Se enjuagaron las muestras y se les añadió tetróxido de osmio al 1% a 4 °C durante 2 h.
3. Las muestras fueron deshidratadas.
4. Se realizó una infiltración con óxido de propileno y se incubaron por un período entre 24-36 h.
5. Las muestras se embebieron en Epon a 60°C durante 48 h.
6. Se realizaron ultracortes de 100 nm de grosor en el Ultramicrotomo Reicher, los cuales fueron recolectados en rejillas de cobre con una malla de tamaño 200.
7. Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron en el microscopio electrónico Jeol 1200 EXII a 60 kV.

Para la técnica de tinción negativa se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se colocan 25 μ L de una preparación membranal sobre una rejilla de cobre cubierta con carbón y se deja que se absorba aproximadamente durante 10 min.
2. Se quita el exceso de muestra con ayuda de un papel filtro.
3. Se colocan 25 μ L de una solución de acetato de uranilo y se deja absorber durante 10 min.
4. Se quita el exceso de colorante con ayuda de un papel filtro.
5. Se observa al microscopio electrónico Jeol 1200 EXII a 60 kV.

10.8 Separación electroforética de proteínas

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de acrilamida (acrilamida 10%, bisacrilamida 0.3%) de 1 mm de grosor (Schägger y Von Jagow, 1987) para separar y caracterizar los perfiles de proteínas membranales en cada fracción obtenida Homogenado (H), FM (fracción microsomal) y Vesículas de Membrana Plasmática (VMP) en cada línea de *Arabidopsis* (Col-0 y *Atsbh1-1*)

La electroforesis en geles de acrilamida permite la separación de proteínas con diferente peso molecular y gracias a su carga eléctrica, misma que se uniforma negativamente en el caso de la electroforesis con el detergente SDS. Las proteínas entonces migran en un campo eléctrico hacia el ánodo. El movimiento de estas partículas cargadas se ve influenciada dramáticamente por sus interacciones con la matriz del gel y las sustancias en ella. La acrilamida se polimeriza y es la que constituye el soporte mecánico, mientras que la BIS-acrilamida origina la malla consistente y porosa (Cooper, 1977), (Goding, 1984) y Yarmush, 1988).

El gel constaba de los geles separador y concentrador. Las cantidades y reactivos utilizados para cada uno se muestran en la Tabla VII.

Procedimiento para la preparación del gel de acrilamida

1. Limpiar perfectamente con alcohol las placas de vidrio.
2. Ensamblar las dos placas de vidrio con los espaciadores.
3. Mezclar los componentes del gel separador como lo indica la Tabla VII añadiendo al final el persulfato de amonio y el TEMED en ese orden, agitar suavemente y añadir a las placas de vidrio.
4. Añadir SDS con ayuda de una micropipeta para evitar la formación de menisco al polimerizar.
5. Dejar polimerizar 30 min
6. Preparar la mezcla del gel separador como se muestra en la Tabla VII, igual que en el paso 3.
7. Insertar el peine con 10 carriles de 1 mm de espesor
8. Dejar polimerizar durante 30 min.
9. Remover el peine con mucho cuidado del gel concentrador y cargar las muestras.
10. Se corrió la electroforesis de las muestras a 70 V una hora hasta que salió del gel todo el azul de bromofenol.
11. Al término de la electroforesis se desmontaron los soportes, se sacaron los geles de cada uno de éstos y se colocaron en un recipiente marcado con su

nombre respectivo, el cual contenía la solución fijadora para la tinción del gel (Carmona, 2003) o bien amortiguador de transferencia.

Tabla VII. Composición del gel para la separación electroforética de proteínas en geles de SDS.

Reactivos	Gel separador (μL)	Gel concentrador (μL)
Acrilamida-Bis acrilamida (10 % - 0.3%)	1631.9	528.5
Amortiguador del gel, pH 8.9	1631.9	991
Glicerol	660.16	----
H₂O	990.98	244.3
Persulfato de amonio* (10%)	16.5	33
TEMED*	1.65	3.3
Volumen total	4975.7	4000

- * Una vez añadidos, el manejo de la solución deber ser rápido

Las soluciones utilizadas para la preparación de los geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y el corrimiento electroforético se muestran a continuación:

- Solución de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.938%)
- Amortiguador del gel:
 - Tris 3 M
 - SDS 0.3%
 - Ajustar pH 8.9-9.0/HCl
- Amortiguador del cátodo:
 - Tris 0.1 M
 - Tricina 0.1 M
 - SDS 0.1%

Sin ajustar el pH.

d) Amortiguador del ánodo:

Tris 0.2 M

Ajustar pH a 8.9-9.0 con HCl

e) Amortiguador de digestión:

SDS 10%

Tris 100 mM, pH 6.8

Azul de bromofenol 0.6%

β -mercaptoetanol 4%

f) Solución de marcadores de peso molecular Benchmark™ Prestained protein Ladder(10748-010) compuesto por las siguientes proteínas (Tabla VIII).

Tabla VIII. Pesos moleculares de estandares

Proteína (Nº banda)	Peso molecular (kDa)
1.....	180
2.....	115
3.....	82
4.....	64
5.....	49
6.....	37
7.....	26
8.....	19
9.....	15
10.....	6

Condiciones para el sobre corrimiento del gel SDS – PAGE 10 %

En los casos en que la separación de dos proteínas de pesos moleculares muy cercanos no fue suficiente, se hizo un sobre corrimiento del gel. Las condiciones de sobre corrimiento se realizaron fueron 15 a 25 volts por 15 horas seguida por 20 min a 90 Volts y finalmente 10 min a 101 volts

Tinción de geles

1. Técnica de tinción con azul de Coomassie.

A continuación se enlistan las soluciones que se ocuparon para esta tinción:

- A. Disolución fijadora: Metanol 50 % (v/v) y CH₃COOH 10 % (v/v).
- B. Disolución teñidora: Metanol 39.5 % (v/v), CH₃COOH 21.1 % (v/v), 0.2 % (p/v) de azul de Coomassie (Brillant blue G-250)
- C. Disolución desteñidora: Etanol 46 % (v/v) y CH₃COOH 9.1 % (v/v).

2. Procedimiento:

- A. Después de haber terminado la electroforesis, se sacaron los geles y se colocaron en un recipiente con 20 mL de disolución fijadora y se dejaron un tiempo mínimo de 30 min en agitación rotatoria constante.
- B. Se decantó la disolución fijadora y se añadió la disolución teñidora, dejando los geles en agitación rotatoria constante por un tiempo mínimo de 15 min.
- C. Se decantó la disolución teñidora y se añadieron 20 mL de disolución desteñidora. En un extremo del recipiente donde fue desteñado el gel, se colocó una esponja pequeña a modo de que se absorbiera el exceso de colorante liberado. Se mantuvo el gel en agitación rotatoria constante hasta que las bandas de proteína fueron visibles y hubo poco fondo de tinción.
- D. Al final se cambió la disolución desteñidora por otra que contenía 5 % (v/v) de glicerol durante 24 horas.
- E. Posteriormente se colocaron entre una capa de celofán y se secaron en un secador de geles a 80 °C por tres horas.

2.- Técnica de tinción con Plata

Método de Vorum (Mortz *et al.*, 2001).

Para realizar la tinción con plata se siguió el procedimiento que se detalla a continuación. Es importante señalar que todos los pasos deben realizarse en los tiempos indicados. Las cantidades finales de soluciones que se agregan al gel son de 40-50 ml. Para realizar esta tinción se utilizó siempre un recipiente de vidrio, por cada

gel que se procesa. El recipiente debe estar muy limpio y seco. Todo el tiempo se deben usar guantes, siempre evitando tocar el gel, para impedir la porción de manchas en el revelado.

1. Fijación. Se preparó una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.05% (sólo puede ser el de Sigma, No. cat. 200-001-8). Se dejó el gel en esta solución durante dos h con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
2. Lavador. Se quitaron los geles de la solución fijadora y se hicieron tres lavados de 20 min cada uno con *etanol al 35%*, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente. Entre cada lavado hay que decantar con cuidado sin tocar el gel.
3. Sensibilización. Se mantuvo el gel durante 5 min en una solución de tiosulfato de sodio 0.02%, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
4. Lavado. Se llevó a cabo con agua bidestilada, tres veces durante 5 min cada uno, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente. **Este lavado es crítico, pues de excederse el tiempo, el gel no se tiñe y se tiene que volver a empezar en el paso 1.**
5. Adición de la solución de plata. Se colocó el gel ya enjuagado, en una solución de AgNO_3 0.2%, formaldehído 0.076%; durante 20 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
6. Lavado. Se llevó a cabo con agua bidestilada, dos veces, cada uno durante 1 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
7. Revelado. Después de enjuagar, se puso el gel en una *solución de Na_2CO_3 6%, formaldehído 0.05%, tiosulfato de sodio 0.0004%*, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente, hasta que aparecieron las bandas. Se decantó la solución reveladora una vez que se obtuvo la intensidad deseada.
8. Terminación del revelado. Se añadió la *solución Stop consistente en metanol 50% y ácido acético 12%*, manteniendo por 5 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.

9. Almacenamiento del gel. Se preparó una solución de ácido acético al 1% en la que se guardó a 4°C. Antes se puede escanear y ya posteriormente, secar.

10.9 Réplica en Western.

Una vez que se llevó a cabo la separación de las proteínas de cada una de las fracciones subcelulares de las diferentes líneas (Col-0 y *Atsbh1-1*) se procedió a realizar la transferencia en membranas de nitrocelulosa para detectar específicamente a proteínas mediante la utilización de sus anticuerpos específicos correspondientes.

Esta técnica se basa en la transferencia de las bandas de proteína de un gel de acrilamida a una matriz plana que puede ser de nitrocelulosa, la fuerza electroforética es la responsable de la transferencia de las moléculas de proteína de una matriz a otra debido a la carga negativa que presentan las proteínas en la mayoría de las separaciones electroforéticas en geles de acrilamida (Beisiegel, 1986; Aeborsold *et al.* 1986; Matsudaira, 1987). Posteriormente, las bandas de proteína que reaccionan con el anticuerpo de forma específica son teñidas para ser visualizadas.

Preparación de la solución stock de NBT

1.- Preparar 1.0 mL de 70% de Dimetilformamida (DMF). (0.7 mL de DMF + 0.3 mL H₂O bidestilada).

2.- Disolver 30 mg de NBT en la solución de 70% de DMF

Preparación de la solución stock de BCIP

1.- Disolver 15 mg de BCIP en 1.0 mL de DMF

Mezcla para desarrollar color.

Tabla IXa. Reactivos utilizados en la técnica de Réplica en Western

Reactivos	Composición de Reactivos
Buffer de transferencia	Tris (trisma base) 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, SDS 0.1 %
Solución salina amortiguada con TRIS (TBS)	Tris-HCl 20 mM pH 7.5 (2.4 g/L), NaCl 0.5 M
Solución salina amortiguada con TRIS más Tween -20 (TTBS)	Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween-20 0.05 %
Buffer de carbonatos	NaHCO ₃ 0.1 M, MgCl ₂ 1.0 mM pH 9.8 con NaOH
Solución Stock de NBT para desarrollar color	30 mg/ml de NBT disuelto en dimetilformamida al 70 %.
Solución Stock de BCIP para desarrollar color	15 mg/mL de BCIP disuelto en dimetilformamida

Esta mezcla se tendrá que preparar el mismo día que se teñirá la membrana.

1.- Añadir 1.0 mL de la solución stock 30 mg/mL de NBT a 100 mL de Buffer de carbonato

2.- Añadir a lo anterior 1.0 mL de la solución stock 15 mg/mL de BCIP. Añadir a las inmunorélicas como indica el procedimiento.

Procedimiento de la Réplica en Western

1. Terminada la electroforesis, los geles se transfirieron a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (Immobilon Millipore) como sigue:

2. Se recortó una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) de 0.4 µm, la cual se sumergió en metanol absoluto.

3. Se ensambló el sistema siguiente, acomodando desde abajo hacia arriba: una esponja, una hoja de papel filtro, el gel, la membrana de PVDF, una hoja de papel filtro y una esponja, todos previamente saturados con el amortiguador de transferencia.

Tabla IXb. Reactivos utilizados en la técnica de Réplica en Western

Soluciones bloqueadoras para cada uno de los anticuerpos			
Anticuerpo	Solución bloqueadora	Primer anticuerpo Más condiciones de incubación	Segundo anticuerpo Más condiciones de incubación
Contra la ATPasa de H⁺ betabel	5% de BLOT-Quickbloker en TTBS	1:4000 en 2% de Quickbloker en TBS Durante toda la noche Durante toda la noche	Fosfatasa alcalina (Sigma A 8025) diluido 1:1000 en 5% en Quickbloker en TBS a t=ambiente (3 horas)
Contra la ATPasa de H⁺ de Arabidopsis thaliana	2% de Quickbloker en TTBS	1:1000 en 2% Quickbloker en TBS	Fosfatasa alcalina (Sigma A 8025) diluido 1:1000 en 2% en Quickbloker en TBS T=ambiente (3 horas)

4. El conjunto anterior se colocó en la cámara de transferencia orientándolo de manera que el gel se encontró de cara hacia el cátodo (negativo, negro) y la membrana hacia el ánodo (positivo, rojo). Se cuidó que la cámara tuviese suficiente amortiguador de transferencia y un agitador en el fondo.

5. La transferencia se realizó a 25 V, a temperatura ambiente con una suave agitación durante 2.2 h.

6. Transcurrido el tiempo de corrida, se apagó la fuente de poder y se removió el sistema ensamblado, para lo cual se abrió cuidadosamente y la membrana de PVDF se

colocó con la cara que estuvo en contacto con el gel hacia arriba en un recipiente que contenía TTBS (ver composición en la Tabla IXa) a temperatura ambiente con agitación suave durante 5 min.

7. Se removió la solución TTBS y se repitió la operación. Transcurridos los 5 min se decantó la sol. de TTBS y se añadió sol. TBS (ver composición en la Tabla IXa), incubándose otros 5 min.

8. La membrana se incubó con solución bloqueadora (ver Tabla IXb) a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 h.

9. Una vez transcurrido el tiempo se hicieron dos lavados con TTBS de 5 min cada uno y posteriormente un lavado con TBS durante 5 min.

10. La membrana se incubó con el primer anticuerpo (ver Tabla IXb), se incubó la membrana a 4 °C en bolsa de plástico durante toda la noche (aproximadamente 15 h)

11. Al día siguiente la membrana se removió de la bolsa de plástico y se lavó dos veces con TTBS (5 min cada lavado) y posteriormente se hizo un lavado con TBS durante 5 min.

12. La membrana se incubó con el segundo anticuerpo (ver Tabla IXb) conjugado a fosfatasa alcalina, a temperatura ambiente sin agitación durante 2 h.

13. Se repitieron los pasos indicados en el punto 11.

14. Se llevó a cabo el revelado de las membranas usando los sustratos de la fosfatasa alcalina.

a) Se agregó a la membrana la solución reveladora (ver Tabla IXa) a temperatura ambiente en agitación hasta que apareció la banda de interés.

b) La reacción se detuvo lavando y manteniendo la membrana en agua.

11. RESULTADOS

1.- Análisis de características fenotípicas de *Atsbh1-1* (SALK_090881), mutante en el gene de la hidroxilasa.

Durante el periodo de crecimiento de 10 semanas de la línea silvestre Ecotipo Col-0 y de 12-14 semanas para la línea mutante *Atsbh1-1*, se corroboraron algunas características ya descritas en el trabajo publicado (Chen *et al.*, 2008) como el tamaño y

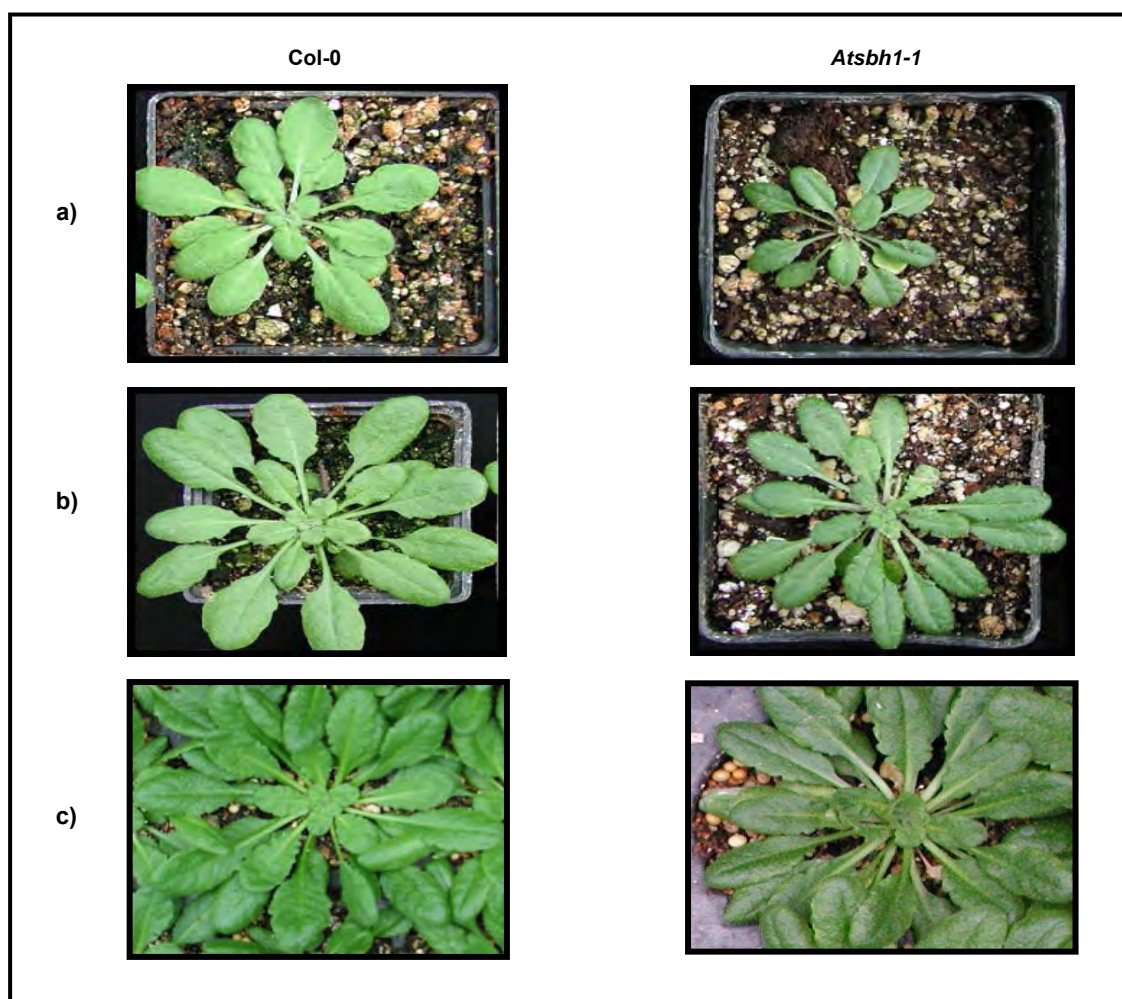


Figura 16. Comparación del crecimiento entre las líneas de *Arabidopsis thaliana* en la línea silvestre (izquierda) y la línea mutante (derecha), a diferentes tiempos de crecimiento. a) 3, b) 5 y c) 9 semanas de crecimiento.

la aparición de mancha cloróticas en las hojas en la edad adulta (Figs.16 y 17 respectivamente) pero se mencionan por su relevancia en cuanto a que constituye el material del que se obtuvieron las preparaciones membranales.

a) Tamaño y desarrollo de clorosis en las hojas

En cada fase de crecimiento de las líneas se tomaron fotografías para su caracterización fenotípica (Fig. 16), advirtiéndose un menor desarrollo de la línea mutante con respecto a la silvestre. Se determinó que la edad adecuada para la obtención de hojas maduras fue de 9-10 semanas para la línea silvestre y en la mutante variaba entre 3 a 4 semanas más.

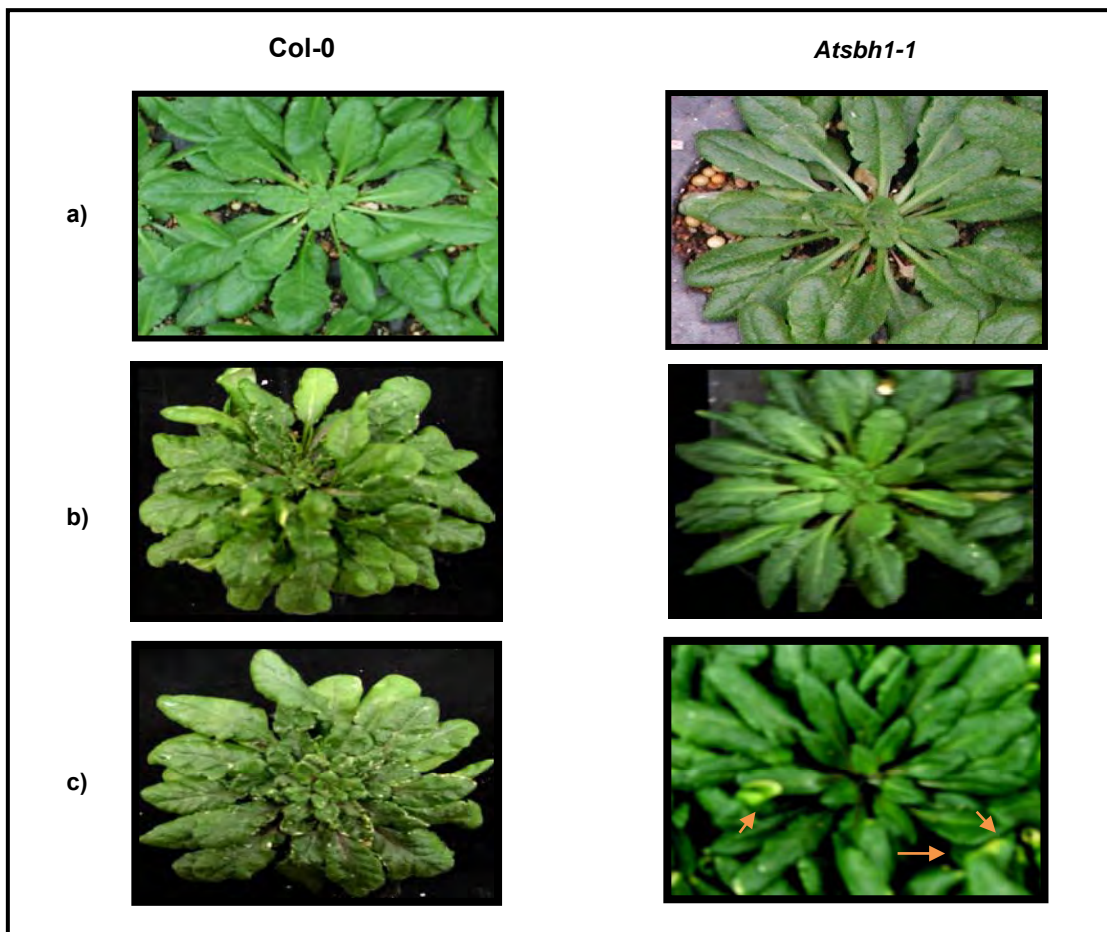


Figura 17. Comparación de las características de clorosis y senescencia entre la línea silvestre (Col-0) y la línea *Atsbh1-1* a diferentes edades. a) 11, b) 13 y c) 14 semanas de crecimiento.

Se advirtieron algunas características fenotípicas que no estaban descritas en el trabajo publicado las diferencias adicionales encontradas fueron relativas al color y forma de la hoja, así como a la pérdida de turgencia tras el corte. En la Fig.17a se muestra que la línea mutante empezó a desarrollar puntos cloróticos en las hojas a las 11 semanas de su periodo de crecimiento debido al defecto en la hidroxilación de las BCL reportado en (Chen *et al.*, 2008). Conforme fueron creciendo las hojas, los puntos de clorosis empezaron a desarrollarse principalmente en las puntas de las hojas. Asimismo, en la Fig.17c, se indica con flechas el daño en las hojas de la línea mutante que empezaron a senescer a las 14 semanas, mientras que las de la línea silvestre presentaron síntomas de envejecimiento a las 11 semanas.

Aparentemente, los signos de clorosis en la mutante no son por senescencia, pues esta línea parece tener una mayor longevidad y los síntomas de senescencia se presentan alrededor de tres semanas más tarde que en la silvestre.

b) Forma y color de las hojas

Desde el inicio del crecimiento se observaron cambios en el tamaño de la mutante con respecto al control, pero no había diferencias en el color o en la forma de

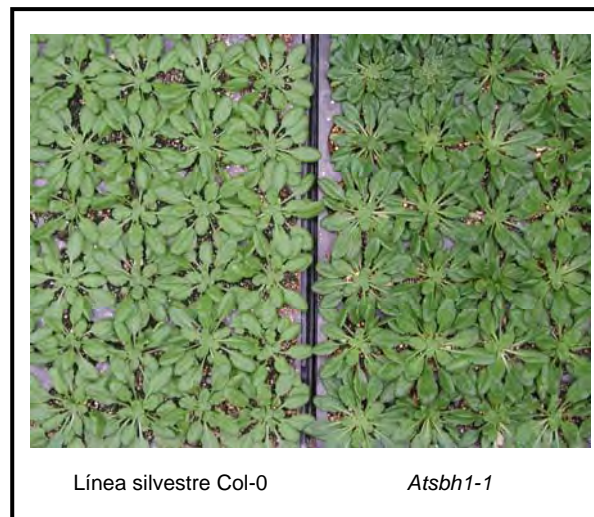


Figura 18. Comparación de los fenotipos de la parte aérea en las líneas silvestre Col-0 y *Atsbh1-1* adultas en cuanto a color y forma.

las hojas. Sin embargo gradualmente el color verde de las hojas de la línea mutante *Atsbh1-1* se volvió mucho más intenso (Fig. 18).

Además de la diferencia de color en la mutante, la forma de la hoja es alargada y termina en punta (lanceolada) mientras que en la Col-0 la forma de la hoja es ancha y curvada (Fig. 19a). En la Fig. 19b (Col-0) y 19c (*Atsbh1-1*) se observaron los cambios en coloración y forma entre hojas de diferente tamaño y estado de desarrollo de las dos líneas. Una característica adicional fue que la línea *Atsbh1-1* presentó hojas con bordes ondulados irregularmente, así como una superficie con dominios abultados.

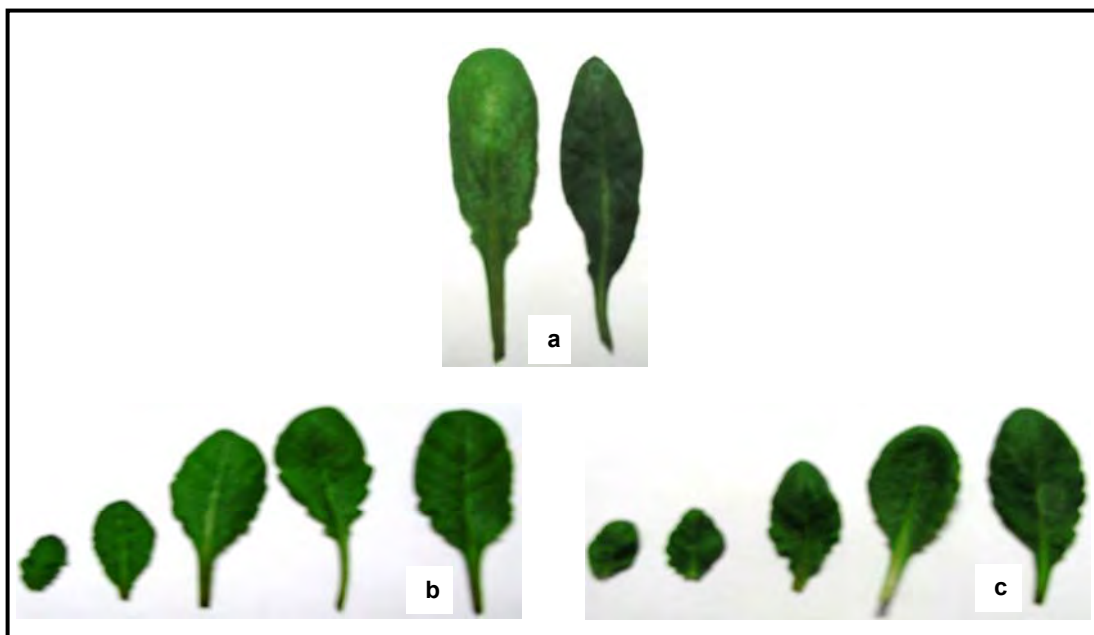


Figura 19. Comparación del color y forma en hojas de líneas de *Arabidopsis thaliana* en diferentes estados de desarrollo. a) Diferencias en el color y forma de la hoja, (izq. Línea Col-0) y (der. Línea *sbh1-1*), b) (Col-0) y c) (*Atsbh1-1*) comparación de la forma de la hoja

c) Pérdida de turgencia

La última característica fenotípica observada no reportada fue la pérdida en la turgencia de las hojas. Este cambio ocurrió gradualmente después de cortar las hojas separándolas del tallo desde el pecíolo y las diferencias más claras se apreciaron desde los 5 min posteriores al corte y fueron mucho más visibles a los 10 y 20 min

después del corte en las hojas de la línea mutante en la hidroxilasa. En la Fig. 20 se observa como las hojas en la línea mutante *Atsbh1-1* perdieron agua más rápidamente en comparación con las de la línea silvestre, denotándose como un enrollamiento y contracción de las hojas y una apariencia de marchitamiento y sequedad.

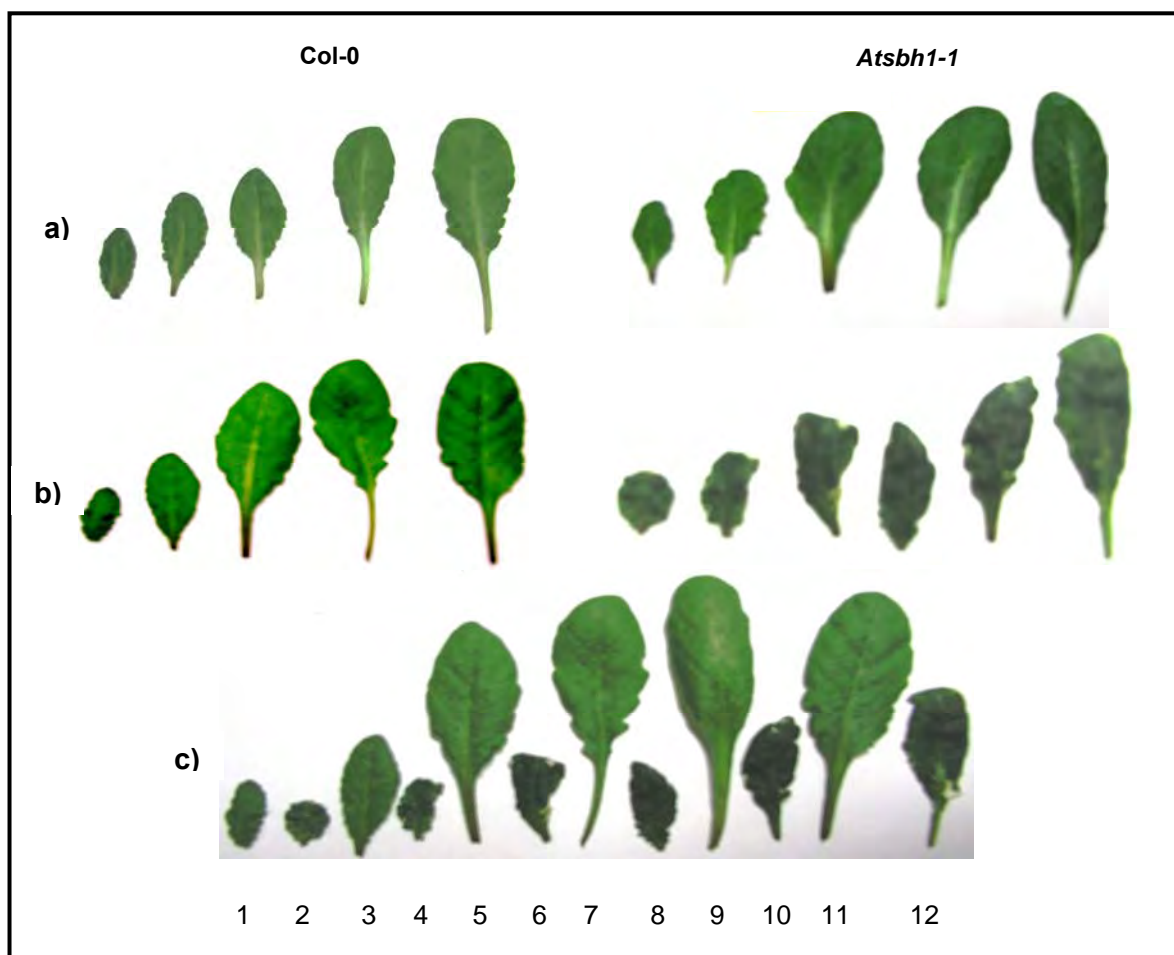


Figura 20. Comparación de la pérdida de turgencia de hojas separadas del tallo en las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*. Se observan las hojas cortadas (a) inmediatamente, (b) después de 10 min y (c) después de 20 min de haber sido cortadas. En a) y b) se presenta del lado izquierdo las hojas de la Col-0 y a la derecha las de la mutante *Atsbh1-1* en cada panel, en c) se muestran intercaladas las hojas mostrando en los números impares a la línea control e impares a la línea *Atsbh1-1*.

2. Rendimientos en la obtención de las fracciones subcelulares de las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*

Determinación del contenido de proteína en cada una de las fracciones celulares obtenidas de las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*.

En la Tabla X se muestra la concentración y cantidad de proteína en cada una de las fracciones subcelulares, así como los rendimientos para cada una de ellas. En la fila 2 de la tabla se muestra el intervalo de la cantidad de tejido con la que se partió para la obtención de las fracciones en un intervalo de 23.30-59.82 gramos en peso fresco para la línea control, y en caso de la línea mutante fue de 24.14-61.50 gramos en peso fresco. Con la línea *Atsbh1-1* se obtuvieron rendimientos similares en homogenados comparados con los de la línea silvestre, sin embargo en los dos últimos pasos de purificación para obtener microsomas y las VMP, el rendimiento disminuyó alrededor de un 30 % en VMP con respecto al de la línea control, obteniéndose un rendimiento de sólo 0.027 mg/g tejido.

Tabla X. Rendimientos obtenidos en las fracciones subcelulares (homogenados, microsomas y VMP) obtenidas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1*. En la línea en la que se indica la cantidad de tejido, el intervalo corresponde a los lotes de menor y mayor cantidad de hojas utilizadas para hacer los aislamientos y la “n” corresponde al número de lotes de plantas de los que se partió para hacer el mismo número de preparaciones. Los valores de concentración y cantidad de proteína, así como los de rendimiento incluyen a todas las preparaciones \pm error. std.

	Col-0			<i>Atsbh1-1</i>		
	Cantidad de tejido (g peso fresco) 23.30 – 59.82 n=6			Cantidad de tejido (g peso fresco) 24.14- 61.50 n=9		
	HOM	FM	VMP	HOM	FM	VMP
[Proteína] (mg/mL)	3.464 \pm 0.319	8.134 \pm 0.639	5.257 \pm 1.051	4.195 \pm 1.709	11.514 \pm 1.461	4.887 \pm 0.300
Proteína total (mg)	661.52	42.843 \pm 3.391	2.276 \pm 0.729	723.38	54.824 \pm 7.439	1.206 \pm 0.176
Rendimiento (mg/g tejido)	13.819 \pm 1.260	0.879 \pm 0.042	0.044 \pm 0.012	15.767 \pm 3.552	1.178 \pm 0.131	0.027 \pm 0.002

3. Determinación de pureza. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.

Con objeto de evaluar la pureza de las fracciones membranales obtenidas, se llevó a cabo el análisis de éstas, fijándose 3 muestras de microsomas y 3 de vesículas de membrana plasmática. Las muestras fijadas se incluyeron en una resina y de aquí se hicieron microcortes. En la Fig. 21A y 21B se muestran las preparaciones de cada una de las líneas (Col-0 y *Atsbh1-1*, respectivamente) observadas en el microscopio de transmisión bajo diferentes magnificaciones. En la Fig. 21A 1 y 2 de las fracciones microsomales de la línea silvestre Col-0 se observó la presencia abundante de material electrodenso y amorfo, así como heterogeneidad en el tamaño de las vesículas presentes, las cuales podrían provenir de las membranas de mitocondria, vacuola, cloroplasto y de la plasmática. El tamaño de las vesículas en esta línea varió entre los 60 y 160 nm de diámetro en las micrografías analizadas a 30 k de magnificación, la cual resulta ser más conveniente para este propósito, pues la magnificación de 15 k al ser menor, origina mayor error de medición de las estructuras. La preparación microsomal de la línea mutante mostró un patrón muy semejante, presentando una gran proporción de material denso y amorfo y un tamaño heterogéneo entre las vesículas. Sin embargo, el intervalo de dimensiones fue más amplio en este caso, e incluyó vesículas de tamaño mayor (120-400 nm) que las encontradas en la preparación microsomal de la línea silvestre. Sin embargo, en las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de esta misma línea (silvestre Col-0, Fig. 21A 3 y 4), las estructuras que se presentaron fueron más homogéneas: vesículas cerradas, sin estructuras internas, con tamaños entre 115-327 nm y de 120-200 en magnificaciones de 15k y 30k indicando así un enriquecimiento de VMP y por lo tanto una pureza mucho mayor además en estas preparaciones se logro observar perfectamente la bicapa que conforma a las vesículas.

En la Tabla XI se muestra el intervalo de dimensiones medidas en las vesículas encontradas en las preparaciones de microsomas y de VMP tanto en la línea silvestre como en la mutante *Atsbh1-1*.

Tabla XI. Intervalos de magnitudes de los diámetros de vesículas membranales en preparaciones de FM y VMP

Magnificación FM		VMP
Col-0		
	diámetro (nm)	diámetro (nm)
15k	83.3-375	115-327
30k	60-160	120-200
		<i>Atsbh1-1</i>
30k	120-400	120-200
60k	40-350	100-180

4. Actividad de AT Pasa de las fracciones membranales de las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*.

Después de haber obtenido las preparaciones y determinado el contenido de proteína, se midió la hidrólisis de ATP para estimar el grado de contaminación con otras (principalmente de membranas de mitocondria, tonoplasto y fosfatasa). En el ensayo se midió del Pi liberado por las fracciones subcelulares. Todas estas membranas poseen enzimas que hidrolizan ATP, y su contribución se pudo establecer gracias a que son inhibidas diferencialmente por ciertos compuestos. En las Tablas XII (línea control Col-0) y XIII (línea mutante *Atsbh1-1*) se muestran ejemplos representativos de los datos generados por una preparación de microsomas y por una de VMP a las que se les hizo la medición de hidrólisis de ATP con diferentes inhibidores: vanadato (Na_3VO_4) que inhibe la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, azida de sodio (NaN_3) que inhibe a la ATPasa mitocondrial y nitrato/molibdato ($\text{KNO}_3/\text{NaMoO}_4$) que inhiben a la ATPasa de tonoplasto y a fosfatasa, respectivamente.

En las Tablas XII y XIII se observan de forma detallada los datos obtenidos en la liberación de Pi así como su manejo, para determinar la hidrólisis de ATP a cada una de las preparaciones y así establecer el grado de enriquecimiento de VMP en los pasos de purificación entre los homogenados, los microsomas y las VMP de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0 y *Atsbh1-1*). En cada apartado se muestran los datos de

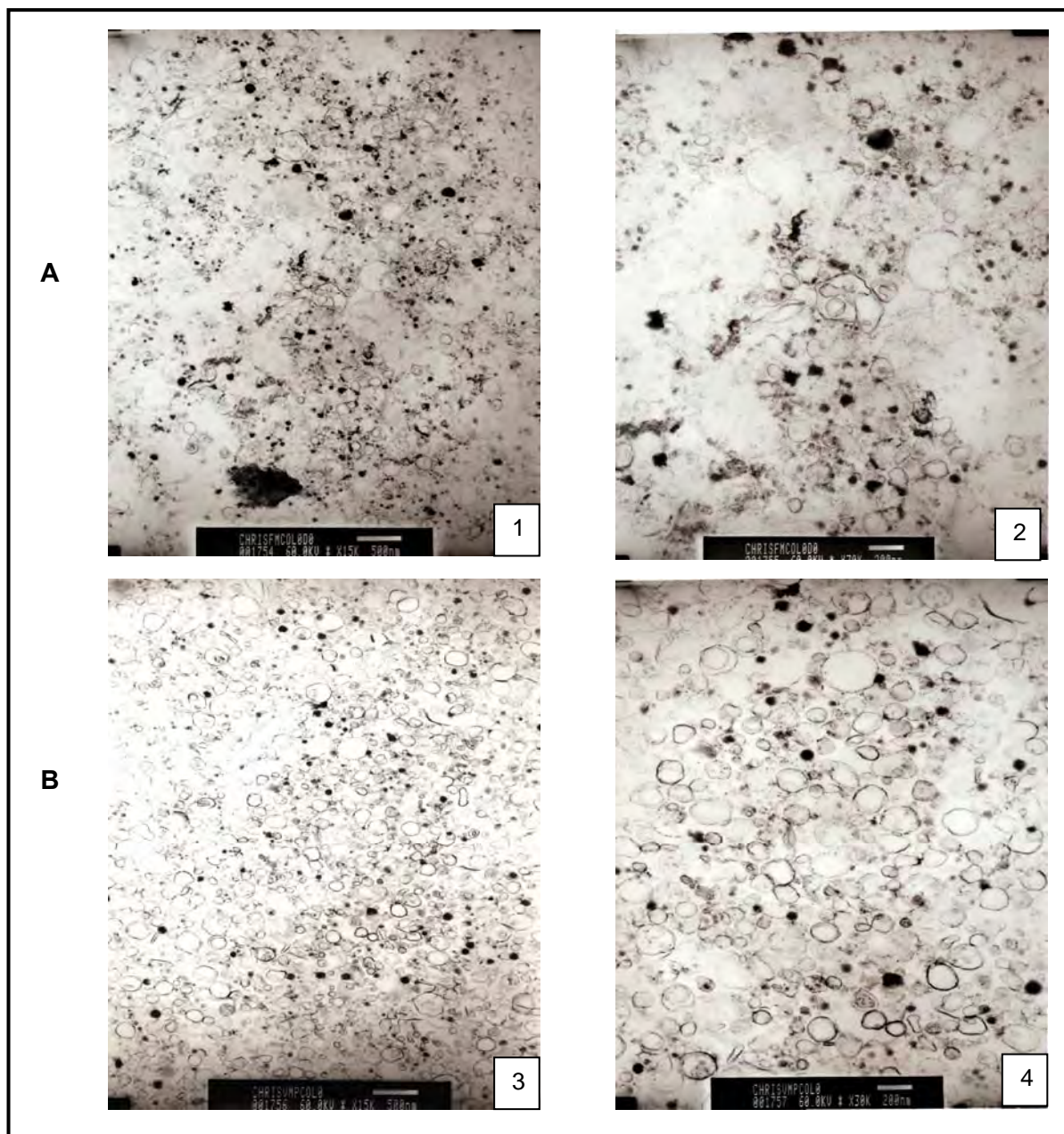


Figura 21A. Análisis de fracciones membranales de la línea silvestre Col-0 por microscopía de transmisión. Muestras de dos preparaciones independientes se trataron como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Se muestran cuatro campos con diferentes magnificaciones. A1 y A2 son muestras de fracciones micosomales (A1 a 15 k y A2 a 30 k) y B3 y B4 son muestras de vesículas de membrana plasmática (B3 a 15 k y B4 a 30 k). La barra corresponde a 500 nm para una magnificación de 15k y de 200 nm para una magnificación de 30k

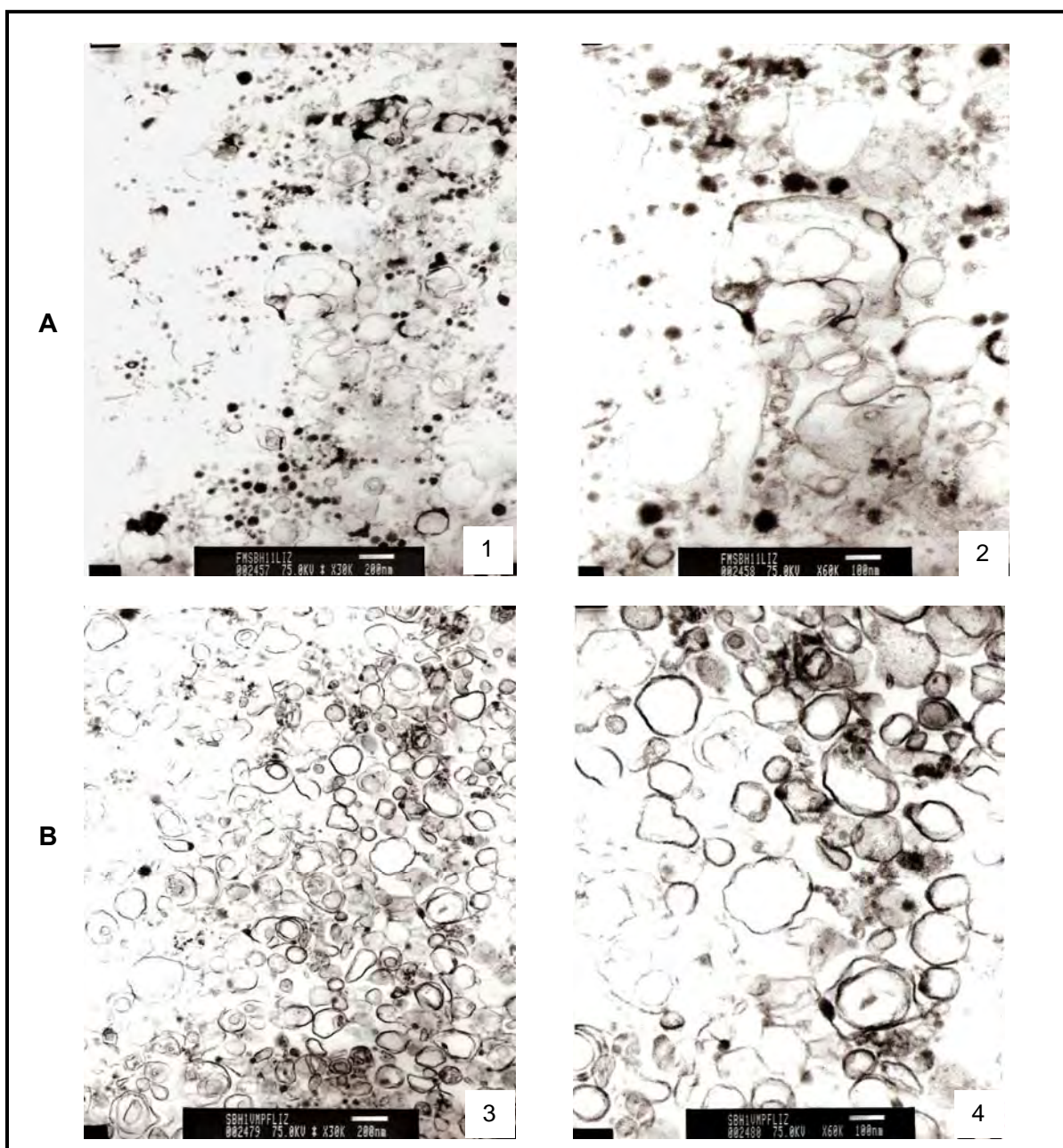


Figura 21B. Análisis de fracciones membranales de la línea mutante *Atsbh1-1* por microscopía de transmisión. Muestras de dos preparaciones independientes se trataron como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Se muestran cuatro campos con diferentes magnificaciones. A1 y A2 son muestras de fracciones micosomales (A1 a 30 k y A2 a 60 k) y B3 y B4 son muestras de vesículas de membrana plasmática (B3 a 30 k y B4 a 60 k). La barra corresponde a 200 nm y 100 nm para una magnificación de 30k y 60k respectivamente.

absorbancia (por triplicado) frente a cada inhibidor (en algunos inhibidores sólo se observan duplicados debido a que uno de ellos mostró una variación exagerada y muy discordante de los otros dos valores, por lo que no se consideró ese valor para la obtención del promedio). Al promedio del duplicado o del triplicado de la medición experimental de ese punto, se le restó el blanco (Absorbancia del tiempo 0 o T0, que corresponde a la hidrólisis química, no enzimática del ATP y que se mide en presencia de la proteína durante el tiempo de reacción, pero teniendo siempre SDS en el medio). Se aseguró que los datos de absorbancia estuvieran dentro de la linealidad de la curva patrón de Pi correspondiente y a partir de la cual se calculó la actividad específica (nmoles Pi/mg/min) que presentaban las ATPasas de los diferentes compartimentos. En las tres últimas columnas de cada una de las tablas se observan las actividades específicas en presencia de ninguno o de los tres inhibidores. Se puede observar que para el caso de la Col-0, la inhibición por vanadato aumentó y la de los otros inhibidores disminuyó en las vesículas de membrana plasmática con respecto a la de los microsomas, lo cual indica que las VMP se purificaron con respecto a los microsomas alrededor de 30 %.

Para el caso de la línea mutante (Tabla XIII) se observó, según las inhibiciones de los diferentes compuestos, que también hubo una mayor inhibición por vanadato en las vesículas de membrana plasmática comparada con la de los microsomas respectivos, si bien en términos absolutos, la inhibición por vanadato fue mayor en las VMP de la mutante (78.5 %) que en las de la Col-0 (60.2 %). Sin embargo, en estas Tablas XII y XIII sólo se quiere ilustrar el tipo de procesamiento que se hizo con los datos experimentales. El análisis más apropiado de la purificación comparativa de ambas líneas es el que se hizo considerando todas las preparaciones disponibles.

Tabla XII. Determinación de la hidrólisis de ATP y su sensibilidad a inhibidores en la fracción microsomal y en las vesículas de membrana plasmática obtenidas de la línea silvestre Col-0. Se muestra un ejemplo de los datos originales obtenidos: la determinación de la Absorbancia debida al fosfato liberado por la muestra, la diferencia de Absorbancia entre la muestra y el blanco (h. química), y la conversión del valor de la diferencia entre esas absorbancias a nmoles de Pi liberado por min por mg de proteína. Estos valores se muestran para la hidrólisis total de ATP medida en ausencia de inhibidores (HT), la hidrólisis de ATP medida en presencia de ortovanadato de sodio (VO₄) y la hidrólisis de ATP medida en presencia de azida de sodio (N₃), de nitrato de potasio y molibdato de sodio (NO₃/MoO₄). Se muestra el valor de % de hidrólisis de ATP en presencia de cada inhibidor con respecto al control, que es la hidrólisis total. Cada punto que se muestra es el promedio de la determinación que se hizo por triplicado.

Fracción microsomal de Col-0						
	Datos de absorbancia triplicado (UDO)	Promedio	Absorbancia corregida Abs_m-Abs_{T0} (UDO)	Actividad nmolesPi/mg/min	% actividad	% inhibición
HT	0.415 0.453 0.445	0.438	0.214	108.460	100	0
VO ₄	0.341 0.349 0.326	0.339	0.115	58.206	53.666	46.334
N ₃	0.380 0.382	0.381	0.157	79.625	73.479	26.521
NO ₃ /MoO ₄	0.336 0.343	0.340	0.116	58.629	54.056	45.944
SDS (h. química)	0.207 0.202 0.263	0.224	---	---	---	---
Vesículas de membrana plasmática Col-0						
HT	0.544 0.560 0.570	0.558	0.428	217.259	100	0
VO ₄	0.315 0.283 0.303	0.300	0.170	86.464	39.797	60.203
N ₃	0.454 0.578 0.507	0.513	0.383	194.416	89.486	10.514
NO ₃ /MoO ₄	0.530 0.531 0.487	0.516	0.386	195.939	90.187	9.813
SDS (h. química)	0.137 0.119 0.134	0.130	---	---	---	---

5. Comparación de la actividad de la ATPasa de H^+ de vesículas de membrana plasmática en la línea control I (Col-0) y la línea mutante (*Atsbh1-1*) de acuerdo al grado de pureza de la preparación.

De las preparaciones obtenidas, estuvieron disponibles para hacer el análisis de actividad un total de 6 preparaciones de VMP de las plantas silvestres (Col-0) y 8 de la línea mutante *Atsbh1-1*. Todas ellas son preparaciones independientes, es decir, se hicieron de lotes de plantas crecidos en fechas diferentes y de cada lote, el proceso de purificación de las membranas que se llevó a cabo independientemente. Uno de los resultados más claros e interesantes fue que cuando se medía la hidrólisis de ATP en presencia de vanadato, la actividad específica sensible a vanadato era consistentemente menor en las preparaciones de VMP derivadas de la línea mutante *Atsbh1-1* que la de las VMP de las plantas control. Sin embargo, las 15 preparaciones tenían un grado de purificación que fluctúa entre el 50 y el 90 % (Tabla XIV). Con objeto de determinar de manera más precisa los grados de inhibición de la actividad de ATPasa de H^+ en la línea mutante *Atsbh1-1*, se compararon las preparaciones de VMP que tuvieran un grado de purificación semejante, pues una menor actividad de la ATPasa de H^+ podría corresponder a que había menos VMP en esa preparación. Aún cuando al total de las preparaciones mostraban heterogeneidad con respecto a la pureza, el intervalo de niveles de purificación permitió separarlas en tres grupos, tanto para las preparaciones de VMP de las plantas control como para las de la línea *Atsbh1-1*. En la Tabla XIV se puede observar que el Grupo I está integrado por las VMP con menor grado de purificación: en la Col-0 con una sensibilidad al vanadato del 54 al 58 %, mientras que las equivalentes en las VMP de la línea *Atsbh1-1* presentaron porcentajes del 50-51 %. En el Grupo II, de pureza intermedia, se incluyeron las VMP de la Col-0 con inhibición por vanadato entre 60 y 64 %, mientras que los de la mutante estuvieron las VMP con inhibición del 55 al 67 % de vanadato. En el grupo III se incluyeron aquellas preparaciones con la mayor pureza, de 67-73 % en el caso de la

Tabla XIII. Determinación de la hidrólisis de ATP y su sensibilidad a inhibidores en la fracción microsomal y en las vesículas de membrana plasmática obtenidas de la línea silvestre Col-0. Se muestra un ejemplo de los datos originales obtenidos: la determinación de la Absorbancia debida al fosfato liberado por la muestra, la diferencia de Absorbancia entre la muestra y el blanco (h. química), y la conversión del valor de la diferencia entre esas absorbancias a nmoles de Pi liberado por min por mg de proteína. Estos valores se muestran para la hidrólisis total de ATP medida en ausencia de inhibidores (HT), la hidrólisis de ATP medida en presencia de ortovanadato de sodio (VO₄) y la hidrólisis de ATP medida en presencia de azida de sodio (N₃), de nitrato de potasio y molibdato de sodio (NO₃/MoO₄). Se muestra el valor de % de hidrólisis de ATP en presencia de cada inhibidor con respecto al control, que es la hidrólisis total. Cada punto que se muestra es el promedio de la determinación que se hizo por triplicado.

Fracción microsomal de <i>Atsbh1-1</i>						
	Datos de absorbancia por triplicado (UDO)	Promedio	Absorbancia corregida Abs_m-Abs_{T0} (UDO)	Actividad nmolesPi/mg/min	% actividad	% inhibición
HT	0.672 0.686	0.679	0.264	111.628	100	0
VO ₄	0.501 0.498	0.500	0.085	35.729	33.137	66.863
N ₃	0.581 0.590	0.586	0.171	72.093	66.863	33.137
NO ₃ /MoO ₄	0.503 0.500	0.502	0.087	36.575	33.922	66.078
SDS (h. química)	0.407 0.404	0.406	---	---	---	---
Vesículas de membrana plasmática <i>Atsbh1-1</i>						
HT	0.446 0.452	0.449	0.137	57.928	100	0
VO ₄	0.339 0.344	0.342	0.030	12.474	21.533	78.467
N ₃	0.405 0.426	0.416	0.104	43.763	75.548	24.452
NO ₃ /MoO ₄	0.348 0.343	0.346	0.034	14.165	24.453	75.547
SDS h. química)	0.310 0.292	0.301	---	---	---	---

Col-0 y de 79-90 % en la línea *Atsbh1-1*. Este agrupamiento se muestra gráficamente en la Figura 22. Se puede observar que la inhibición por vanadato de la actividad de la

Tabla XIV Actividad de la ATPasa de H⁺ de preparaciones de membrana plasmática de las plantas de la línea silvestre Col-0 y de la línea mutante *Atsbh1-1* agrupándolas por grado de pureza (% de inhibición a vanadato). La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se expresa en términos tanto de la actividad sensible a vanadato como en términos de la actividad insensible a NO₃ y MoO₄. Cada línea horizontal en cada grupo corresponde a una preparación membranal independiente, excepto en los casos marcados con ⁺ que indican que se trata de determinaciones de la misma preparación membranal. Se presentan los valores promedio con su desviación estándar.

Agrupación 1						
GRUPO 1	Col-0			<i>Atsbh1-1</i>		
	Inhibición por VO ₄	Sensible a VO ₄	Insensible a NO ₃ /MoO ₄	Inhibición por VO ₄	Sensible a VO ₄	Insensible a NO ₃ /MoO ₄
	%	nmolesPi/mg/min		%	nmolesPi/mg/min	
	54.02	68.27	114.26	49.90	82.60	156.80
	57.49 ⁺	109.30	168.46	50.01	110.25	111.10
	57.51 ⁺	107.20	207.46	50.76	115.60	153.63
Promedio	56.34	94.92	163.39	50.22	102.82	140.51
D.S	±2.01	±23.11	±46.81	±0.47	±17.71	±25.52
Grupo 2	60.20	130.80	195.94	55.00	28.77	24.23
	63.02	145.20	163.29	55.03	30.06	34.47
	64.00	164.00	212.85	63.30 ⁺⁺⁺	27.70	25.50
				66.80 ⁺⁺⁺	51.01	45.66
Promedio	62.41	146.67	190.69	60.03	34.39	32.47
D.S	±1.97	±16.65	±25.19	±5.97	±11.13	±9.91
Grupo 3	67.03 ⁺⁺	154.96	154.47	78.47	45.46	14.16
	72.90 ⁺⁺	178.64	164.93	84.85 ⁺⁺⁺⁺	28.78	52.77
				89.65 ⁺⁺⁺⁺	54.88	45.61
Promedio	69.97	166.80	159.70	84.32	43.04	37.51
D.S	±4.15	±16.74	±7.39	±5.61	±13.22	±20.54

ATPasa de H^+ aumentó un 10% en el grupo II comparado con el grupo I, de igual manera el grupo III aumentó un 20% nuevamente comparado con el grupo I. Mientras que en la línea *Atsbh1-1* sigue la misma tendencia que la control en los dos primeros grupos, mostrando una leve diferencia de un 10% entre cada grupo. Sin embargo, en el último grupo en el que se representan las preparaciones con mayor grado de pureza, se encontraron diferencias entre la mutante y el control, en donde la Col-0 alcanzó un grado de sensibilidad a vanadato del 70% comparado con el de 84 % de la mutante.

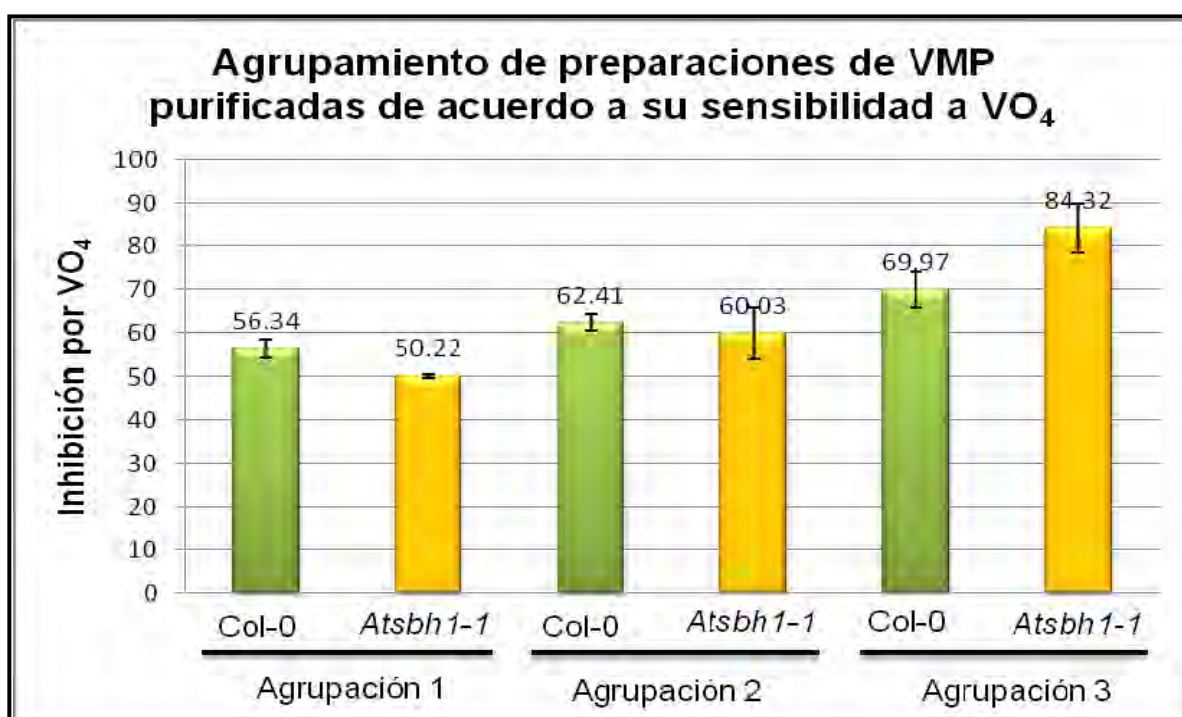


Figura 22.- Agrupación de las preparaciones de VMP obtenidas de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1-1* según su grado de pureza. Todas las preparaciones fueron evaluadas por su grado de pureza, valorada como la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato. El total de preparaciones independientes de VMP agrupadas fue de 6 para la Col-0 y de 8 para la mutante *Atsbh1-1*. La distribución por grupo se detalla en la Tabla XIII. Se presentan los valores promedio con su desviación estándar.

Con los datos de la Tabla XIV se construyeron los gráficos que ilustraran el comportamiento de la actividad de la ATPasa de H^+ en las dos líneas, tomando en cuenta el agrupamiento mencionado. Para graficar la actividad de la ATPasa de H^+ en las dos líneas se consideraron dos valores que habían sido medidos en el mismo procedimiento y que aparecen en la Tabla XIV como la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato y como la actividad insensible a nitrato y molibdato. Ambas condiciones experimentales son aptas para conocer la actividad de la ATPasa de H^+ en nuestro sistema de ensayo de hidrólisis de ATP.

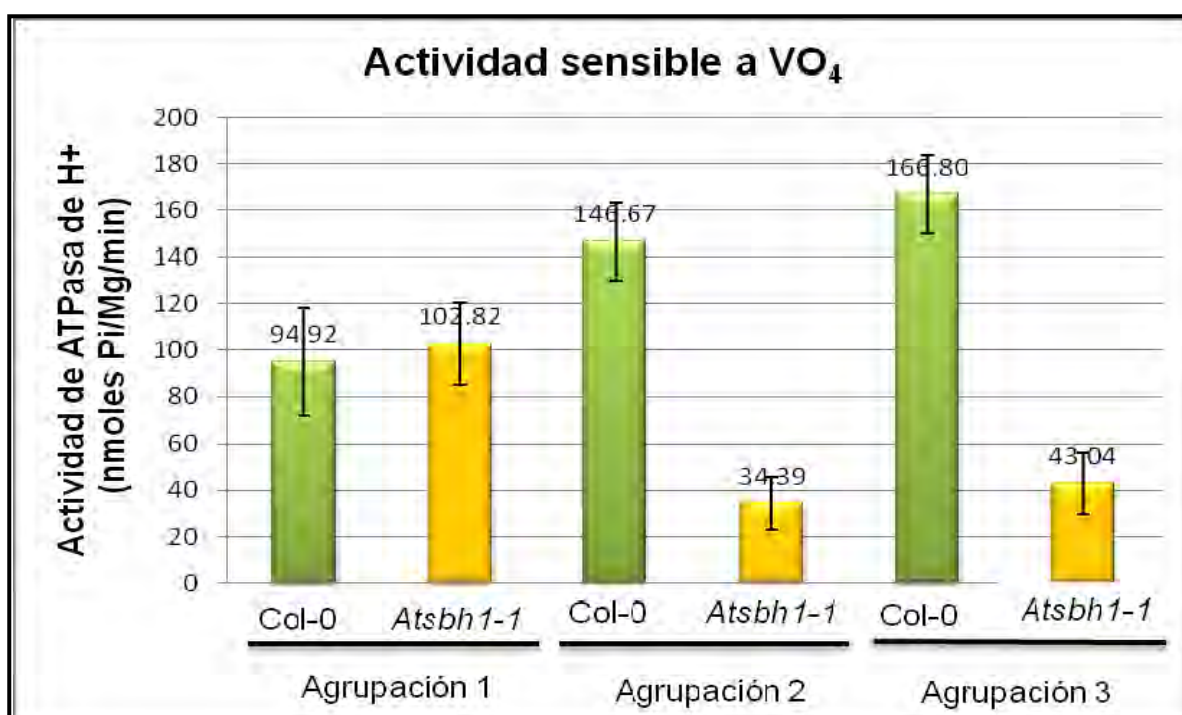


Figura 23. Actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1-1* en preparaciones de VMP agrupadas según su pureza. La agrupación de las preparaciones de VMP se hizo de acuerdo a su grado de pureza, valorada como la actividad de la ATPasa que fue sensible a VO_4 (calculada como la diferencia entre la actividad total menos la actividad sensible a VO_4). El total de las preparaciones independientes de VMP agrupadas fue de 6 para la Col-0 y de 8 para la línea *Atsbh1-1*. Se presentan los valores promedio con su desviación estándar.

En la Fig. 23 se observa que la pureza de las preparaciones de VMP de la Col-0 medida como la actividad de la ATPasa de H⁺ sensible a vanadato aumentó un 20% entre los grupos I y II y alrededor de un 70% entre el grupo I y III. En la línea mutante el aumento en la purificación fue también muy notorio entre grupos, ya que de un 50 % en el grupo I subió a un 60 % en el grupo II y a un 84 % en el grupo III. Sin embargo, se observó que aunque el grado de purificación aumentaba en la Col-0 y en la mutante (ver la relación entre cada agrupamiento), la actividad de la ATPasa decreció de manera muy importante en la línea mutante *Atsbh1-1* en los agrupamientos II y III, decayendo entre un 60-70 %.

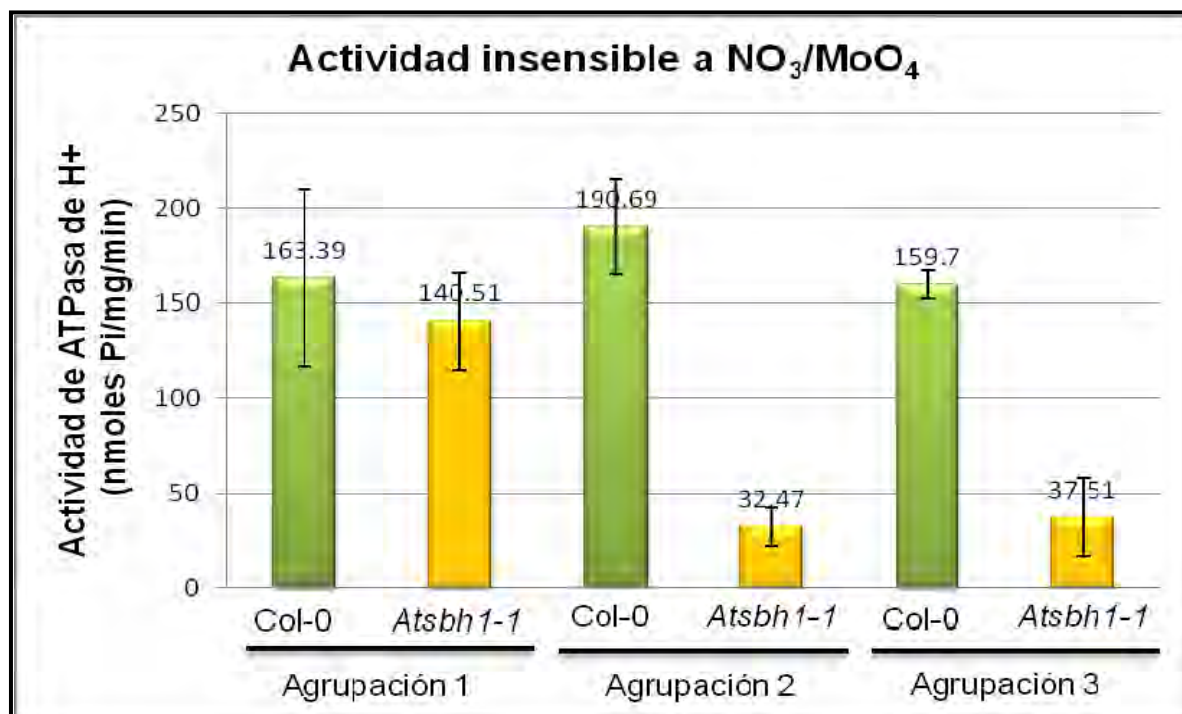


Figura 24. Actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1-1* en preparaciones de VMP agrupadas según su pureza. La agrupación de las preparaciones de VMP se hizo de acuerdo a su grado de pureza, valorada como la actividad de la ATPasa que fue insensible a nitrato y molibdato (calculada como la diferencia entre la actividad total menos la actividad sensible a nitrato y molibdato). El total de las preparaciones independientes de VMP agrupadas fue de 6 para la Col-0 y de 8 para la línea *Atsbh1-1*. Se presentan los valores promedio con su desviación estándar.

En la gráfica de la Fig. 24 se representa la actividad de la ATPasa de H⁺ pero ahora expresada como hidrólisis de ATP insensible a NO₃/MoO₄. Estos valores nos dan la información de aquellas enzimas que se encuentran activas hidrolizando ATP, y que

Tabla XV. Comparación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de preparaciones de membrana plasmática de las plantas de la línea silvestre Col-0 y de la línea mutante *Atsbh1-1* agrupadas por su grado de pureza (% de inhibición a vanadato). La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se expresa en términos tanto de la actividad sensible a vanadato como de la actividad insensible a N₃ y MoO₄. Las líneas horizontales en cada grupo corresponden a preparaciones membranales independientes, excepto en los casos marcados con ⁺ en donde se trata de determinaciones de la misma preparación membranal. Se presentan los valores promedio con su desviación estándar o bien con error estándar.

Agrupación 2						
	Col-0			<i>Atsbh1-1</i>		
	Inhibición por VO ₄	Sensible a VO ₄	Insensible a NO ₃ /MoO ₄	Inhibición por VO ₄	Sensible a VO ₄	Insensible a NO ₃ /MoO ₄
	%	nmolesPi/mg/min		%	nmolesPi/mg/min	
GRUPO 1	54.02	68.27	114.26	49.90	82.60	156.80
	57.49 ⁺	109.30	168.46	50.01	110.25	111.10
	57.51 ⁺	107.20	207.46	50.76	115.60	153.63
Promedio	56.34	94.92	163.39	50.22	102.82	140.51
D.S	±2.01	±23.11	±46.81	±0.47	±17.71	±25.52
E.S	±1.16	±13.34	±27.02	±0.27	±10.22	±14.73
Grupo 2	60.20	130.80	195.94	55.00	28.77	24.23
	63.02	145.20	163.29	55.03	30.06	34.47
	64.00	164.00	212.85	63.30	27.70	25.50
	67.03	154.96	154.47	66.80	51.01	45.66
	72.90	178.64	164.93	78.47	45.46	14.16
				84.85	28.78	52.77
			89.65	54.88	45.61	
Promedio	69.97	166.80	159.70	84.32	43.04	37.51
D.S	±4.15	±16.74	±7.39	±5.61	±13.22	±20.54
E.S	±2.16	±8.12	±11.12	±5.34	±4.49	±5.30

tendrían que ser propiamente las ATPasas de H⁺ de las VMP, ya que el ensayo se está haciendo en presencia de los inhibidores de las otras enzimas que pueden estar hidrolizando ATP y que son la ATPasa de tonoplasto y fosfatasas. También se observa que la tendencia fue la misma que en la Fig. 23, manifestándose una mayor diferencia entre las actividades de la ATPasa de H⁺ de las dos líneas en aquellas preparaciones con pureza más alta (grupos II y III). En el agrupamiento I, la actividad de la mutante se inhibió un 14 %, en el II 83 % mientras que en el III la inhibición fue de 76.5 %. De esta manera las gráficas de las Figs. 23 y 24 muestran que la actividad de la ATPasa de H⁺ de las VMP fue menor en las preparaciones de la mutante. Estas diferencias se pueden apreciar mejor en la Tabla XVI.

En las Figs. 22, 23 y 24 se observó que las agrupaciones II y III presentaban características similares de purificación, por lo que se efectuó una nueva agrupación, reuniendo los datos de las agrupaciones II y III. En la Tabla XV se muestra este reagrupamiento.

Esta reagrupación permite tener más preparaciones en el grupo 2, que ahora incluye un intervalo de purificación que oscila entre 60.20-72.90 % de inhibición por VO₄ en la línea Col-0 y un intervalo de 55-89.65 % para la línea *Atsbh1-1*. De manera análoga a lo que se hizo con los valores de la Tabla XIV, nuevamente se construyeron los gráficos respectivos.

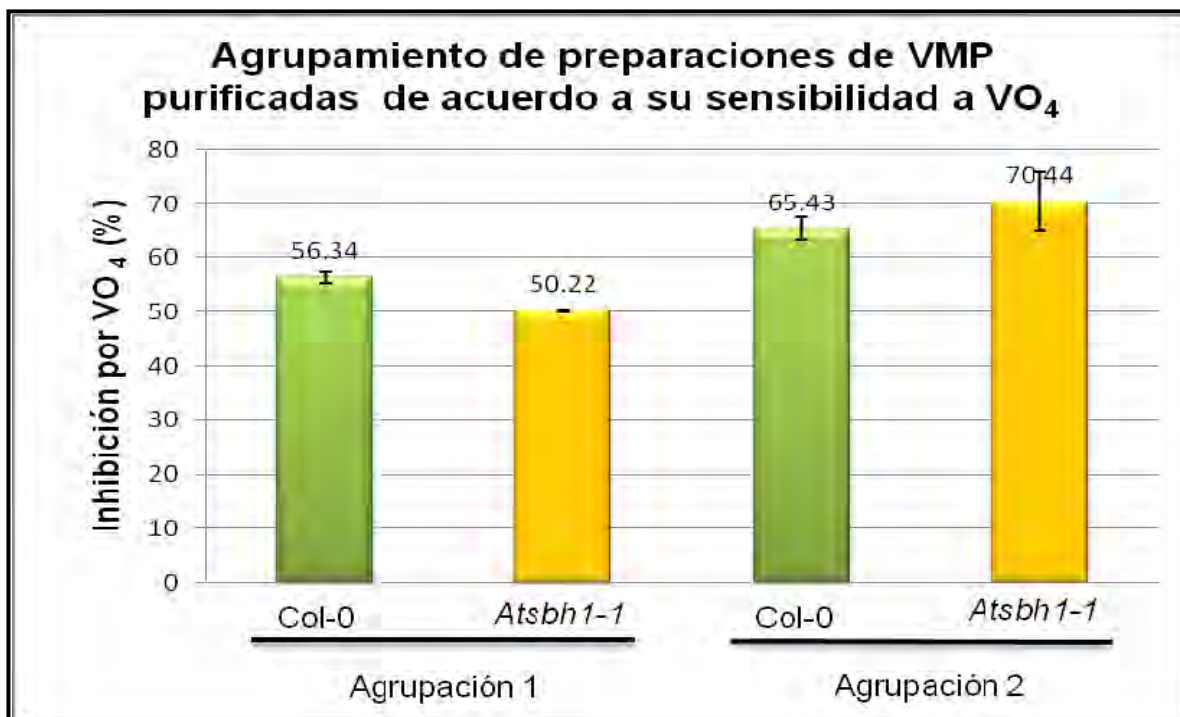


Figura 25.- Agrupación de las preparaciones de VMP obtenidas de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1-1* según su grado de pureza. La pureza fue valorada como la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato. El total de preparaciones independientes de VMP agrupadas fue de 6 para la Col-0 y de 8 para la mutante *Atsbh1-1*. La distribución por grupo se detalla en la Tabla XIV. Se presentan los valores promedio con su error estándar.

En la Fig. 25 se observa que en ambas líneas el porcentaje de inhibición por VO₄ es muy semejante en cada grupo tanto para las preparaciones de la línea silvestre como para la mutante. Sin embargo, si se compara cada línea entre los dos grupos hubo un aumento del 10% en la purificación de la línea control en sus dos agrupaciones, mientras que para la línea mutante la purificación aumentó un 20 %

En la Fig. 26 se representa la actividad de la ATPasa de H^+ que es sensible a VO_4 , en las preparaciones de la línea silvestre y de la mutante, mostrando que en el grupo I hubo un aumento de la actividad del 7.9 % en la línea la línea mutante comparada con la control. En la agrupación II la actividad de la línea mutante decayó radicalmente hasta un 75.38% de la actividad de la línea control.

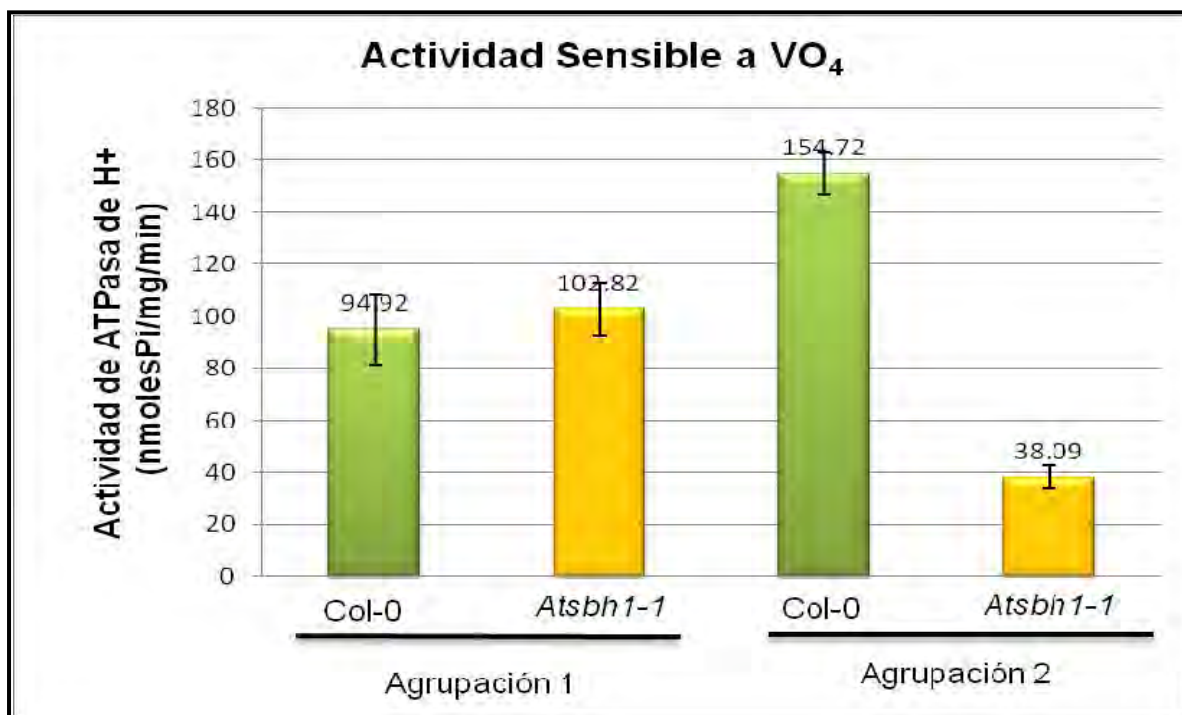


Figura 26. Actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1-1* en preparaciones de VMP agrupadas según su pureza. La agrupación de las preparaciones de VMP se hizo de acuerdo a su grado de pureza, valorada como la actividad de la ATPasa que fue sensible a VO_4 (calculada como la diferencia entre la actividad total menos la actividad sensible a VO_4). El total de las preparaciones independientes de VMP agrupadas fue de 6 para la Col-0 y de 9 para la línea *Atsbh1-1*. Se presentan los valores promedio con su error estándar.

Finalmente en la Fig. 27 se presenta el comportamiento de la actividad de la ATPasa de H^+ medida como la actividad insensible a NO_3^-/MoO_4^{2-} . Se observa que el patrón fue muy parecido al de la Fig. 25 y aquí en el Agrupamiento 1 la mutante mostró un 13% de inhibición con respecto al control. Mientras que en el agrupamiento 2 la inhibición observada fue del 81 %. Estos resultados se resumen en la Tabla XVI en la que quedan indicados el número de veces que se reduce la actividad o el % de

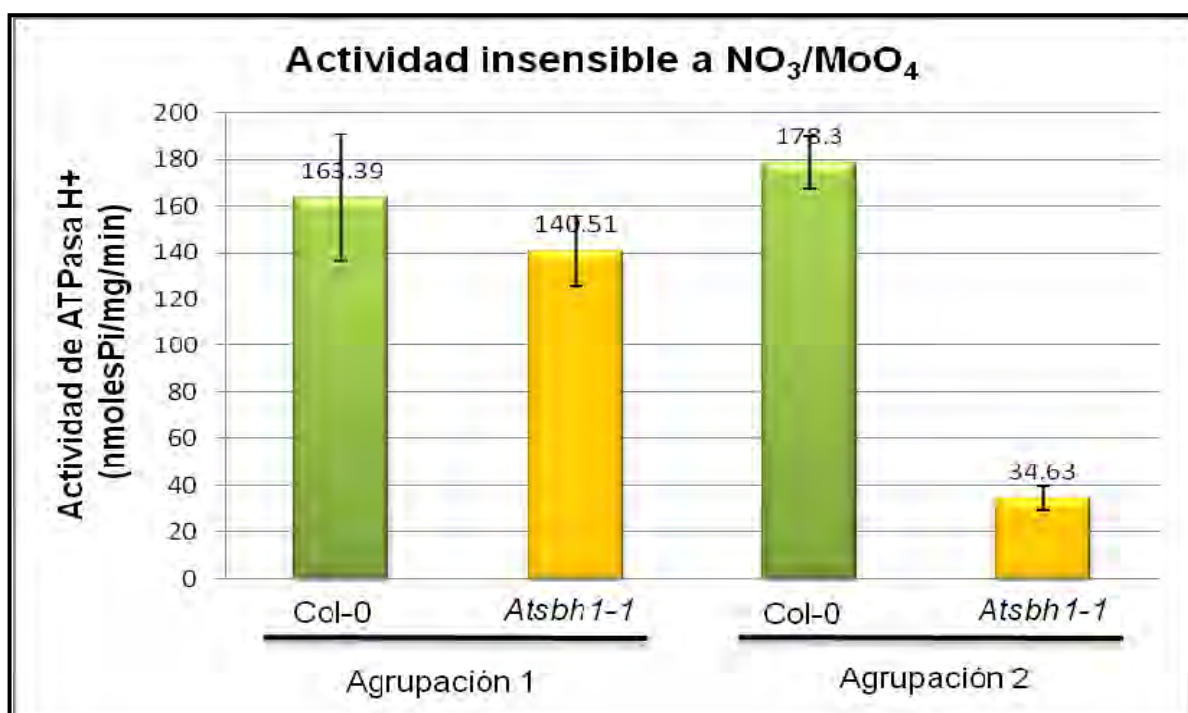


Figura 27. Actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Atsbh1-1* en preparaciones de VMP agrupadas según su pureza. La agrupación de las preparaciones de VMP se hizo de acuerdo a su grado de pureza, valorada como la actividad de la ATPasa que fue insensible a NO_3^- y MoO_4^{2-} (calculada como la diferencia entre la actividad total menos la actividad sensible a NO_3^-/MoO_4^{2-}). El total de las preparaciones independientes de VMP agrupadas fue de 6 para la Col-0 y de 9 para la línea *Atsbh1-1*. Se presentan los valores promedio con su error estándar.

inhibición equivalente. De acuerdo a estos valores se puede observar que analizando la mayoría de las preparaciones membranales de ambas líneas se encontró consistentemente una inhibición de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la mutante con respecto al control y que este efecto fue más claro en preparaciones con alto nivel de purificación.

Tabla XVI. Actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en las líneas Col-0 y SBH1-1. La actividad se midió como actividad sensible a vanadato o insensible a nitrato y molibdato tomando los datos de la Tabla XIV y XV. Para indicar la inhibición de la actividad en la enzima de la mutante, se expresa la relación entre la actividad que se determinó en la Col-0 dividida entre la de la mutante, o bien como % de inhibición de la actividad de la mutante con respecto a la actividad de la Col-0.

	Agrupaciones	Actividad sensible a VO ₄ Relación Col/ <i>Atsbh1-1</i>	Actividad insensible a NO ₃ /MoO ₄ Relación Col/ <i>Atsbh1-1</i>
Agrupación 1	1	94.92±23.11/102.82±17.71 (0.9 veces) 8.3 % de aumento	163.39±46.81/140.51±25.5 2 (1.2 veces) 13.0 % de disminución
	2	146.67±16.65/34.39±11.13 (4.3 veces) 77 % de disminución	190.69±25.19/32.47±11.13 (5.9 veces) 83 % de disminución
	3	166.80±16.74/43.04±13.22 (3.9 veces) 74.2 % de disminución	159.70±25.19/32.47±20.54 (4.9 veces) 76.5 % de disminución
Agrupación 2	1	94±23.11/102.82±17.71 (0.9 veces) 8.3 % de aumento	163.39±46.81/140.51±25.5 2 (1.2 veces) 13.0 % de disminución
	2	154.72±18.17/38.09±11.90 (4.1 veces) 75.4 % de disminución	178.30±24.88/34.64±14.03 (5.1 veces) 80.6 % de disminución

6. Análisis electroforético de las proteínas de la mutante *At sbh1-1* en SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomassie y Nitrato de plata.

Con el fin de observar el perfil electroforético de las proteínas presentes a lo largo del proceso de purificación de las membranas, se realizó un gel desnaturalizante cargando 15 μg de proteína. En la Fig. 28 se observa el patrón de proteínas en cada fracción subcelular. Se observó un patrón de bandas definidas con diferentes intensidades y con masas moleculares entre 180 y 5 kD. La banda más intensa que se

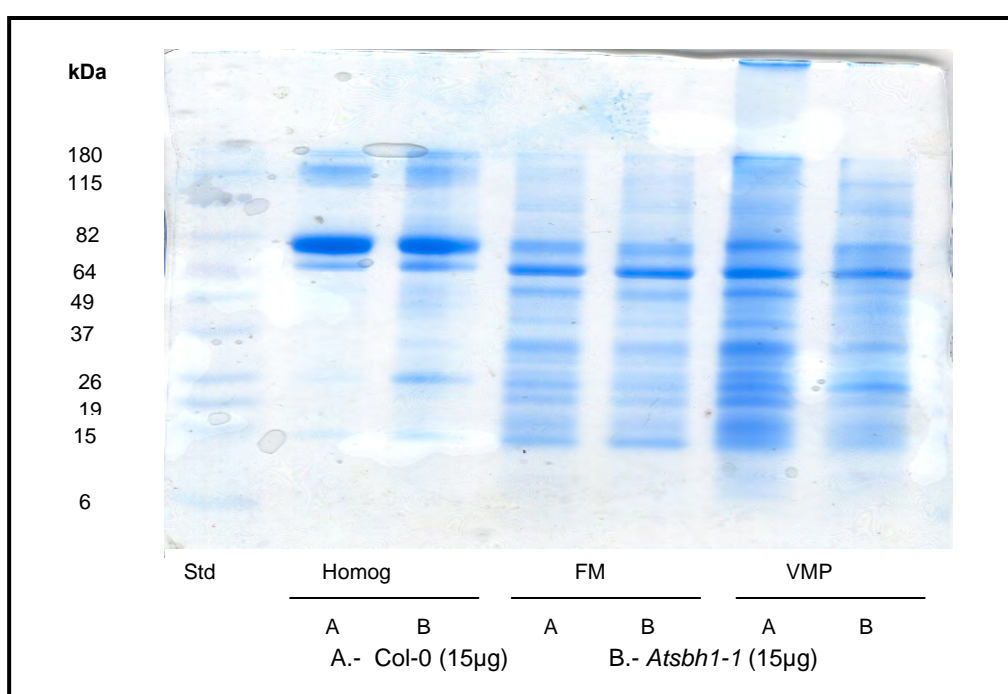


Figura 28. Separación de proteínas de fracciones subcelulares de la línea silvestre Col-0 y la línea mutante *Atsbh1-1*. Se cargaron 15 μg de proteína por carril, luego fueron separadas por SDS-PAGE y el gel fue teñido con Azul de Coomassie. Perfil de proteínas en cada una de las fracciones: homogenado (Homog), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP). A representa fracciones de la línea silvestre Col-0 y B a la línea mutante *Atsbh1-1*.

observó en todas las fracciones fue la banda que corresponde a la subunidad grande de la RUBISCO, con un peso aproximadamente de 70-60 kDa. En términos generales las bandas presentes en las preparaciones de la línea control estuvieron presentes en la mutante en la hidroxilasa.

Después con objeto de apreciar posibles diferencias entre los perfiles proteicos de la línea silvestre y de la mutante se realizó la comparación de 5 preparaciones de VMP independientes. Los geles fueron teñidos con plata. En la Fig. 29 se muestran los

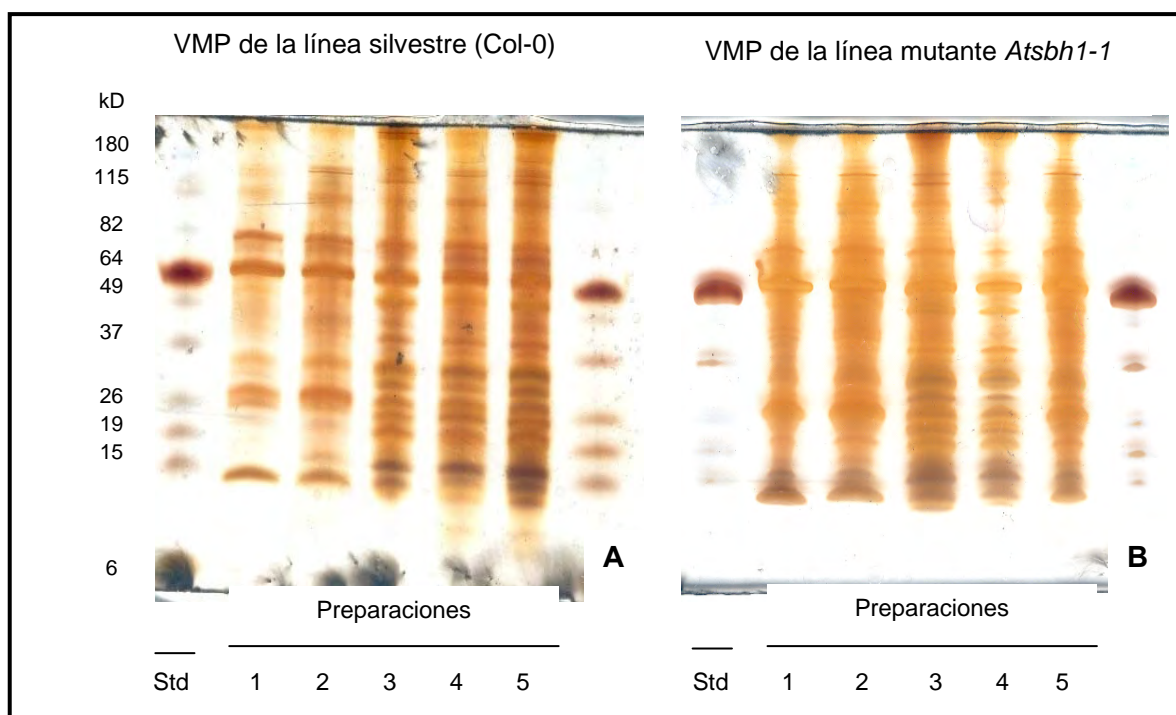


Figura 29. Separación de proteínas de 5 preparaciones diferentes de vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre Col-0 (A) y la línea mutante *Atsbh1-1* (B). Se cargaron 5 μg de proteína por carril, luego fueron separadas por SDS-PAGE y el gel fue teñido con plata. Del lado izquierdo se observan 5 preparaciones de VMP de la línea silvestre Col-0 y del lado derecho 5 preparaciones de VMP de la línea mutante *Atsbh1-1*. (Vorum *et al.*, 1996, 2001).

geles obtenidos. Aunque la cantidad de proteína cargada parece ser diferente, el número y las masas moleculares de las proteínas separadas parecen ser las mismas en todas las preparaciones en cada línea. Sin embargo el perfil electroforético de la línea silvestre y de la mutante es diferente. Como tanto las muestras de las líneas silvestre y mutante fueron separadas en dos geles diferentes y por lo tanto teñidos de manera individual para reducir los factores técnicos que pudieran dar diferencias en los perfiles electroforéticos, se realizó un gel SDS- PAGE.

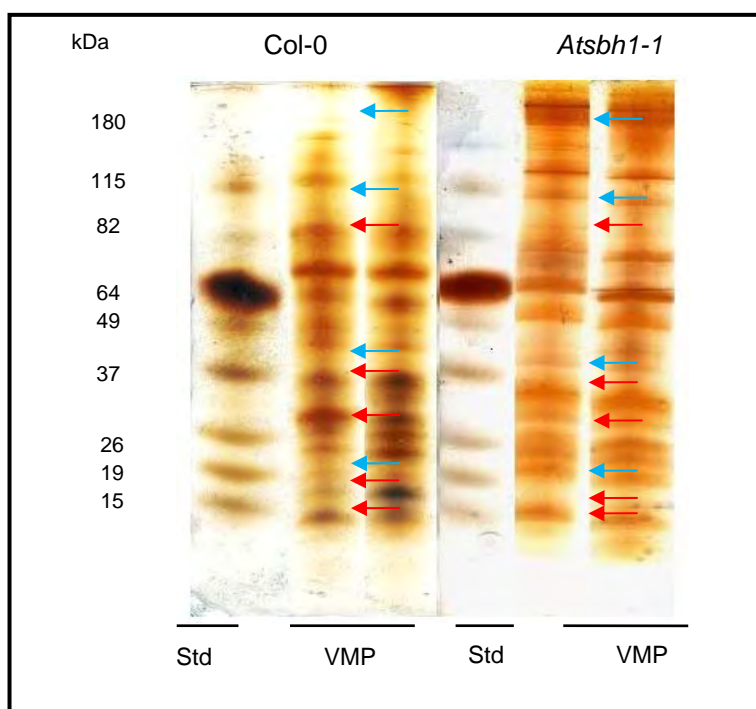


Figura 30. Separación de proteínas de preparaciones de vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre Col-0 y la línea mutante *Atsbh1-1*. Se cargaron 5 μg de proteína por carril, luego fueron separadas por SDS-PAGE y el gel fue teñido con plata. Del lado izquierdo se observan 2 preparaciones de VMP de la línea silvestre Col-0 y del lado derecho 2 preparaciones de VMP de la línea mutante *Atsbh1-1*.

En este nuevo gel (Fig. 30) se pueden observar 5 bandas marcadas con flechas de color rojo que presentan una mayor abundancia en la línea silvestre Col-0, mientras que la línea mutante la presenta con menor intensidad y en algunos casos no se observa dicha banda. Por otra parte las flechas de color azul indican aquellas 4 bandas de proteínas que no se encuentran en la línea silvestre Col-0 o que se encuentran en menor proporción que en la mutante (Fig. 30).

7. Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por medio de Réplica en Western.

La detección de la enzima se realizó por la técnica de réplica en Western usando dos anticuerpos, uno dirigido contra la ATPasa de H⁺ de betabel y otro contra la isoforma AHA3 de *Arabidopsis thaliana*. En la Fig. 31 se muestran las réplicas obtenidas. Se observó que ambos anticuerpos dieron una reacción contra una banda de 100 kDa, que corresponde a la ATPasa de H⁺, si bien ambos anticuerpos reaccionaron contra otras bandas de diferentes pesos moleculares. En particular, el anticuerpo de betabel reaccionó fuertemente contra una banda de aproximadamente 24 kDa, y también contra otras tres de 62, 49, y 8 kDa aproximadamente. Todas estas bandas aparecieron tanto en las dos preparaciones de vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre como de la línea *Atsbh1-1*. En el caso del anticuerpo contra la isoforma AHA3, el anticuerpo reaccionó contra bandas de 49 y 45 kDa en las vesículas de membrana plasmática de ambas líneas, mientras que en la línea silvestre el anticuerpo adicionalmente reaccionó con más bandas, aunque de baja intensidad, con pesos moleculares entre 49 y 10 kDa aproximadamente.

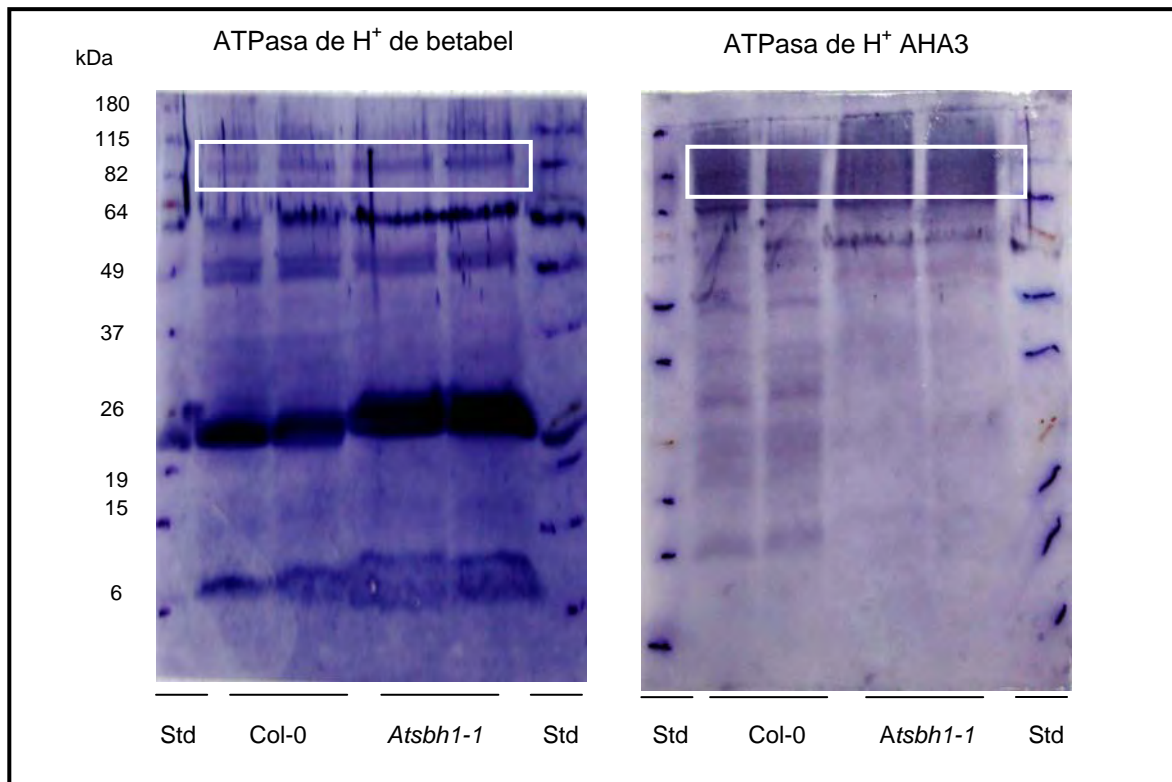


Figura 31. Inmunodetección de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre y de la línea *Atsbh1-1*. 40 µg de proteína membranal de diferentes preparaciones de vesículas de membrana plasmática de las líneas indicadas se cargaron en un gel de SDS, mismo que fue transferido a una membrana de PVDF como se indica en Materiales y Métodos. La membrana fue expuesta a los anticuerpos dirigidos contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de betabel (panel izquierdo) o de la isoforma AHA3 de la ATPasa de H⁺ (panel derecho).

El resultado más relevante en estas inmunodetecciones fue el de que la banda de la ATPasa de H⁺ está en niveles muy similares en las cuatro preparaciones probadas y por lo tanto no hay diferencias substanciales entre el contenido de ATPasa de H⁺ en las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de la línea control y el de la línea mutante en el gene de la hidroxilasa.

12. DISCUSIÓN

En la literatura se han estudiado los efectos de modificar el grado de hidroxilación de las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas de los lípidos membranales, es decir de los ácidos grasos y de las bases de cadena larga. Estos trabajos se han evaluado en levaduras, células de mamífero y de plantas. Una de las herramientas más usadas es el empleo de mutantes en los genes que codifican a las enzimas que hidroxilan estas cadenas hidrofóbicas. Los resultados encontrados en *Saccharomyces cerevisiae* señalan que la modificación en la expresión del gen *SUR 2* o *SYR 2* que codifica a la hidroxilasa del C-4 de las BCL conlleva directamente a una deficiencia en los niveles de la fitoesfingosina, que es la base esfingoidea trihidroxilada más abundante y una modificación en la concentración de esfingolípidos complejos. Esta variaciones produjeron cambios en el tamaño y la forma de las estructuras membranales “Membranas Resistentes a la solubilización por Detergentes” (DRM) analizadas por microscopía electrónica. El cambio estructural en los esfingolípidos afectó también la interacción con la siringomicina E, una toxina bacteriana (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004).

En 2007, Chen y colaboradores dieron a conocer algunos de los resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana*, reportando que las hidroxilaciones de las BCL en el C4 son importantes en el crecimiento y fertilidad de las plantas. Ellos describieron la existencia de dos genes en *Arabidopsis* que codifican para las hidroxilasas SBH1 y la SBH2 que hidroxilan a las bases esfingoideas en la posición 4 de la cadena hidrocarbonada. Ambas se expresan en todos los órganos de la planta y su actividad es crítica, dado que mutaciones que anulan la expresión de ambos genes (mutantes dobles) se reflejan en la variación del contenido y composición de esfingolípidos. Los fenotipos de estas plantas revelaron una gran reducción en la velocidad de crecimiento de la plántula traducida en plantas enanas, con señales de muerte celular en la hojas (clorosis). Este fenotipo se asoció a un menor alargamiento de las células del hipocotilo y las raíces y a una menor división celular en las zonas meristemáticas, así como a un incremento de bases de cadena larga dihidroxiladas. En las mutantes simples, en las

que sólo uno de los dos genes de las hidroxilasas está mutado, los efectos fenotípicos están muy atenuados.

Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los cambios en la composición de esfingolípidos son capaces de producir estas diferencias fenotípicas son desconocidos, ya que en el trabajo mencionado (Chen *et al.*, 2008), los cambios en la composición de esfingolípidos se determinaron a nivel de toda la planta, sin diferenciar su procedencia subcelular. Por ello es importante conocer cómo estos cambios inciden en la estructura y función de las bicapas lipídicas membranales y en particular en la función de enzimas membranales. Un enfoque experimental para explorar estos efectos de la variación de la estructura de los esfingolípidos en las funciones membranales fue el seguido en este trabajo de tesis, en el que por primera vez se aislaron VMP de una mutante en la hidroxilación de bases esfingoideas. Para ello, se purificaron y caracterizaron VMP obtenidas de la mutante simple *Atsbh1-1* y del genotipo silvestre para determinar si el grado de hidroxilación influía sobre la actividad de las proteínas membranales. La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, la cuál constituye un buen candidato de proteína membranal para el estudio de la interacción proteína-esfingolípido.

1.- Análisis de características fenotípicas de *Atsbh1-1* (SALK_090881), mutante en el gene de la hidroxilasa.

Algunas de las diferencias fenotípicas entre la mutante *Atsbh1-1* comparada con el ecotipo silvestre (Col-0) coincidieron con las reportadas en el trabajo en el que se caracterizó esta mutante así como la otra mutante sencilla *Atsbh2-1* y la doble mutante (Chen *et al.* 2008). Estas diferencias fueron la menor velocidad de desarrollo y la aparición de clorosis en las hojas. Sin embargo, también detectamos diferencias adicionales como el tamaño, la forma y el color de las hojas, así como la rápida pérdida de turgencia en las hojas tras su corte de la planta. Los cambios en la forma y color de la hojas pueden estar relacionados con los patrones de crecimiento que han sido afectados por el desbalance en esfingolípidos complejos trihidroxilados (Chen *et al.*,

2008), ya que el 90% de los esfingolípidos de las hojas de *Arabidopsis* están hidroxilados en sus BCL y muy probablemente de sus membranas celulares. Por tanto un cambio en la estructura de estos lípidos podría estar afectando los patrones morfológicos de crecimiento (Chen *et al.*, 2006). Con respecto a la rápida pérdida de turgencia en la mutante en el gene de la hidroxilasa, ésta podría estar relacionada con una falla en el mecanismo de cierre de estomas debida a la falta de fitoesfingosina, ya que ésta es la base de cadena larga trihidroxilada más abundante en *Arabidopsis* (Markham *et al.*, 2006) se ha reportado que hay una cinasa que fosforila a la fitoesfingosina y que esta base fosforilada es necesaria en el mecanismo conducente al cierre de estomas mediado por ácido abscísico (Ng *et al.*, 2001).

2. Rendimientos en la obtención de las fracciones subcelulares de las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*

Los rendimientos en la obtención de FM a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 y de la mutante *Atsbha-1* no variaron con respecto a los de otras líneas de *Arabidopsis* como las que se mencionan en la Tabla XVI y que son líneas que presentan modificaciones genéticas en la enzima SPT y por tanto tienen perturbaciones en la síntesis de esfingolípidos: 1) línea *AtLcb2a-1* en presencia o ausencia de metoxifenoza o MFZ, un inductor del silenciamiento del gene de la subunidad Lcb2b de la SPT, 2) Línea *AtLcb2b-hp/Lcb2a* en presencia o ausencia de metoxifenoza (Ponce, 2009). Finalmente con respecto a otras especies como uva (Mas *et al.*, 1994), maíz (Carmona, 2009), frijol (Carmona, 2009) y tabaco (Carmona, 2009) se observó que la cantidad de proteína recuperada en la fracción microsomal estuvo también en el mismo intervalo que en las preparaciones reportadas en esta tesis. Sin embargo, otros tejidos y otras especies como uva (Mas *et al.*, 1994) y espinaca (Packer and Douce, 1987) mostraron recuperaciones mayores. En todos los casos el decaimiento del rendimiento se hizo evidente entre la fracción microsomal y la obtención de VMP en todas las líneas y especies que han sido estudiadas. De igual forma, los rendimientos

Tabla XVII. Comparación entre los rendimientos de fracciones subcelulares de distintas especies y líneas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los promedios en mg de proteína con su D.S.

Material biológico	Homogenado	Microsomas	VMP	DRM
<i>At</i> Ecotipo Col-0 ¹	16.620±3.654	0.752±0.359	-----	0.008
<i>At</i> Ecotipo Col-0²	13.819±1.260	0.879±0.042	0.044±0.012	-----
<i>AtLcb2a-1(-MFZ)</i> ¹	10.470±4.250	0.797±0.359	-----	0.028±0.012
<i>AtLcb2a-1(+MFZ)</i> ¹	17.63±8.717	1.549±0.808	-----	0.027±0.021
<i>AtLcb2b-hp/Lcb2a(-MFZ)</i> ¹	13.313±8.150	1.137±0.800	-----	0.004±0.012
<i>AtLcb2b-hp/Lcb2a(+MFZ)</i> ¹	22.48±10.450	1.206±0.292	-----	0.0284±0.015
<i>Atsbh1-1</i>²	15.765±3.552	1.178±0.131	0.027±0.002	-----
Embriones de <i>Zea mays</i> ³		2.4 ± 0.7	0.09 ± 0.05	0.02 ± 0.01
Hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> ³		1.3 ± 0.1	0.05 ± 0.02	0.01± 0.005
Hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> ³		1.0 ± 0.3	0.03 ± 0.02	0.02± 0.005
Plántulas de <i>Allium porrum</i> ⁴			0.100-150 ± 0.006	
Plántulas de <i>A. thaliana</i> ⁵			47.3±7.9	
Hojas de <i>Vigna vitifera</i> ⁶		4.57±0.18	0.21±0.03	
Plántulas de <i>Hordeum vulgaris</i> ⁵		58 mg	1.3 mg	
Hojas de espinaca ⁵		49.0	4.0	
Plántulas de avena ⁵		31.3	1.8 mg (cantidad)	

¹ Ponce, 2009 no publicado

² Este trabajo de tesis

³ Carmona, 2009

⁴ Laloi *et al.*, 2007

⁵ Packer y Douce, 1987

⁶ Mas *et al.*, 1994

obtenidos para el ecotipo Col-0 y *Atsbh1-1* presentaron el mismo comportamiento. Por otra parte, los rendimientos de las preparaciones de VMP de las plantas silvestres del ecotipo Col-0 y de la mutante *Atsbh1-1* fueron similares a los de otras especies como frijol y tabaco. En los casos de otras especies como plántulas de poro y de cebada, hojas de espinaca, avena y betabel no se reportó la cantidad de material biológico de la que se partió para la obtención de las VMP, mostrando sólo la cantidad de proteína total final, por lo que no se puede hacer una comparación. En la Tabla XVI se presentan también los rendimientos en la obtención de las fracciones resistentes a la solubilización por detergente (DRM) a partir de preparaciones de VMP, para ilustrar la importancia de tener buenos rendimientos en estas fracciones, ya que frecuentemente es necesario hacer un sub-fraccionamiento para estudios de balsas lipídicas.

3. Determinación de pureza. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.

Una de las formas de evaluar el grado de pureza de las preparaciones de VMP fue la de analizar su morfología con respecto a la preparación de las membranas totales, que es la fracción microsomal. El análisis por microscopía electrónica reveló que las preparaciones de VMP estaban realmente enriquecidas en membranas formando vesículas cerradas tanto en la línea silvestre como en la mutante. En sistemas de células animales (Schnitzer *et al.*, 2005) se encontró una morfología caveolar con un rango del tamaño de las vesículas de >150 y <700 nm de diámetro. Este tamaño varía con respecto a las reportadas a células vegetales que tienen un diámetro menor como se mostró en este trabajo. En el caso de ultraestructuras mostradas en tabaco (Mongrand *et al.*, 2004), las membranas de membrana plasmática se muestran cerradas (aunque no mencionan el porcentaje de pureza) y la homogeneidad, tamaño y morfología de las vesículas obtenidas se asemeja a los del ecotipo Col-0 y de la mutante *Atsbh1-1*.

La apariencia de las vesículas en las micrografías electrónicas indica que se logró una purificación muy alta, a pesar de que el reparto de fases utilizado en el procedimiento de purificación fue sólo uno, a diferencia de vesículas muy puras que alcanzan estos patrones en microscopía electrónica después de dos o tres repartos de

fase. Por ejemplo, en maíz (Sanchez-Nieto *et al.*,1997) muestra un porcentaje de pureza de 85%, (actividad de ATPasa sensible a vanadato) y las ultra estructuras mostradas se asemejan a las de este trabajo de tesis. Sin embargo, la metodología empleada por Sánchez-Nieto *et al.*(1997) incluyó dos sistemas de fases para asegurar la pureza y enriquecimiento de las VMP. En comparación, en esta tesis se obtuvieron membranas con purezas entre 50-87% en ambas líneas (expresado en porcentaje de inhibición sensible a vanadato), con sólo un sistema de fases, lo que permitió reducir el tiempo para la obtención de las preparaciones y se ahorraron cantidades de reactivos de alto costo.

Además, la comparación de resultados entre las VMP de las líneas silvestre y de la mutante indicó que la estructura de las vesículas no se vio afectada en la mutante, aún cuando se ha reportado que esta mutante presenta una disminución del 40 % de las bases trihidroxiladas comparadas con la silvestre, un mayor contenido de bases de cadena larga libres y fosforiladas (de 2 a 4 veces más que la silvestre) y de esfingolípidos totales (1.5 veces más de bases de cadena larga totales que la silvestre) (Chen *et al.*, 2008). Muy probablemente estas diferencias no logren expresar cambios a nivel tan grueso como el del análisis ultraestructural, pero sí se hagan evidentes a nivel molecular.

Como se verá en los párrafos subsiguientes, este parámetro morfológico de pureza coincidió con otros resultados obtenidos en esta tesis, en los que se mostró la reducción de contaminantes membranales de otras organelas, a través de la evaluación de la actividad de enzimas marcadoras en las preparaciones (78.42% de pureza expresado como porcentaje de inhibición sensible a vanadato), o por medio de la inmunodetección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

4. Actividad de AT Pasa de l as fraccio nes mem branales de las líneas Col-0 y *Atsbh1-1*. Enzimas marcadoras.

Otra de las formas de estimar la pureza de las preparaciones de VMP fue a través de los ensayos de actividad de enzimas marcadoras midiendo la hidrólisis de

ATP. Esto resultó adecuado, ya que permitió obtener información sobre la presencia de otras vesículas de organelas contaminantes en las preparaciones de VMP. Para ello, se determinó la hidrólisis de ATP de las preparaciones bajo la adición diferencial de inhibidores selectivos de enzimas que rompen el ATP y que pertenecen a diferentes compartimentos membranales. Los datos obtenidos a partir de este ensayo mostraron que las membranas mitocondriales y las de vacuola (ATPasas sensibles a azida y nitrato, respectivamente) estaban en proporción reducida (entre el 10 y 20 %) comparada con la proporción de la membrana plasmática (actividad de ATPasa sensible a vanadato) (entre el 60 y el 80%). Un contribuyente presente en las preparaciones fue una actividad de fosfatasa (hidrólisis de ATP sensible a molibdato), la cual constituyó alrededor de un 10-20% de la actividad total de hidrólisis de ATP en la preparación. Sin embargo, aunque estos datos son confiables pues son el producto de mediciones en 6 a 8 preparaciones independientes de membranas de la línea silvestre y de la mutante *Atsbh1-1*, hay que tomar en cuenta que ningún inhibidor es totalmente específico, ya que estos compuestos pueden activar o inhibir de manera cruzada a otras enzimas de otras organelas. Ésto se vio reflejado en que la suma de las inhibiciones parciales ocasionalmente no dió un 100% (particularmente en el caso de las mediciones en fracciones microsomales). Por esta razón es importante tener más de una forma de estimar la pureza de las fracciones membranales en procedimiento de aislamiento de membranas, por lo que fue importante el tener el parámetro morfológico, además del de enzimas marcadoras. En conjunto, ambos criterios indicaron que los niveles de purificación alcanzados en las preparaciones de VMP de las plantas silvestres y de la mutante *Atbh1-1* fueron muy altos.

De las preparaciones obtenidas (6 para el genotipo silvestre y 8 para el mutante) se obtuvieron purezas variables (desde un 54% hasta un 73% para la Col-0 y de 49% a un 82% de pureza para la línea *Atsbh1-1*) de acuerdo a las enzimas marcadoras, aún cuando se empleó la misma metodología. Lo anterior pudo deberse a factores diversos, desde la cantidad de hojas de las que se partió y su calidad, hasta la resuspensión del botón de las VMP, quedando algunas preparaciones más homogéneas de VMP que

otras. Es por ello que se realizaron los agrupamientos de preparaciones según la pureza para comparar preparaciones control y mutante adecuadamente. Así, surgieron tres tipos de agrupamiento en los que cada uno incluyó a preparaciones de las dos líneas con grados de pureza semejantes, utilizando la sensibilidad a vanadato como criterio de enriquecimiento en VMP. Los grados máximos de pureza en ambas líneas fueron muy altos y estuvieron entre el 73% y el 82%.

5. Comparación de la actividad de la ATPasa de H^+ de vesículas de membrana plasmática en la línea control (Col-0) y la línea mutante (*Atsbh1-1*) de acuerdo al grado de pureza de la preparación.

De las comparaciones entre las preparaciones agrupadas según su grado de purificación (en términos de porcentaje de actividad sensible a vanadato o insensible a azida y molibdato), quedó de manifiesto que mientras las preparaciones de las plantas silvestre y mutante podían tener porcentajes de purificación semejante, la actividad de la ATPasa de H^+ en valores absolutos resultaba ser más baja en las preparaciones de VMP de las plantas *Atsbh1-1* que en las de la silvestre. Esta diferencia fue más evidente en preparaciones o agrupaciones con mayor pureza, alcanzándose una máxima inhibición del 75% o de 81% en la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato o insensible a azida y molibdato, respectivamente.

Estos datos fueron de suma importancia, ya que sugieren que la ATPasa de H^+ necesita de esfingolípidos trihidroxilados para tener una actividad basal y desempeñar sus funciones normalmente dentro de la célula. Sin embargo, no puede descartarse que un aumento en los esfingolípidos complejos o en las bases libres o fosforiladas o en las bases dihidroxiladas en la membrana sean las responsables total o parcialmente de inducir esta notable disminución de actividad de la enzima en la membrana, ya que se sabe que en esta mutante simple, los niveles de las especies mencionadas de esfingolípidos aumentan (Chen *et al.*, 2008). Estos datos también indican que los cambios en los esfingolípidos totales tienen impacto en la membrana plasmática y que si estos cambios no pueden visualizarse a nivel de ultraestructura, sí pueden verse a

nivel molecular. El número de preparaciones independientes y el número de determinaciones de hidrólisis de ATP efectuadas dan una gran confiabilidad a los datos obtenidos, lo cual se manifiesta en los valores estadísticos presentados.

6. Análisis electroforético de las proteínas de la mutante *Atsbh1-1* en SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomassie y Nitrato de plata.

Con objeto de explorar si había diferencias entre los patrones de proteínas membranales de las plantas de la mutante *Atsbh1-1* y la control, se llevó a cabo la separación electroforética de las proteínas de las preparaciones de VMP correspondientes. Aparentemente, el análisis electroforético de ambas líneas no presentó variabilidad por lo menos en aquellas proteínas que se encontraban en mayor proporción según se mostró en los geles con Azul de Coomassie en las preparaciones de homogenado, microsomas y VMP. Sin embargo, en la tinción con plata, que es una técnica más sensible, y que se realizó sólo en VMP, aunque se observó un patrón similar entre aquellas proteínas que se encontraban en mayor proporción, se encontraron cuatro bandas de proteínas ausentes o en menor cantidad en el control que en la línea mutante y 5 proteínas en la línea control que estaban en mayor cantidad que en la mutante. Estas diferencias podrían ser mejor documentadas en una separación en doble dimensión (por su peso molecular y por su *pI*) y un posterior análisis por espectrometría de masas o de secuenciación de aminoácidos para lograr la identificación de las proteínas variables. Lo que es muy importante ciertamente, es la observación de que las proteínas membranales presentan una abundancia diferencial en la mutante y en el control, sugiriendo que el ambiente de esfingolípidos tiene una influencia en la presencia de proteínas de la membrana plasmática. Otros trabajos han mostrado diferencias en los patrones de proteínas de la membrana plasmática en respuesta a estrés por frío por ejemplo (Minami *et al.*, 2009) o por la exposición a patógenos (Mongrand *et al.*, 2004), pero no se ha reportado ningún trabajo con respecto a la hidroxilación de esfingolípidos hasta ahora en plantas.

7. Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por medio de Réplica en Western.

Ya que los resultados habían indicado que la actividad de la ATPasa de H⁺ estaba disminuida hasta en un 75% en las VMP más puras de la línea mutante con respecto a la control, era importante determinar si esta disminución en la actividad se debía a una menor cantidad de enzima en estas membranas plasmáticas. La cantidad de proteína encontrada fue la misma en ambas líneas, indicando que se seguía sintetizando e incorporando la misma cantidad de enzima a la membrana independientemente de la ausencia de las hidroxilaciones en las BCL que integran a los esfingolípidos, a diferencia de lo que sucede con la misma enzima de vacuola en la levadura en donde los esfingolípidos son necesarios para la estabilización y correcta inserción de la proteína en la membrana plasmática (Chung *et al.*, 2003). Es ahora muy interesante determinar la razón de esta baja de actividad de la enzima, resultando probable que en las membranas de la mutante, los cambios en el ambiente esfingolipídico (menor cantidad de bases trihidroxiladas, mayor cantidad de bases dihidroxiladas, libres o fosforiladas) impidan una adecuada conformación de la proteína en la membrana, lo cual redunde en una menor actividad (ver modelo en la Fig 32).

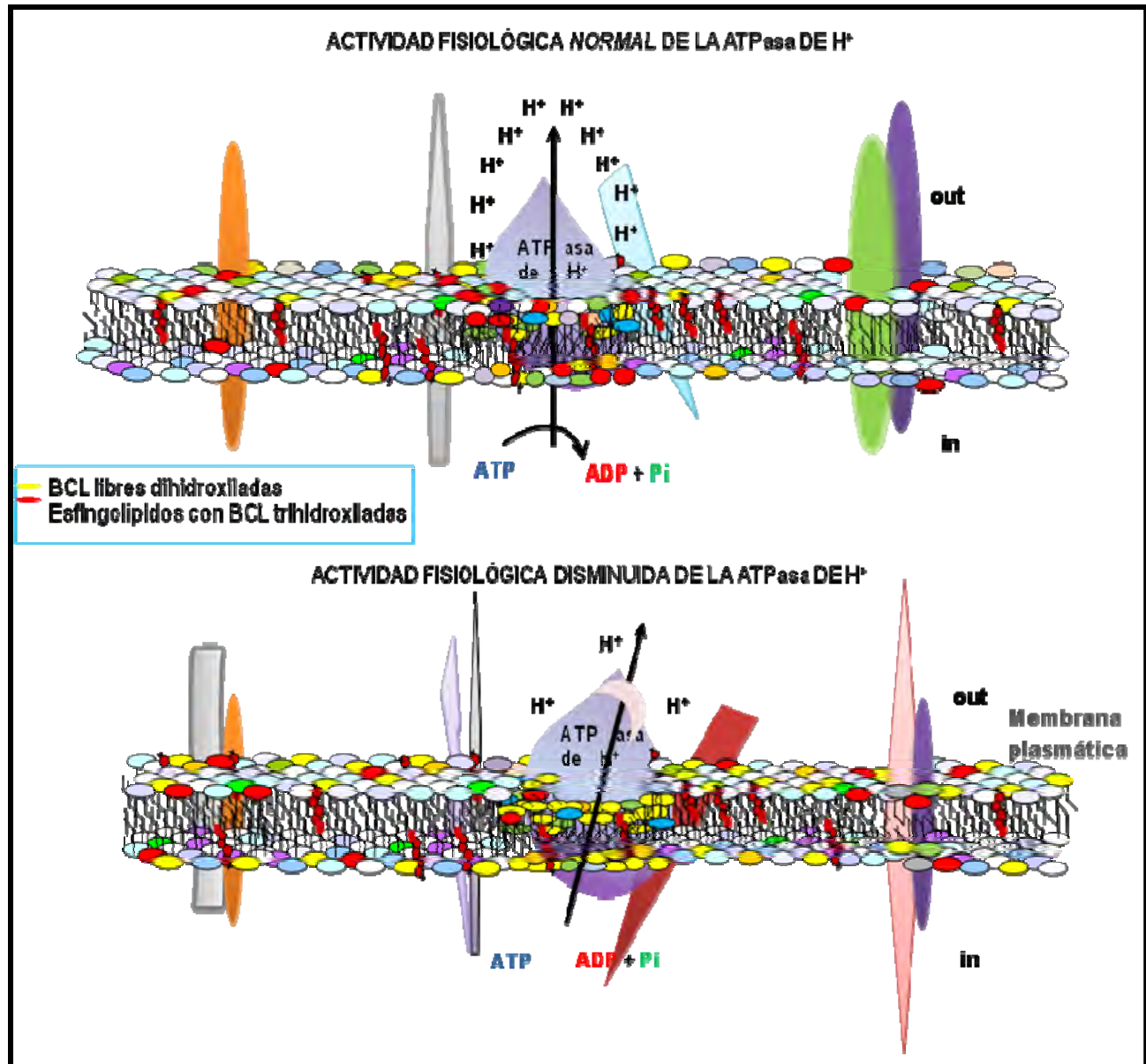


Figura 32. Modelo de la actividad biológica de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática en el control ecotipo Col-0 (arriba) y la línea mutante *Atsbh1-1* (abajo). Se representa la disminución en la actividad de la enzima por una modulación directa o indirecta por esfingolípidos trihidroxilados o BCL libres o BCL dihidroxiladas.

Conclusión general

- La disminución de BCL trihidroxiladas en esfingolípidos complejos no afecta la estructura esencial de las membranas plasmáticas probablemente porque el desbalance de esfingolípidos tridroxilados es compensado por cambios en otros tipos de esfingolípidos o glicerolípidos. Sin embargo, el patrón de proteínas membranales sí se modifica, y afecta a por lo menos 4 proteínas de diferentes pesos moleculares.
- El efecto sobre la mutación en el gene de la hidroxilasa *Atsbh1-1* en vesículas de membrana plasmática también influye de manera directa en la actividad de la ATPasa de H⁺ presentando una disminución del 75% lo cuál sugiere que ésta podría encontrarse modulada directamente por BCL trihidroxiladas o por BCL dihidroxiladas libres y fosforiladas que podrían ser las responsables de crear un ambiente propicio para que la enzima sea activa.

Conclusiones particulares

- Se observaron diferencias fenotípicas adicionales a las reportadas en la mutante *Atsbh1-1* que incluyeron color, forma de las hojas y facilidad a la pérdida de turgencia
- La recuperación en todos los pasos previos y de VMP fue menor en la mutante que en la Col-0.
- La pureza de las fracciones tanto en la mutante como en la Col-0 fue muy alta de acuerdo al análisis de ultra estructura y las enzimas marcadoras.
- El patrón de las proteínas de la membrana plasmática en geles desnaturalizantes mostró que hay proteínas que cambian (aproximadamente 9 proteínas) en la mutante con respecto a la silvestre Col-0.
- La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de la línea mutante resultó ser 75% menor que en la línea silvestre.
- La cantidad de de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la mutante y en la silvestre fue la misma.

PERSPECTIVAS

- 1.- Conocer los contenidos de d-BCL y t-BCL totales y de BCL libres en la membrana plasmática
- 2.- Determinar la causa de la baja actividad de la ATPasa H⁺ en la membrana plasmática de *Atsbh1-1*.
- 3.- Conocer si las membranas plasmáticas de la línea *Atsbh1.1* tienen cambios en la fluidez
- 4.- Conocer si otras proteínas de las VMP de la línea *Atsbh1-1* muestran cambios en su actividad.
- 5.- Obtener y caracterizar DRM (membranas resistentes a la solubilización por detergente) en la línea *Atsbh1-1* para observar el efecto sobre su estructura. Así como determinar su perfil de lípidos.
- 6.- Conocer el número y la identidad de las proteínas presentes en preparaciones de VMP y/o DRMs purificados tanto de plantas de la línea *Atsbh1-1* y como la silvestre, mediante técnicas de geles de segunda dimensión (2D-DIGE)

BIBLIOGRAFÍA

1. Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. y Simons, K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3254-3259.
2. Belmonte F.M.y Millan. (2001). Estructura y función de las balsas lipídicas ("rafts"), dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol. *Revisión Inmunología* Madrid 20: 216-224.
<http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/5/4/546.pdf>
3. Borner, G. H.H., Lilley, K. S., Stevens, T. J. y Dupree, P. (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132:568-577.
4. Borner, G. H.H., Janine, S., Weimar, L., Michaelson L.V., Hawkins, N., mac-Askill, A., Napier, Jonathan, Beale, M., Lilley, K. S. y Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis* evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137:104-116.
5. Briskin, D.P., Leonard, R. T., and Hodges, T. K. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148:542-568.
6. Briskin, D.P. y Niesman-Reynolds, I. (1989) Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.* 90:394-397.
7. Briskin, D.P. y Poole, R.J. (1983) Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate. *Plant Physiol.* 71:507-512.

-
8. Carmona, S. L. (2003) Identificación de polipéptidos fosforilados diferencialmente en embriones de maíz expuestos a la Fumonisina B₁. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM.
 9. C. Reyes, M., Gómez, J., Villalaín, J., González-Ros, J. M. (2006) Protein -lipid interactions New Approaches and Emerging Concepts. Springer. Barcelona. pp 11-120, 127-137, 156, 157.
 10. Chen, M., Han, G., Dietrich, C. R., Dunn, T. M. Y Cahoon, E. B. (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 18:3576-3593.
 11. Chen, M., Markham, J., Dietrich, C. R., Jaworsky, J-G y Cahoon, E. B. (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for grow and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1-17.
 12. Chung, J-H., Lester, R-L y Dickson, R-C. (2003) Sphingolipid requeriment for generation of functional V₁ component of the vacuolar ATPase. *Biochem Vol* 278:2887228881
 13. Dietrich, C. R., Han, G., Chen, M., Berg, R. H., Dunn, T. M. y Cahoon, E. B. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* 54:284-298.
 14. Dunn, T. M., Lynch, D. V., Michaelson, L. V. y Napier, J. A. (2005) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot-London* 93:483-497.

15. Dunn, T. M., Lynch, D. V., (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New phytologist USA*161: 677–702.
16. Friedrichson, T. y Kurzchalia, T. V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394:802-804.
17. Gavilanes Ruiz, M, Saucedo García, Carmona Salazar, Gutiérrez Nájera, Vázquez Vázquez, Rodríguez Mejía, Martínez Loyola, Palacios Bahena, El Hafidi, González de la Vara, Enríquez Arredondo, Cruz García y Plascencia J. Funciones de los esfingolípidos en plantas en la membrana plasmática y más allá. (<http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Resumen-Invitados/MarinaGavilanes.pdf>)
18. Gavilanes Ruiz, M., Sanchez-Nieto, S., Enríquez-Arredondo, Ma. C. y García-Rubio, O. (1995) Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia* 46:251-262.
19. González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. y Gavilanes-Ruiz, M. (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal. Biochem.* 200:235-238.
20. Gutiérrez, N. N. (2005) Interacción de la Fumonisina B₁ con la membrana plasmática: efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado. Fac. de Química, UNAM.
21. Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R. A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J. y Gavilanes-Ruiz, M. (2005) Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221:589-596.
22. Horton R. Robert, *Bioquímica*. Prentice - Hall Hispanoamericana. México 1995. Parte 2, Capítulo 9.

-
23. Idkowiak-Baldys, J., Grilley, M. M. y Takemoto, J. Y. (2004) Sphingolipid C4 hydroxylation influences properties of yeast detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes. *FEBS Lett.* 569:272-276.
24. Laloi, M., Perret, A-M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M-N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J-M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M-A. y Moreau, P. (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol.* 143:461-472.
25. Lee, M. C. S., Hamamoto, S. y Schekman, R. (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277:22395-22401.
26. Lynch, D. V. y Steponkus, P. L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 83:761-767.
27. Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M-A., Michaelson, L. V., Carde, J-P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J. A., Cullimore, J., Bessoule, J-J. y Mongrand, S. (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.* 144:402-418.
28. Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B. Y Jaworski, J. G. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipids classes from leaves. *J. Biol. Chem.* 281:22684-22694.
29. Markham, J. E. y Jaworski, J. G. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21:1304-1314.

-
30. Mas, A., Navarro-Pedreño, J., Cooke, D.T., y James, C.S. (1994) Characterization and lipid composition of the plasma membrane in grape leaves. *Phytochemistry* Vol.35, No. 5, pp 1249-1253.
31. Merrill, Jr. A. H. and Sandfohoff, K.(2002) Sphingolipids Metabolism and Cell Signaling. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition. pp 373-407.
32. Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kamawura, Y. y Uemura, M. (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant cell physiology* 50(2):341-359.
33. Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J-P., Hartmann, M-A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. y Bessoule, J-J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* 279:36277-36286.
34. Mortz, E., Krogh, T. N., Vorum, H., Görg, A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*. 1:1359-1363.
35. Ng, C. K.-Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B. y Hetherington, A. M. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410:596-599.
36. Ng, C. K. Y. y Hetherington, A. M. (2001) Sphingolipid-mediated signaling in plants. *Ann. Bot-London* 88:957-965.
37. Packer, L. y Douce, R. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148:542-570.
38. Peskan, T., Westermann, M. y Oelmüller, R. (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267:6989-6995.

39. Peterson, G. L. (1977) .A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356.
40. Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, F., Carballo, A., Rodríguez-Sotres, R. y Gavilanes-Ruíz, M. (1997) Purification of plasma membrane from dry maize embryos. *Physiol. Plant.* 101:157-164.
41. Sperling, P. y Heinz, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1632:1-15.
42. Sterin, N.S., and Nieto F.L (2007) Los esfingolipidos en la muerte celular y su proliferación celular. *Revista Química viva.* 6 (3): 112-138.
43. Stryer, L. *Bioquímica* 5ª edición. Reverté. Barcelona. 2003. pp. 319-344.
44. Worrall, D., K-Y C, and M.Hetherington A. (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Plant cell.* Vol 8 No 7 317-320.
45. Wrigth, B., Snow, J., O'Brien, T. and Lynch, D. (2003) Synthesis of 4-hidroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Biochim-Biophys* 415:184-192.