

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO





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	Profesora: Estela Sánchez Quintanar
VOCAL	Profesora: Marina Gavilanes Ruiz
SECRETARIO	Profesor: Carlos Mauricio Castro Acuña
1er SUPLENTE	Profesor: Euclides Ávila Chávez
2do SUPLENTE	Profesor: Juvenal Flores De La Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 101, Edificio E. Facultad de Química

ASESOR DEL TEMA: Dra. Marina Gavilanes Ruíz

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUSTENTANTE: Karla Montserrat González Reyes

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Química, UNAM, y bajo la Supervisión Técnica de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

#### 

Karla Montserrat González Reyes recibió apoyo económico durante el desarrollo de esta tesis a través del Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación", del Departamento de Superación Académica, Facultad de Química y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, a través del proyecto PAPIIT IN211409.

#### 

Este trabajo de tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, al proyecto IN211409 y al de CONACYT, proyecto 101521.

Esta tesis fue escrita con las manos de una persona, pero mientras fue escrita resaltaron muchos nombres y muchas caras diferentes; quiero agradecer a todas las personas que estuvieron involucradas en la elaboración de este trabajo pero sobre todo quiero agradecer quienes compartieron conmigo un poco de su vida es a ustedes a quien les debo lo que ahora soy.

Primero, mi razón de vivir; Victoria; gracias por ser el gran motor que impulsa todas mis decisiones, pero sobre todo gracias por enseñarme una nueva lección día a día, y por demostrarme que el camino no es tan difícil si se va paso a paso. Con especial cariño agradezco a mi padre, Víctor González, sin tu ejemplo de constancia y esfuerzo fácilmente hubiera dejado este compromiso en los tiempos difíciles.

A Irma Reyes y Guadalupe Sánchez, sus enseñanzas personales son las más valiosas de mi vida, jamás hubiera terminado este sueño si ustedes no hubieran estado ahí para impulsarme.

A mis hermanos Sandra y Octavio, gracias por su incuestionable ejemplo a seguir, al inicio de cada etapa ustedes estaban ahí para enseñarme el camino, y hoy en día siguen siendo una gran ejemplo para mí y por otra parte a mi prima Stephanie Torres otra persona a la que quiero agradecer su compañía a lo largo de mi vida.

A mi madrina Eugenia Ramírez, gracias por tu honestidad y por las palabras que lograron hacer que retomara el camino cuando más lo necesitaba.

Gracias a mi familia por su apoyo incondicional en todos los sentidos, soy muy afortunada por tenerlos conmigo.

Por otra parte, gracias Jesús Cisneros por tu compañía y amor en este largo y difícil camino, por compartir sueños e ilusiones; no tengo palabras para nombrar todo lo que has hecho por mí, pero te aseguro que este triunfo también te pertenece.

Con gran amor a Mariana Toral y Oscar Cortés, mis amigos y mis hermanos gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas los quiero mucho en verdad.

A los grandes amigos de Ingeniería con los que compartí clases, fiestas y la porra del equipo: Oscar Sánchez, Ángel Barrios, Alberto Alias, Gerson Franco, Baruch Hernández, Brenda Bárcena, Ixtzul Rubalcava, Xóchitl Soto, Dulce Hernández, Ulises Jiménez, Ahiram Antonio, Hugo Martínez, Maribel Nazario, Víctor Bustillos, Pedro Castillo, Marco Figueroa, Eunice Valdés, Samuel Miguel, Marcos Guillermo, Luis Alarcón y Luis Suriano; sin ustedes la carrera hubiera sido muy aburrida.

Quiero agradecer a los demás compañeros que dejaron un poco de su personalidad en mí, ustedes también son importantes en mi desarrollo y por lo cual deseo hacerles éste reconocimiento: Mauricio Salgado, Nancy Ortiz, Xóchitl Espinoza, Alma Santamaría, Jimena Arroyo, Roberto Gallardo, Odín García, Francisco Rodríguez, David Hernández, Paloma Álvarez, Griselda Vélez, Paulina del Valle, Oscar Alonso, Roberto Arizmendi y Jorge Zamora.

También a todos mis compañeros del laboratorio 101 especialmente a Ma. Del Consuelo Enríquez por toda tu infinita paciencia y enseñanza, Christian Vázquez, Laura Carmona, Ariadna Solís, Guadalupe Lozano, Carolina Facio, Edgar Mejía y Doris Coronel por hacer que la parte final del proyecto fuera muy entretenida

Sinceramente muchas gracias a todos los profesores que me enseñaron la "verdadera" ingeniería: Dr. Fernando Barragán, Ing. M. en I. Alejandro Anaya, Roberto Enríquez, Dr. Martín Rivera, Ing. Fulvio Mendoza, José Sámano, Ing. Ramón Domínguez, Ing. León Coronado y por último Ing. Agustín Texta.

Por otra parte a los profesores que dejaron huella en mi manera de pensar además de los excelentes conocimientos que me impartieron: M. en C. Enrique Solís, Carlos Caldera, Román Tejeda, Dr. Felipe Cruz, Dra. Marina Gavilanes y sobre todo a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto; tu carrera es un ejemplo a seguir. Finalmente a la Dra. Estela Sánchez Quintanar, profesora Emérita y al Dr. Carlos Mauricio Castro Acuña; gracias por sus aportaciones a este trabajo, es para mí un honor tenerlos como miembros del jurado.

> A todos ustedes, GRACIAS por compartir conmigo un poco de su vida. Karla Montserrat González Reyes

"El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría."

> Isaac Asimov Bioquímico y escritor de ciencia ficción (1920-1992)

\_

## ÍNDICE

Ι.	Resumen				-				•	1	
II.	Introducción									2	
	La ATPasa de H $^{\scriptscriptstyle +}$ de la membrana plasmática de plantas										
	1. Localización	subcelular y					2				
	2. Funciones fi	siológicas.								2	
	A. En la elo	ngación celul	ar							3	
	B. En la nut	rición celular.								3	
	C. Apertura	y cierre de e					3				
	D. En la res	puesta al est	rés abiótico.							4	
	a.	Estrés salino	)							4	
	b.	Estrés hídric	0							4	
	C.	Estrés de ter	mperatura.							4	
	E. En la res	puesta al est	rés biótico.							5	
	3. Estructura.									6	
	4. Funcionamie	ento molecula	ar							9	
	A. Energética de la catálisis y el transporte de $H^+$										
	B. Caracter	ísticas de la i	reacción de	hidrólis	is de A	TP.				11	
	a.	Efecto del pl	H							11	
	b.	Cinética.								12	
	5. Regulación de la actividad.										
	A. Regulación por fosforilación.										
	B. Regulación por expresión diferencial de isoformas.									15	
	C. Regulación por oligomerización.									17	
	D. Regulaci	ión por lípidos	s membrana	les.						18	
III.	Antecedentes									20	
IV.	Hipótesis									23	
V.	Objetivos									23	
VI.	Materiales y Métodos.									24	
	1. Metodología	general.								24	
	2. Material biol	ógico.								24	
	3. Aislamiento	y purificación	de vesícula	is de m	embran	a plasi	mática (	de			
	Arabidopsis	thaliana.								25	

		A. Obtención de la fracción microsomal.	25
		B. Obtención de vesículas de membrana plasmática	25
	4.	Determinación de la actividad de la ATPasa.	25
	5.	Determinación de las condiciones óptimas para medir la cinética de reacción	
		de hidrólisis de ATP.	26
		A. Determinación del tiempo óptimo de reacción.	26
		B. Determinación de la hidrólisis de ATP en función de la cantidad de proteína	26
	6.	Determinación de la actividad de ATPasa en todas las líneas de Arabidopsis	
		en condiciones óptimas	26
	7.	Determinación de $K_m$ y $V_{max}$ .	26
	8.	Determinación de la I $_{50}$ para vanadato	26
	9.	Determinación del Pi liberado.	27
	10	. Extracción de la fracción de esfingolípidos de la membrana plasmática.	27
	11	. Procesamiento estadístico de los datos experimentales.	27
VII.	Re	sultados	28
	1.	Análisis de la actividad de hidrólisis de ATP en la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a	
		bajo inducción del silenciamiento génico y de una línea control.	28
	2.	Establecimiento de las condiciones óptimas para medir la cinética de la reacció	n
		de hidrólisis de ATP.	29
	3.	Reproducción de los resultados de medición de actividad de hidrólisis de ATP	
		en las condiciones óptimas para hacer estudios cinéticos.	31
	4.	Determinación de cinética de hidrólisis de ATP en diferentes líneas de	
	5.	Arabidopsis thaliana.	33
	6.	Análisis estadístico de los gráficos de hidrólisis de ATP contra concentración	
		de sustrato y obtención de los parámetros cinéticos para diferentes líneas	
		de Arabidopsis thaliana	35
	7.	Determinación de la $I_{50}$ para VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	40
	8.	Reconstitución membranal de la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a a 7 días post	
		inducción con esfingolípidos exógenos.	45
VIII.	Dis	scusión	48
	1.	Determinación de la actividad de ATPasa de vesículas de membrana plasmática	à
		de líneas de Arabidopsis thaliana con diferente cantidad de esfingolípidos	50
	2.	Determinación de la cinética de reacción de hidrólisis de ATP.	51
	3.	Reconstitución de las vesículas membranales con esfingolípidos exógenos.	55

	4. Modelo.							57
IX.	Resumen de r	esultad	los.					58
Х.	Conclusiones.							59
XI.	Perspectivas.							60
XII.	Bibliografía.							61
XIII.	Apéndice.							72

#### I. RESUMEN

La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de las células vegetales ha sido llamada una nanomáquina o nanomotor que cataliza dos reacciones simultáneas y que son esenciales para las células vegetales. Estas dos reacciones están acopladas energéticamente entre sí, ya que una, la hidrólisis de ATP, tiene un  $\Delta G^{\circ}$  negativo, de -7.4 kcal/mol, mientras que la otra reacción, el transporte de H<sup>+</sup>, es una reacción endergónica. Este transporte se realiza desde un compartimento (el citosol) en donde la concentración es de 0.01 mM de H<sup>+</sup>, hasta otra (el espacio apoplástico), en donde la concentración es de 0.1 mM de H<sup>+</sup>. La actividad de bombeo de H<sup>+</sup>, cuyo costo energético se realiza a expensas de la reacción de hidrólisis de ATP, es fundamental para sostener tanto actividades esenciales de mantenimiento de la célula como acciones de emergencia ante diferentes formas de estrés. Por ello, esta enzima constituye la bomba primaria más importante de las plantas.

En el laboratorio hemos encontrado que la ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas de Arabidopsis mutantes (Atlcb2b hp/Atlcb2a con un silenciamiento génico inducido) que no expresan a la primera enzima de la vía de síntesis de esfingolípidos (y en las que la síntesis de estos compuestos se ve disminuida), tienen una actividad 40% mayor que las plantas control. En este trabajo de tesis, se caracteriza la parte cinética de la catálisis mediada por la ATPasa de H<sup>+</sup> en su modalidad de hidrólisis de ATP, determinando: condiciones de catálisis, concentraciones óptimas de sustrato y de enzima, tiempos de reacción, patrones de velocidad inicial y cinética de saturación, Constante de Michaelis ( $K_m$ ), determinación de velocidad máxima ( $V_{max}$ ), así como el valor de I<sub>50</sub> para el VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. La cinética de hidrólisis de ATP determinada en las diferentes líneas en ausencia y presencia del inductor permitió determinar valores de K<sub>m</sub> en un intervalo de 1.07 a 2.06 mM de ATP para todas las líneas y condiciones estudiadas. Con respecto a los valores de V<sub>max</sub>, la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a con el silenciamiento génico inducido mostró un aumento del alrededor del 40% sobre las líneas controles; comportamiento que también se observó en la eficiencia catalítica. Con respecto a la inhibición por VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> no se encontraron diferencias en los valores de I<sub>50</sub>. Experimentos de reconstitución con una fracción de esfingolípidos extraídos de membranas plasmáticas purificadas y con glucosilceramida pura, mostraron que la actividad de la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a inducida disminuyó hasta recuperar los valores de la actividad de las líneas controles. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los esfingolípidos tienen un papel muy importante en la expresión de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática influyendo en la velocidad de catálisis de la reacción de hidrólisis de ATP.

#### II. INTRODUCCIÓN

La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas

1. Localización subcelular y abundancia

La membrana plasmática de células vegetales es una estructura que funciona como barrera permeable entre la célula y su exterior; está formada por diferentes tipos de lípidos: glicerolípidos, esfingolípidos, esteroles y algunos terpenos. Estas clases de lípidos se encuentran formando la matriz membranal en forma de bicapa. En particular, los esfingolípidos, son importantes no sólo porque forman parte estructural de la membrana, sino porque tienen capacidad de servir como ancla para proteínas membranales de carácter hidrofílico, además de que se encuentran formando las "balsas lipídicas" o microdominios membranales que son microdominios ricos en esteroles y esfingolípidos. Son en estas balsas en las que podemos encontrar diferentes tipos de proteínas.

La ATPasa de H<sup>+</sup> es una proteína que se encuentra sólo en la membrana plasmática, por lo que se le considera un marcador de esta membrana; pero puede encontrarse también en compartimentos vesiculares sólo de manera temporal, mientras se transporta desde su sitio de síntesis en el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática que es su destino final. Dentro de esta membrana, se ha reportado que la ATPasa de H<sup>+</sup> puede encontrarse tanto en las regiones desordenadas de la membrana como en las ordenadas, que son las regiones de balsas lipídicas (Mongrand *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2009). La ATPasa de H<sup>+</sup> es una proteína transmembranal que es de las proteínas más importantes de

la membrana plasmática en las plantas, por lo que es muy abundante y se sintetiza de manera constitutiva para satisfacer los requerimientos de la célula, ya que está involucrada en muchos aspectos de la fisiología de las plantas (Michelet y Boutry, 1995).

2. Funciones fisiológicas

Las plantas han evolucionado bajo la presión que significa tener una forma de vida fija al sustrato, lo que ha implicado el desarrollo de mecanismos para enfrentarse a cambios en el medio ambiente, como la luz, la humedad, la presencia de patógenos y la disponibilidad de minerales en el suelo. Debido a que la ATPasa de H<sup>+</sup> es la responsable de establecer el gradiente electroquímico que promueve el transporte secundario de múltiples solutos a través de la membrana, esta enzima ha sido clasificada como una enzima clave en la regulación de eventos celulares (Sussman y Surowy, 1987). A continuación se enlistan aquellos aspectos celulares en los que esta enzima participa de una manera activa:

#### A. En la elongación celular.

Las células de las plantas están rodeadas por una pared celular, que es una estructura resistente pero flexible, hecha de polímeros, en general de carbohidratos, que permite el desarrollo o la expansión de la célula así como el cambio de su forma. Los polímeros que entretejen esta pared celular forman un entramado de varias mallas: una, de microfibrillas de celulosa entrecruzadas por una matriz de polisacáridos; otra de pectinas unidas por puentes de calcio y una tercera de proteínas entrecruzadas entre sí y con otros componentes de la pared (Cosgrove, 1993). Cuando una célula crece, la pared celular tiene que aflojarse, relajando las mallas que la componen para que la célula que encierra pueda aumentar su tamaño. En tejidos de gran crecimiento como el coleoptilo y el tallo, las auxinas son responsables de iniciar este proceso induciendo la excreción de H<sup>+</sup> desde el citoplasma hacia la pared celular. Evidencias experimentales que incluyen la medición del efecto de auxinas y sus análogos en la actividad acificadora de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, y el efecto de inhibidores de la enzima en el crecimiento de preparaciones de coleoptilos abrasados, indican que es esta enzima la que promueve la acidificación de la pared celular; de modo que las auxinas inducen la acidificación a través de la síntesis e incorporación masivas de la ATPasa a la membrana plasmática, con lo cual se refuerza su participación en este proceso celular (Senn y Goldsmith, 1998; Frías et al., 1996).

#### B. En la nutrición celular.

Todos los nutrientes que se encuentran en el suelo necesitan tener contacto con la raíz para poder entrar a la planta, las sustancias nutritivas son transferidas de la superficie de las raíces hacia el sistema de transporte para el agua, el xilema, por diferentes conductos. De una o de otra forma, los nutrimentos deben pasar por lo menos una membrana plasmática en su camino hacia el xilema; el transporte membranal es así un instrumento decisivo para la respuesta selectiva de sustancias nutritivas y rechazo de iones tóxicos del ambiente. Se ha descubierto por métodos inmunológicos que el transporte selectivo de sustancias nutritivas está correlacionado con la presencia de altas cantidades de ATPasa de H<sup>+</sup> en la membrana plasmática. Además, el 60% de la superficie de las raíces está constituida por pelos absorbentes y ha sido posible detectar altas concentraciones de H<sup>+</sup> alrededor de éstos, generadas por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (Sondergaard *et al.*, 2004).

#### C. Apertura y cierre de estomas.

Las dos células guardia que forman el estoma, experimentan cambios en la forma y el volumen, para cerrar o formar el poro por el que se realiza el intercambio gaseoso entre la epidermis de la planta y el medio ambiente. La apertura del poro se inicia con una señal ambiental, como por

~ 3 ~

ejemplo el nivel de CO<sub>2</sub>, la humedad, algunas fitohormonas o la luz; estas dos últimas aumentan la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática que abunda en las células guardia. La activación de la ATPasa aumenta el transporte de H<sup>+</sup> hacia el exterior de la célula que a su vez hiperpolariza la membrana plasmática, favoreciendo así la entrada de K<sup>+</sup> por canales específicos. La acumulación interna de osmolitos, como el K<sup>+</sup> y el malato, arrastra una gran cantidad de agua para equilibrar las concentraciones internas y externas de solutos, provocando que las células se hinchen y generen cambios en la curvatura de la pared celular. Esto, finalmente, lleva a la apertura del poro estomático (Gavilanes-Ruíz *et al.*, 1995).

- D. En la respuesta al estrés abiótico
  - a. Estrés salino.

Se ha propuesto que la ATPasa de H<sup>+</sup> juega un papel muy importante en la tolerancia al estrés salino, ya que las células vegetales tienen la capacidad de expulsar Na<sup>+</sup> mediante un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cuya fuerza impulsora estaría generada por el gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> creado por la enzima. (Duby y Boutry, 2009). Lo anterior se refuerza porque altas concentraciones de sal en el medio inducen la síntesis del RNAm de la ATPasa en raíces de plantas tanto halotolerantes como glicofitas (Niu *et al.*, 1993).

#### b. Estrés hídrico

En diversas células especializadas es de gran importancia controlar el flujo de agua más que de la toma de nutrientes; estas células se encogen y se hinchan dependiendo del agua que contienen. Para controlar la entrada y salida del agua, las células activan el transporte de iones, cuando la concentración de sales al interior de la célula es alto, el fluido podrá entrar mediante los canales de agua (Sondergaard *et al.*, 2004). Cuando existe un estrés osmótico o hídrico, las células responden activando a la ATPasa de H<sup>+</sup> lo cual desemboca en una regulación osmótica debido al transporte de iones a través de la membrana.

c. Estrés de temperatura

Cuando las plantas herbáceas se someten a un estrés de baja temperatura se ha observado una fuga de solutos intracelulares que acompañan a un reblandecimiento acuoso del tejido, mismo que desaparece durante su recuperación. La membrana celular interviene fundamentalmente en ambos procesos, pues cuando se daña, se favorece la salida de iones y la pérdida de la capacidad de captación de solutos que mantienen el turgor celular. La actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> se pierde desde el inicio del congelamiento y se recupera a medida que se descongela el tejido. Se ha propuesto que la recuperación de la estructura de la bicapa lipídica y de la ATPasa de H<sup>+</sup> promueve la re-entrada de solutos presentes en el espacio apoplástico, regenerando así la funcionalidad y estructura del tejido (Palta, 1989; Arora y Palta, 1991).

E. En la respuesta al estrés biótico.

Varias toxinas de bacterias u hongos que atacan a las plantas tienen la capacidad de modificar la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Algunas de las toxinas reportadas son la fusicoccina, la siringomicina, los péptidos NIP1 y NIP3 de *Rynchosorium secalis*, la toxina de *Cercospora beticola (*CBT) y la fumonisina B1; las dos últimas inhiben la actividad de la ATPasa (Blein *et al.*, 1988; Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005) y las demás la estimulan (Marré *et al.*, 1974; Susuky *et al.*, 1992; Wevelsiep *et al.*, 1993).

Una disfunción de la ATPasa, ya sea inhibitoria o activadora, lleva en general al desquiciamiento del tráfico de solutos en la membrana y a la modificación de su potencial eléctrico, lo cual tiene repercusiones fisiológicas negativas para la planta.

En el caso de la fusicoccina, ésta produce un aumento en la apertura de los estomas, lo cual conlleva al marchitamiento de las hojas y finalmente a la muerte de la planta (Colombo *et al.*,1981). Además la excesiva estimulación de la enzima por la toxina contribuye al agotamiento del ATP intracelular y con ello a afectar de manera importante el metabolismo.

La siringomicina es un factor de virulencia producido por la bacteria *Pseudomonas syringae* que induce al cierre de estomas en hojas de *Vicia faba* (Zhang y Takemoto, 1987; Susuki *et al.,* 1992).

Los péptidos fitotóxicos NIP1 y NIP3 aumentan la transpiración de las hojas de cebada, la permeabilidad de las células epidérmicas y la acumulación de solutos en la raíz (Ayres y Jones, 1975; Wevelsiep *et al.*, 1993)

La toxina del hongo *Cercospora beticola* que inhibe la elongación de las células de la raíz y el transporte de H<sup>+</sup>, resulta ser un inhibidor competitivo de la ATPasa (Macri *et al.*, 1980; Blein *et al.*, 1988).



Figura 1. Distribución de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la planta. Reportes de inmunodetección y estudios genéticos reportan que hay tejidos y ciertos tipos de células en los que se expresa la ATPasa de H<sup>+</sup>. Las funciones fisiológicas impulsadas por la ATPasa de H<sup>+</sup> mencionadas en el texto, pueden relacionarse con la distribución indicada en la figura (modificada de Michelet y Boutry, 1995).

## 3. Estructura

La ATPasa de H<sup>+</sup> pertenece a la familia de ATPasas transductoras de energía del tipo P (Pedersen y Carafoli, 1987), al igual que la ATPasa de Ca<sup>2+</sup>, ya que al obtener la energía del

ATP forman un intermediario fosforilado covalentemente en un residuo de ácido aspártico (Briskin y Poole, 1983; Vara y Serrano, 1983).

A partir del perfil hidropático, la ATPasa de H<sup>+</sup> tiene las siguientes características estructurales (Figura 2):

Consta de dos grandes dominios hidrofóbicos y diez  $\alpha$ -hélices transmembranales (M1 a M10), cada una de éstas está formada por 15 a 30 aminoácidos.

Aproximadamente el 70% de la estructura de la proteína es hidrofílica y está inmersa en el citosol.

El sitio activo en el que se lleva a cabo la hidrólisis de ATP está localizado en el asa hidrofílica más grande ubicada entre los dominios transmembranales M4 y M5.

Sólo el 5% de la estructura está expuesta a la superficie extracelular.

Las zonas del amino terminal y del carboxilo terminal están localizadas en el citoplasma.



Figura 2. Perfil hidropático de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. La parte superior corresponde al citosol (modificada de Kasamo, 2003).

Recientemente, la enzima se cristalizó y se pudo hacer el análisis de difracción de rayos X de la estructura de la proteína, misma que se presenta en la Figura 3. La imagen corresponde a la estructura activa de la isoforma AHA2 (<u>Arabidopsis H</u><sup>+</sup>-<u>A</u>TPase), una de las doce isoformas que presenta la ATPasa de H<sup>+</sup> en *Arabidopsis thaliana*. Como consecuencia de una estructura primaria muy conservada en todas las isoformas de la ATPasa de H<sup>+</sup>, se predice que todas ellas tienen la misma o muy parecida estructura terciaria (Palmgren y Christensen, 1994). En la

estructura cristalográfica pueden identificarse cuatro dominios perfectamente definidos de la estructura de la ATPasa de H<sup>+</sup> que son:

El dominio transmembranal de diez hélices, nombradas de M1 a M10, involucradas en la formación del canal transmembranal por donde los de H<sup>+</sup> son transportados del citosol al espacio apoplástico.

El dominio de fosforilación, en el que se encuentra el aminoácido que se fosforila covalentemente durante la catálisis.

El dominio N con el sitio de reconocimiento del nucleótido; en este caso se usó AMPPCP, que es un análogo no hidrolizable del ATP.

El sitio que estimula la desfosforilación de la enzima y designado con la letra A.

Las ATPasas de tipo P pueden presentarse en formas oligoméricas. En el caso de la ATPasa de H<sup>+</sup> se necesita un monómero para que ésta pueda ser funcional, a diferencia de la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> que requiere formar un heterodímero para ser funcional. Aunque la ATPasa de H<sup>+</sup> puede funcionar con un sólo monómero, está reportado que esta enzima puede formar desde dímeros hasta hexámeros (Duby y Boutry, 2009).



Figura 3. Estructura cristalográfica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. La estructura presenta la forma activa de la bomba de protones (sin el carboxilo terminal auto-inhibitorio), formando complejo con Mg-AMPPCP. Las 10  $\alpha$ -hélices indicadas en los colores naranja, verde y café; dominio de unión al nucleótido (N) en rojo, el dominio de fosforilación (P) azul, y el sitio actuador (A) en amarillo. El Mg-AMPPCP se encuentra en la interfase de los dominios N y P, representado en forma de esferas y cilindros. El rectángulo gris muestra la posible localización de la membrana plasmática (modificada de Pedersen *et al.*, 2007).

- 4. Funcionamiento molecular
  - A. Energética de la catálisis y el transporte de H<sup>+</sup>.

La ATPasa transporta H<sup>+</sup> desde el compartimento del citosol, el cual está a un pH de alrededor de 7.0 hasta el exterior de la célula o espacio apoplástico, el cual se encuentra a pH entre 5 y 6.

Los anteriores valores de pH implican que la concentración de H<sup>+</sup> libres en el interior de la célula es de alrededor de  $1 \times 10^{-7}$  M y afuera de  $1 \times 10^{-5}$  M. Es evidente entonces que la ATPasa transporta a los H<sup>+</sup> de un compartimiento a otro en contra de su gradiente de concentración y que este transporte necesita energía para poder llevarse a cabo. De ahí que la energía la tome de la reacción de hidrólisis de ATP que ella misma cataliza y que se realiza en el sitio activo que está localizado en la región hidrofílica de la cadena polipeptídica localizada en el citosol. Esta reacción es muy exergónica, liberando entre 60 y 65 kJ/mol dependiendo de la concentración de ATP que hay en la célula (Nelson y Cox, 2006).

La ATPasa funciona como bomba primaria, pues al bombear H<sup>+</sup> al exterior de la célula, genera un gradiente de concentración de H<sup>+</sup> ( $\Delta \mu_{H+}$ ) a ambos lados de la membrana plasmática. Este  $\Delta \mu_{H_{+}}$  tiene dos componentes: la diferencia en potencial eléctrico transmembranal ( $\Delta \Psi$ ) y la diferencia de pH a ambos lados de la membrana (ΔpH), ambos constituyen la fuerza impulsora energética necesaria para llevar a cabo diferentes transportes a través de la membrana plasmática, de ahí que por esto se le llame bomba primaria, pues facilita energéticamente el transporte de solutos (iones, aminoácidos, azúcares, etc.) a través de acarreadores y canales, ya que la apertura de éstos últimos es sensible al potencial electroquímico de H<sup>+</sup> creado por dicha enzima. Estos transportadores se llaman por eso, transportadores secundarios. Por ejemplo, para llevar a cabo el transporte de Na<sup>+</sup>, la célula cuenta con un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. El K<sup>+</sup> puede moverse a través de la membrana de dos diferentes maneras. La primera es por un canal de baja afinidad por el catión, el cual entra en funcionamiento a altas concentraciones exteriores de K<sup>+</sup>, el segundo es un transporte de alta afinidad de tipo simporte 1H<sup>+</sup>/1K<sup>+</sup>. En el caso de los aniones, el transporte de éstos no se ve favorecido por el potencial de la membrana. Para éstos casos se tienen dos sistemas de transporte con diferentes afinidades por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uno de ellos de baja afinidad que sólo trabaja a altas cantidades de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el segundo un simportador de alta afinidad 2H<sup>+</sup>/1NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Las actividades de hidrólisis del ATP y de bombeo de H<sup>+</sup> de la enzima se han caracterizado en varios tipos de preparaciones; vesículas crudas o purificadas, enzima solubilizada en detergente o reconstituida en proteoliposomas. Cuando el sistema biológico lo ha permitido, la actividad acidificadora de la enzima se ha caracterizado en cultivos de células en suspensión, en protoplastos o en hojas completas como en los casos de algunas algas, hepáticas y plantas acuáticas (revisado en Gavilanes-Ruíz *et al.*, 1995).



Figura 4. Esquema que relaciona la función de la bomba primaria generadora del gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> ( $\Delta\mu$ H<sup>+</sup>) y su repercusión en el funcionamiento de los sistemas de transporte secundario de iones, aminoácidos y sacáridos (modificada de Gavilanes-Ruíz *et al.*, 1995).

- B. Características de la reacción de hidrólisis de ATP.
  - a. Efecto del pH.

La ATPasa de H<sup>+</sup> tiene un pH óptimo de 6.6 como se muestra en la Figura 5, así que cuando los protones comienzan a acumularse en el citoplasma se provoca una disminución del pH, la actividad de la ATPasa aumenta y empieza a expulsar H<sup>+</sup> de la célula. La alcalinización del citoplasma que resulta de un incremento en la actividad de la ATPasa puede desencadenar eventos importantes en cuanto a respuestas hormonales y transducción de señales. Aunque el metabolismo del nitrato, la anaerobiosis, los cambios de temperatura y las transiciones de luz a obscuridad son ejemplos de factores que perturban el pH en las plantas, la capacidad de transportar H<sup>+</sup> del citoplasma al espacio apoplástico ha llevado a postular a la ATPasa de H<sup>+</sup> como parte importante de un mecanismo de regulación del pH citoplásmico que se mantiene entre valores de 7 y 7.5 (Michelet y Boutry, 1995).



Figura 5. Actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática parcialmente purificada de la raíz del maíz, medida a diferentes pH en el medio de reacción y a 38 °C (modificada de Du Pont *et al.*, 1981).

#### b. Cinética

Se ha reportado que las reacciones de acidificación y de hidrólisis de ATP requieren de los lípidos membranales para llevarse a cabo y que ambas tienen una cinética michaeliana clásica (Serrano *et al.*, 1988). La estequiometria de las reacciones de transporte de  $H^+$  y de hidrólisis de ATP es de 1, es decir la enzima bombea un H<sup>+</sup> por cada molécula de ATP que hidroliza. Las constantes cinéticas varían en un intervalo muy amplio, como se observa en la Tabla 1 para los valores de  $K_m$  para ATP y para bombeo de H<sup>+</sup>. Lo anterior se debe a múltiples factores que afectan las mediciones experimentales tales como el tejido de origen, el tipo de preparación membranal, las condiciones de pH y temperatura y especialmente las concentraciones reales del complejo ATP-Mg en solución (Sánchez-Nieto et al., 1992). Lo anterior también se refleja en que si bien la mayoría del comportamiento cinético de ambas reacciones es michaeliano, también se ha reportado que la cinética puede presentar curvas de actividad con cooperatividad positiva o negativa (Gutiérrez-Nájera et al., 2005). Es probable que los detergentes y los lípidos que se utilizan en la solubilización y reconstitución de la ATPasa de H<sup>+</sup> puedan propiciar diferentes estados de oligomerización o estabilizar ciertos estados conformacionales que expresan cinéticas diversas, por lo cual resulta difícil determinar el comportamiento cinético de la enzima en su estado nativo (Ramos et al., 1994; Robert et al., 1995; Robert y Beaugé, 1997).

Tabla 1. Características de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (modificada de Gavilanes-Ruíz *et al.*, 1995).

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICA	REFERENCIA	
Reacción de hidrólisis de ATP	<i>K</i> <sub>m ATP</sub> = 0.15 – 2.44 mM	Du Pont y Leonard, 1980 Perlin y Spanswick, 1981 Palmgren y Christensen, 1984 De Michelis y Spanswick, 1986 Kawata y Yoshida, 1988 Ramos <i>et al.</i> , 1994 Briskin <i>et al.</i> , 1995 Baunsgaard <i>et al.</i> , 1996 Lanfermeijer <i>et al.</i> , 1998 Wu y Seliskar, 1998 Maudoux <i>et al.</i> , 2000 Morsomme y Boutry, 2000 Fuglsang <i>et al.</i> , 2007	
Reacción de Bombeo de H⁺	К <sub>т АТР</sub> = 0.054 - 1.0 mМ	St-Marty <i>et al.</i> ,1988 Giannini <i>et al.</i> , 1987	
Especificidad por el sustrato (complejo ATP- Mg)	ATP>GTP,UTP,ADP> AMPCo <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup> >Mn <sup>2+</sup> > Zn <sup>2+</sup> ,Ca <sup>2+</sup>	Briskin y Poole, 1984 Du Pont <i>et al.</i> , 1981	
Estimulantes de la actividad	K <sup>+</sup> Lisolecitina Octil glucósido Tritón x-100	Du Pont <i>et al.</i> , 1981 Briskin y Poole, 1983 Cocucci y Marré, 1984 Grouzis <i>et al.</i> , 1987	
Ortovanadato nhibidores de la actividad Dietilestilbestrol Diciclohexilcarbodiimida		O'Neill y Spanswick, 1984b Gibrat <i>et al.</i> , 1989 Serrano, 1990 Anthon y Spanswick, 1986	

El ciclo catalítico propuesto para la ATPasa de H<sup>+</sup> está basado en comparaciones realizadas con las ATPasas de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup>, en el que se describe la unión del protón y el ATP en el lado citoplásmico a la forma E1 de la enzima; la fosforilación del residuo Asp329 constituye al intermediario fosforilado altamente energético denominado E1~P, en el que las cargas negativas en exceso en este complejo son estabilizadas por el residuo básico Lys569 y el Mg<sup>2+</sup>. Subsecuentemente, una molécula de ADP es liberada junto con el Mg<sup>2+</sup>, entonces ocurre el cambio conformacional; llevando a la enzima de la conformación E1~P a E2~P; seguida de la liberación de un protón al exterior causado por una menor afinidad de este estado fosforilado por el protón. Finalmente, el Pi es liberado por hidrólisis del enlace Asp329~P y la enzima regresa al estado E1, como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Ciclo catalítico de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. Este ciclo de reacción originalmente fue propuesto para ATPasa de Ca<sup>2+</sup> y se extendió para la ATPasa de H<sup>+</sup> (modificada de Morsomme y Boutry, 2000).

#### 5. Regulación de la actividad

La actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> es regulada por una gran variedad de mecanismos, probablemente debido a los numerosos procesos fisiológicos en los que esta proteína está involucrada, ya que pequeños cambios en la actividad enzimática pueden afectar diversos aspectos del funcionamiento de la planta.

## A. Regulación por fosforilación.

Usando anticuerpos específicos y péptidos sintéticos se obtuvo evidencia de que en la región del carboxilo terminal, a 100 residuos del extremo, se encuentra una región de auto-inhibición

~ 14 ~

(Palmgren, 1991). Varias líneas de investigación sugieren un mecanismo molecular de la participación del dominio de auto inhibición que conduce a la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales. El modelo incluye a la proteína 14-3-3, que es una proteína reguladora que se une a una proteína blanco, encontrada en todas las células eucariontes. Se ha mostrado que esta proteína interactúa directamente con una región conservada en el carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> (Jahn *et al.*, 1997). La fosforilación de una Treonina por una cinasa de la membrana resulta en la formación del sitio de unión de la proteína 14-3-3, cuya unión aumenta la actividad de la enzima (Kasamo, 2003). La proteína 14-3-3 parece disociarse de la ATPasa de H<sup>+</sup> tras la desfosforilación en esa región del carboxilo terminal.

#### B. Regulación por expresión diferencial de isoformas.

La regulación transcripcional de los genes de la ATPasa de H<sup>+</sup> se asocia a la necesidad de una distribución específica de la enzima en los órganos y tejidos de la planta, aunque también depende del ambiente y de factores en el desarrollo; lo cual afecta la expresión de ciertas isoenzimas. De hecho, muchos genes de estas enzimas producen RNAm muy inusuales, cuya secuencia es muy larga y, a menudo contienen un marco de lectura de varios codones de longitud (Perez *et al.*, 1992).

La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales tiene muchas isoformas como la mayoría de las enzimas. Desde la secuenciación del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* en el año 2000, se ha caracterizado el transcriptoma de una serie de genes; encontrándose dentro del genoma de *Arabidopsis* la codificación de una familia de isoformas de la enzima ATPasa de H<sup>+</sup> que han sido denominadas como AHA1-AHA12 (Palmgren, 2001). Dos de estas isoformas, AHA1 y AHA2 se expresan en todos los tejidos y órganos, por lo tanto estas isoformas parecen funcionar para el mantenimiento continuo de la homeostasis celular de iones. De estas dos isoformas, se ha encontrado más el transcrito de AHA1 en plántulas, y AHA2 predomina en raíces y especialmente en los pelos radiculares (Gaxiola *et al.*, 2007), además se ha reportado que la mutación en los genes que codifican para las isoformas más abundantes de *Arabidopsis*, AHA1 y AHA2 es letal para la planta (Haruta *et al.*, 2010).

Los análisis realizados por RT-PCR en tiempo real y espectrometría de masas han confirmado que el mayor número de transcritos en hojas corresponde a las isoformas AHA1, AHA2, AHA3, AHA4 y AHA11 (Alexandersson *et al.*, 2004; Alsterfjord *et al.*, 2004; Nüse *et al.*, 2003; Nüse *et al.*, 2004; Sazuka *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2004). Los análisis de la región no codificante de

los genes indican que el promotor de AHA3 está activo en la membrana de células de las hojas (De-Witt *et al.*, 1991).

Las isoformas AHA3, AHA4 y AHA11 muestran una amplia expresión en toda planta pero no en el mismo grado. AHA4 por ejemplo, tiene un alto grado de expresión en la endodermis de la raíz (Vitart *et al.*, 2001).

El análisis de los patrones de expresión de AHA5 indican una baja expresión en la planta, AHA6 y AHA9 se expresan predominantemente en anteras (Houlne y Boutry, 1994), AHA7 y AHA8 se expresan casi exclusivamente en polen y AHA10 tiene altos niveles de expresión en silicuas y en el endotelio de la capa de la semilla en desarrollo (Baxter *et al.*, 2005). Los datos anteriores sugieren que estas bombas tienen funciones más especializadas en la planta.

Se han realizado estudios para observar cuantitativamente las diferencias de actividad enzimática entre las isoformas AHA1, AHA2 y AHA3, que son las más abundantes en las hojas de *A. thaliana*; para ello, los genes fueron sobre-expresados en levaduras, con la finalidad de tener a las tres isoformas de manera independiente en forma muy abundante. Además, las isoenzimas fueron expresadas en esta especie heteróloga para minimizar factores de la regulación endógena de la actividad, como lo son la oligomerización, y las modificaciones transcripcionales y traduccionales que están presentes en las células vegetales. Los resultados de ese estudio muestran que AHA1 y AHA2 tienen afinidades similares para ATP y para vanadato entre sí; mientras que AHA3 muestra afinidades más bajas por ATP y vanadato como se muestra en las Figuras 7 y 8.



Figura 7. Cinética de saturación de la reacción de hidrólisis de ATP de las isoformas de *Arabidopsis thaliana* AHA1, AHA2 y AHA3 de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de *Arabidopsis* y sobreexpresadas en levadura. **A** Gráfica de actividad de la enzima contra concentración de ATP. **B** Gráfica de dobles recíprocos de los datos graficados en A. En la parte inferior de la figura se

muestran las constantes cinéticas de las tres isoformas calculadas a partir de los datos de las gráficas (tomado de Palmgren y Christensen, 1994).



Figura 8. Inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP por vanadato en las isoformas de *Arabidopsis thaliana* AHA1, AHA2 y AHA3 de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de *Arabidopsis* y sobreexpresadas en levadura (tomado de Palmgren y Christensen, 1994).

## C. Regulación por oligomerización.

Se han utilizado diferentes metodologías para determinar el arreglo oligomérico que la ATPasa de H<sup>+</sup> puede presentar; en uno de ellos se utilizaron rayos  $\gamma$  de alta energía para determinar el peso molecular de la ATPasa de H<sup>+</sup>; en el caso de raíces de betabel se obtuvo un valor de 225 kDa; al ser la ATPasa de H<sup>+</sup> una proteína con un peso molecular de 100 kDa, según su secuencia de aminoácidos, el resultado sugirió que la proteína se encontraba en forma de dímero. Por otra parte, se usaron agentes entrecruzadores de la enzima y se determinó un peso molecular de 336 kDa, lo que sugiere un arreglo trimérico de la enzima (Briskin *et al.*, 1985; Briskin y Niesman-Reynolds 1989). Los diferentes estados de asociación pueden relacionarse con diferentes niveles de actividad de la enzima. En otros trabajos se ha determinado que la ATPasa de H<sup>+</sup> presenta un arreglo de hexámero cuando se fosforila (Kanczewska *et al.*, 2005). En levaduras, se ha determinado que la biosíntesis de ceramida es necesaria para formar complejos oligoméricos de la ATPasa, cuando es sintetizada en el retículo endoplásmico (Lee *et al.*, 2002).

D. Regulación por lípidos membranales.

Como se mencionó anteriormente, la ATPasa de H<sup>+</sup> es una proteína transmembranal; por lo cual requiere un ambiente anfipático; este tipo de proteínas tienen un óptimo desempeño cuando están inmersas en su ambiente lipídico nativo (Gouaux y White, 2001). Se puede proponer que la ATPasa de H<sup>+</sup> está rodeada de glicerolípidos, esfingolípidos y esteroles debido a que se ubica en las balsas lipídicas. La estructura de estos lípidos puede jugar un papel importante en la conformación de la enzima y por tanto en la modulación de su actividad. En el caso de los esteroles, se sabe que éstos son necesarios para el crecimiento de muchos tipos de células (Bloch, 1983; Yeagle, 1985); en las plantas, los esteroles de mayor cantidad en la membrana plasmática corresponden al campesterol, stigmasterol y sitosterol (Larsson et al., 1990). La composición de esteroles de la membrana plasmática tiene influencia en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> (Grandmougin et al., 1989a; Grandmougin et al., 1989b; Sandstrom y Cleland; 1989a), sin embargo debido al complejo metabolismo de esteroles membranales (Hartmann y Benveniste, 1987), la regulación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por esteroles no parece ser parte de una respuesta rápida comparada con los demás moduladores de la enzima. Se han hecho varias pruebas para determinar los requerimientos lipídicos de la enzima (Coccuci y Marrè, 1984; Brauer y Tu, 1989), varios de los cuales incluyen deslipidación selectiva de la enzima (Sandstrom y Cleland, 1989b) para modificar su ambiente lipídico original, realizando una purificación de la enzima primero y reconstituyéndola nuevamente de manera selectiva con componentes lipídicos y ver su efecto en la actividad (Brauer y Tu, 1989). Otra estrategia es modificar el ambiente anfipático sometiendo a la enzima a la solubilización con varios detergentes que restauren su actividad (Briskin y Poole, 1983; Briskin y Niesman-Reynolds, 1989), o que incluso modifiquen el comportamiento cinético de la misma (Ramos et al., 1994); en la mayoría de los casos se ha encontrado que los fosfolípidos restauran parcialmente la actividad en la enzima.

La regulación de una enzima por los lípidos membranales que la rodean, se ha explicado por dos mecanismos:

Cambios en la composición de los lípidos alteran la fluidez de la membrana, lo que provoca un cambio en la conformación de la proteína, y por lo tanto en su actividad.

La "hipótesis del anillo" o de los lípidos anulares que se basa en una unión directa entre la proteína y los lípidos de la membrana y en la que esos lípidos anulares permiten una movilidad especial a la proteína, afectando así la catálisis (Simmonds *et al.*, 1982).

Los cambios en la actividad de la enzima pueden atribuirse a cambios en la fluidez de la membrana. Ésta también depende de las proteínas que se encuentran en ella (Brasitus, 1983).

La fluidez es un concepto dinámico relacionado con el orden estructural de las membranas y depende de la relación molecular esterol: lípidos complejos presentes en la membrana, de la composición de los lípidos y de la temperatura. Se ha observado que altas presiones provocan una disminución en la fluidez y estimulan la actividad de la ATPasa, sin embargo, el colesterol añadido también disminuye la fluidez pero en este caso disminuye la actividad de la ATPasa (Yeagle, 1983). Los grupos acilo de cadena larga en los lípidos incrementan la actividad de la ATPasa (Johannsson *et al.*, 1981) pero afectan también la fluidez de la membrana; haciendo que ésta disminuya (Harwood, 1989; Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005). De estos resultados se desprende que aparentemente no es la fluidez membranal la que afecta a la enzima, sino las características estructurales de los lípidos membranales.

La "hipótesis del anillo" (Simmonds *et al.*, 1982), por otro lado, ofrece una explicación más racional, pero compleja, sobre el efecto de los lípidos y de las interacciones lipídicas sobre la actividad de la ATPasa. Se dice que los fosfolípidos se unen con mayor afinidad a la enzima, mientras que los esteroles lo hacen débilmente ("sitios anulares"); mientras que ocurre lo contrario en los "sitios no anulares". Las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de los sitios anulares pueden reaccionar con los sitios no anulares, pero sólo si son de la longitud precisa. La actividad de la ATPasa es determinada por esas interacciones que modifican el empaquetamiento de los lípidos alrededor de la enzima.

Otros estudios han demostrado que la  $V_{max}$  de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de las raíces de avena no sólo aumenta con la adición de lisofosfatidilcolina sino también con ácidos grasos libres, y con el tratamiento con fosfolipasa A<sub>2</sub> (Palmgren *et al.,* 1988). Los ácidos grasos libres estimulan la pérdida de lípidos alrededor de las ATPasas tanto en sistemas animales como en plantas, pues tienen un efecto detergente. Todos estos son evidencias que apoyan la premisa de que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> es muy sensible a los lípidos que la rodean.

#### III. ANTECEDENTES

En embriones de maíz, se encontró que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática disminuye con la adición de Fumonisina B1, la cual inhibe a la ceramida sintasa provocando una acumulación de esfinganina (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005). En la Tabla 2 se encuentran los valores de la actividad de la ATPasa en diferentes condiciones, y se observa que la adición de Fumonisina B1 provoca un decaimiento de la actividad del 35% aproximadamente con respecto al control, mientras que la adición de Fumonisina B1 con ceramida restaura la actividad de la enzima a los niveles del control.

Tabla 2. Actividad de ATPasa de membrana plasmática extraída de embriones de maíz (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005)

Tratamiento	Actividad de ATPasa (nmolPih <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
Control	3422 ± 343
20 μM esfinganina	2984 ± 220
20 μM fitoesfingosina	3840 ± 676
20 μM FB1	2241 ± 210*
20 μM ceramida	3251 ± 285
20 μM ceramida +20 μM FB1	3319 ± 243

\*Significativamente diferente

Por otra parte se han realizado diferentes estudios en nuestro grupo de trabajo utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia silvestre y dos líneas mutantes, la primera llamada *Atlcb2a-1* ha sido modificada genéticamente mediante la inserción de un transposón en el gene que codifica para la subunidad LCB2a de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), haciendo que la enzima sólo sea funcional formando el complejo LCB1/LCB2b y no el LCB1/LCB2a; esta enzima lleva a cabo la primera reacción de la biosíntesis de lípidos complejos como se muestra en la Figura 9. La segunda mutante identificada como *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tiene la misma modificación en el gene que codifica para la subunidad LCB2a de la

SPT, pero además fue diseñada para que al ser expuesta a un inductor; en este caso Metoxifenazida, se exprese un RNA de interferencia que promueve la destrucción del RNAm que codifica para la subunidad LCB2b de la SPT. Lo anterior produce una disminución de la biosíntesis de esfingolípidos complejos y por lo tanto la cantidad de esfingolípidos en la membrana disminuye poco a poco, logrando una disminución del 36% de bases de cadena larga totales a los siete días posteriores a la inducción señalado como dpi (Dietrich *et al.*, 2008).



Figura 9. Esquema de la secuencia de reacciones en la vía de síntesis de esfingolípidos. Se señala en el recuadro rojo a la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) (modificada de Sterin-Speziale y Leocata-Nieto, 2007).

En éstas condiciones de disminución de esfingolípidos, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> aumenta un 40% con respecto a la línea silvestre como se muestra en la Figura 10 (Vázquez-Vázquez *et al.*, 2007). Tomados juntos, ambos hallazgos sugieren que la enzima tiene una actividad que está influenciada por los esfingolípidos. En el presente trabajo se exploró la catálisis de esta enzima en las mutantes utilizadas mediante un enfoque de cinética enzimática, tomando como grupo control las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* 0 y 7 dpi y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 0 dpi; y evaluando los cambios cinéticos en la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* 7dpi.



Figura 10. Hidrólisis de ATP de vesículas de membrana plasmática extraídas de diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*, con diferentes tiempos de exposición al inductor del silenciamiento del gene *Lcb2a* de la serina palmitoiltransferasa. Las condiciones de medición de la hidrólisis de ATP fueron usando 10 mM de ATP-Mg y 30 min de tiempo de reacción (tomado de Vázquez-Vázquez *et al.*, 2007).

## IV. HIPÓTESIS

El aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea de *Arabidopsis thaliana* con menor contenido de esfingolípidos se debe a cambios en las constantes cinéticas de la enzima.

## V. OBJETIVOS

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las constantes cinéticas de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática para la reacción de hidrólisis de ATP en una línea de *Arabidopsis* que presenta un menor contenido de esfingolípidos.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener vesículas de membrana plasmática de la línea de *Arabidopsis thaliana* con un menor contenido de esfingolípidos (*Atlcb2b hp/Atlab2a* 7dpi) y de las líneas control (Silvestre, *Atlcb2a* 1, *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 0 dpi)

Establecer las condiciones de ensayo para medir la cinética de la enzima.

Determinar  $K_m$ ,  $V_{max}$  e I<sub>50</sub> para Vanadato.

Determinar el efecto de esfingolípidos exógenos en la actividad aumentada de la enzima de las plantas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 7dpi con un menor contenido de esfingolípidos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Metodología general

La estrategia experimental seguida en este trabajo se delinea en la Figura 11.



Figura 11. Esquema general de la metodología seguida en este trabajo.

## 2. Material Biológico

Se utilizaron vesículas de membrana plasmática de tres diferentes líneas de plantas de la especie *Arabidopsis thaliana*; el ecotipo Columbia (Col-0), la línea Silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con diferentes tiempos de exposición al inductor Metoxifenazida (Tabla 3).

Tabla 3.Caracerísticas genotípicas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas como material biológico

Líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)	Características genotípicas	Contenido esfingoideo		
Silvestre	Sin modificaciones en el genoma	Contenido normal		
Atlcb2a-1	Inserción de un transposón en el gene que codifica para la subunidad LCB2a* de la serina palmitoiltransferasa	Contenido normal		
Aticb2b hp/Aticb2a	<ul> <li>a) Inserción de un transposón en el gene que codifica para la subunidad LCB2a* de la serina palmitoiltransferasa</li> <li>b) Silenciamiento inducible del gene que codifica para la subunidad LCB2b* de la serina palmitoiltransferasa al ser expuesta al inductor Metoxifenazida</li> </ul>	<ul> <li>a) Contenido</li> <li>normal</li> <li>b) Disminución del</li> <li>36% en el</li> <li>contenido total</li> <li>de bases de</li> <li>cadena larga</li> </ul>		

\*La serina palmitoiltransferasa puede tener dos conformaciones LCB1/LCB2a, LCB1/LCB2b. Ver antecedentes pág. 20.

- 3. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática de Arabidopsis thaliana
  - A. Obtención de la fracción microsomal.

Se siguió el protocolo descrito por Gutiérrez-Nájera *et al.* (2005) haciendo un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

B. Obtención de vesículas de membrana plasmática.

Fueron aisladas a partir de las fracciones microsomales utilizando un sistema de distribución de las membranas subcelulares en un sistema de dos polímeros acuosos (polietilen glicol y dextran X-100) ver apéndice.

4. Determinación de la actividad de ATPasa

La hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de *Arabidopsis* se midió utilizando 150 µL de medio de hidrólisis (Ver Apéndice). Se añadieron 2.5-5 µg de proteína membranal de cada una de las líneas a diferentes tiempos de exposición, iniciándose en ese momento la incubación en
el medio de reacción por 30 min en un baño a temperatura constante a 29 °C. Una vez terminada la incubación, se detuvo la hidrólisis de ATP añadiendo SDS al 24% en peso. A esta mezcla de reacción se determinó la cantidad de Pi liberado del ATP por la enzima y también se determinó la hidrólisis no enzimática de ATP en el medio de reacción durante los 30 minutos de incubación.

 Determinación de las condiciones óptimas para medir la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP

A. Determinación del tiempo óptimo de reacción

Se midió la hidrólisis de ATP como se describió en la sección anterior utilizando vesículas de membrana plasmática de las líneas *Atlcb2a-1* (7 dpi) y *Atlcb2b-hp/Atlcb2a* (7 dpi) con 5 µg cada una, se tomó una alícuota para medir la hidrólisis de ATP a 10, 20 30, 40 y 50 min con una concentración de ATP-Mg de 10 mM.

B. Determinación de la hidrólisis de ATP en función de la cantidad de proteína
Se midió la hidrólisis de ATP como se describió en la sección anterior utilizando vesículas de membrana plasmática de las líneas *Atlcb2a-1* (7 dpi) y *Atlcb2b-hp/Atlcb2a* (7 dpi) con 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 μg de proteína membranal, incubando la reacción por 30 min.

6. Determinación de la actividad de ATPasa en todas las líneas de *Arabidopsis* en condiciones óptimas.

La hidrólisis de ATP de las diferentes preparaciones membranales fue determinada según se indicó en la sección de Determinación de Actividad de ATPasa, usándose vesículas de membrana plasmática de las plantas de las líneas silvestre (6 dpi), *Atlcb2a-1* (0 y 7 dpi) y Atlcb2b-*hp/Atlcb2a* (0 y 7 dpi), 4 µg para las líneas control y 2.5 µg para la línea con menor contenido de esfingolípidos, la incubación de la reacción fue de 20 min.

7. Determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

La hidrólisis de ATP de las diferentes preparaciones membranales fue determinada según se indicó en la sección de Determinación de Actividad de ATPasa, utilizando diferentes concentraciones de ATP-Mg de 0.2 mM hasta 10 mM. Las concentraciones de ATP y MgCl<sub>2</sub> fueron equimolares.

8. Determinación de la I<sub>50</sub> para vanadato

La hidrólisis de ATP de las diferentes preparaciones membranales fue determinada según se indicó en la sección de Determinación de Actividad de ATPasa, utilizando diferentes concentraciones de  $VO_4^{3-}$  que van desde 10 a 300  $\mu$ M. La concentración de ATP-Mg fue de 8 mM.

9. Determinación del Pi liberado.

La técnica usada fue la misma descrita por González-Romo *et al.* (1992); para determinar la cantidad de fosfato inorgánico liberado realizando una curva patrón con K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

10. Extracción de la fracción de esfingolípidos de la membrana plasmática. Esta fracción fue extraída de membranas plasmáticas purificadas de hojas de la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* según Markham *et al.* (2006).

11. Procesamiento estadístico de los datos experimentales.

Las determinaciones para cada condición experimental se realizaron con 3-11 réplicas con triplicado, utilizando de 2 a 4 preparaciones membranales independientes, obteniéndose los promedios y calculándose la desviación estándar o el error estándar, según el caso. Los datos fueron procesados por los programas Microsoft Office Excel 2007®, Data Analysis and Technical Graphics Origin 6.0 y 3.0® y Graphpad Prism Data Analysis and Biostatistics Software and Resources®.

#### VII. RESULTADOS

1. Análisis de la actividad de hidrólisis de ATP en la línea *Atlcb2b hp/*Atlcb2a bajo inducción del silenciamiento génico y de una línea control.

Experimentos anteriores de medición de actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> en vesículas purificadas de membrana plasmática, demostraron que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 días posteriores a la inducción (dpi), tiene un aumento del 36% aproximadamente en la actividad de hidrólisis de ATP respecto a su controles: *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (0 dpi), *Atlcb2a-1* (0 y 7 dpi) y silvestre (0 y 6 dpi); en estas condiciones, la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* presenta un decaimiento del 36% en la cantidad de bases de cadena larga totales.

Con objeto de analizar los componentes que contribuyen a la hidrólisis de ATP en la línea silenciada genéticamente en uno de los genes codificantes para la enzima serina palmitoíl transferasa, nos propusimos utilizar inhibidores selectivos de las posibles enzimas presentes en la fracción membranal que podrían participar en la hidrólisis de ATP medida. En la Figura 12 se analiza el comportamiento de hidrólisis de ATP llevado a cabo por diferentes enzimas membranales que pueden estar presentes en la preparación de las vesículas utilizadas, entre estas enzimas se esperaba que se encontrara de manera mayoritaria la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. Las líneas de Arabidopsis thaliana utilizadas fueron: la línea Atlcb2a-1 (7 dpi) que se encuentra graficada a la izquierda en cada par de columnas y la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a (7 dpi) ubicada a la derecha. La primera se utilizó como representante del comportamiento de las líneas controles usadas en el trabajo de Vázquez-Vázquez et al. (2007); la segunda tiene una disminución del 36% en el contenido de bases de cadena larga totales y un aumento del 40% aproximadamente en la actividad específica de la ATPasa. El primer par de columnas corresponde a la hidrólisis de ATP que llevan a cabo todas las enzimas presentes en la vesícula de membrana plasmática que utilicen al ATP como sustrato; se observa que los valores de ambas líneas son ligeramente diferentes entre sí; el aumento de actividad en la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a es del 36% aproximadamente, comportamiento que también se observa en el siguiente par de columnas que corresponden a las enzimas sensibles a Vanadato (ATPasas de H<sup>+</sup> de membrana plasmática), aunque en este caso el aumento en la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a es del 33% aproximadamente. En el tercer par de columnas se muestra la actividad de las enzimas no sensibles a Nitrato, Molibdato o Azida que de igual forma corresponden a las ATPasas de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, entre este par de columnas la diferencia es mayor que en los dos pares anteriores y corresponde a un aumento en la actividad del 57% aproximadamente. El cuarto par de columnas corresponde al porcentaje de inhibición por Vanadato o dicho en otras palabras a la contribución de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la hidrólisis total en cada una de las líneas; se muestra que la proporción de esta enzima en las dos preparaciones fue la misma. En el último par de columnas se grafica la actividad de las enzimas sensibles a Nitrato, Molibdato o Azida; que corresponden a las ATPasas de la membrana mitocondrial, del tonoplasto y del cloroplasto; así como a las Fosfatasas, se observa que la actividad de hidrólisis de ATP que llevan a cabo estas enzimas fue similar en ambas líneas.



Figura 12. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de dos líneas de *Arabidopsis thaliana* de actividad contrastante, medidas a una concentración de 10 mM de ATP, 29°C y 30 min como tiempo de incubación. Datos mostrados en el Apéndice, Tabla V y Tabla VI.

2. Establecimiento de las condiciones óptimas para medir la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP

La determinación de las condiciones óptimas de la reacción de ATPasa incluyó la medición de la actividad dependiente del tiempo de reacción y de la cantidad de proteína en las vesículas membranales. Los valores determinados están representados en la Figura 13, en ésta se encuentran graficadas la línea *Atlcb2a-1* con 7 dpi y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 dpi. En la determinación de la actividad de hidrólisis de ATP variando el tiempo de incubación representado en la Figura 13A se observó que la actividad aumentaba de manera proporcional al tiempo de incubación hasta los 50 min, que fue el tiempo máximo medido en la hidrólisis de ATP de las vesículas de membrana plasmática obtenidas de ambas líneas. Si bien, aún cuando este aumento fue lineal en los dos casos, la actividad fue mayor siempre en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 dpi.

Por otra parte, en la determinación del comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP variando la cantidad de proteína representado en la Figura 13B, se observó que el aumento de la actividad fue proporcional entre 1 y 6 µg de proteína membranal total añadida, sin embargo esta proporcionalidad ya no se cumplió al agregar 8 µg de proteína; este valor fue el máximo evaluado. Aunque este comportamiento fue seguido por ambas líneas de *Arabidopsis thaliana,* la actividad mayor se mantuvo en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 dpi en comparación con la de la línea *Atlcb2a-1* con 7 dpi. En resumen, se encontró que la actividad de hidrólisis de ATP fue proporcional tanto con respecto al tiempo de incubación como a la cantidad de proteína utilizada en los intervalos mencionados.



Figura 13. Actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de vesículas purificadas de dos líneas de *Arabidopsis thaliana* con diferente cantidad de esfingolípidos. **A** actividad medida a diferentes tiempos de incubación con 5 μg de proteína. Los datos utilizados se encuentran en el apéndice Tabla VII. **B** medida con diferentes cantidades de proteína y 30 min de incubación. Los datos utilizados se encuentran en el Apéndice, Tabla VIII y Tabla IX.

3. Reproducción de los resultados de medición de actividad de hidrólisis de ATP en las condiciones óptimas para hacer estudios cinéticos.

Los resultados obtenidos inicialmente por Vázquez-Vázquez et al. 2007 fueron determinados en condiciones ligeramente diferentes a las óptimas determinadas en los experimentos del punto anterior. Con objeto de hacer los estudios cinéticos que nos interesaban, nos propusimos determinar las actividades de ATPasa en todas las líneas de Arabidopsis utilizadas pero en las nuevas condiciones establecidas. En la Figura 14 se observa el comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP llevada a cabo por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de diferentes líneas de Arabidopsis thaliana. Se muestra la línea silvestre sin exposición al inductor, la línea Atlcb2a-1 sin exposición al inductor, la misma línea con 7 días posteriores a la exposición al inductor; la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a sin exposición al inductor y la misma línea con 7 días posteriores a la exposición al inductor. Al igual que en el trabajo de Vázquez-Vázquez et al. en 2007, la línea silvestre y la línea Atlcb2a-1 con y sin exposición al inductor presentaron valores similares en la actividad de ATPasa; también se observa que la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a sin exposición al inductor mostró un aumento de 20% con respecto a la línea silvestre; mientras que la misma línea después de 7 días de exposición al inductor del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT mostró un aumento de 49% respecto a la línea silvestre.



Figura 14. Actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* expuestas diferentes tiempos al inductor del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT (Metoxifenazida). Las determinaciones se hicieron medidos con 20 min de incubación y con 4  $\mu$ g de proteína para las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* con y sin inductor y para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor; con 2.5  $\mu$ g para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 días posteriores a la inducción. Los datos utilizados se encuentran en el Apéndice, Tabla X.

Con el aumento de actividad en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducción se realizó un análisis de varianza estadístico ANOVA de dos vías. La finalidad del análisis fue determinar si el aumento de actividad observado en la línea silenciable en ausencia de inductor era significativamente diferente a la actividad observada en las otras líneas controles utilizadas. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graphpad Prism Data Analysis and Biostatistics Software and Resources® por medio del análisis "Two-way ANOVA". Todos los datos experimentales se introdujeron al programa. El número de entradas fue de doce por línea por condición. Al evaluar todos los ensayos realizados se determinó que el aumento de actividad en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 0 dpi no era significativamente diferente a los valores obtenidos con la línea *Atlcb2a-1* 0 y 7 dpi, ambos con respecto al control; mientras que el

aumento de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7 dpi es significativamente diferente a los valores obtenidos por las otras tres líneas evaluadas como se muestra en la Figura 15.



Figura 15. Comparación de la actividad de ATPasa de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, ambas con respecto a la actividad de ATPasa de la línea silvestre. Los datos fueron tomados de la Figura 14. El asterisco indica P < 0.0001.

4. Determinación de la cinética de hidrólisis de ATP en diferentes líneas de Arabidopsis thaliana

En la Figura 16 se muestran cuatro gráficas que describen el comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de ATP llevado a cabo por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática purificada de diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*. Los datos experimentales corresponden a las tres líneas controles (en cuanto a la no reducción o cambio en el contenido total de esfingolípidos) y a la línea que presenta una reducción de esfingolípidos. El gráfico que corresponde a la línea silvestre se encuentra señalado con la letra A. Para esta línea se muestran los resultados de 7 ensayos realizados con dos preparaciones de vesículas de membrana plasmática independientes. Cada determinación está expresada en un color diferente. Si bien resulta aparente que los ensayos se ubican en dos grupos diferentes, con todos ellos se realizó el análisis estadístico que se presentará más adelante. Aun considerando estas diferencias, los siete ensayos describieron un comportamiento hiperbólico similar de la actividad de hidrólisis de ATP con respecto a la concentración de sustrato, observándose que el intervalo de 0 a 0.5 mM de ATP presentó la mayor dispersión de puntos experimentales (Figura

16A), mientras que aproximadamente a 6 mM de ATP-Mg se alcanzó la actividad máxima de la enzima.

El gráfico descrito en la Figura 16B muestra el resultado de once ensayos con tres preparaciones independientes de membrana plasmática extraída de la línea *Atlcb2a-1*, todas obtenidas de las plantas 7 días posteriores a la exposición al inductor metoxifenazida. Se observó que a pesar de tener una dispersión considerable, el patrón de actividad de hidrólisis de ATP fue de hiperbólico con respecto a la concentración de sustrato, alcanzándose en todos los ensayos la saturación de la enzima a altas concentraciones de sustrato.

Los ensayos con la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición al inductor se encuentran en el gráfico de la Figura 16C. Se muestran los resultados de 6 ensayos con una preparación de vesículas de membrana plasmática. En esta línea de *Arabidopsis thaliana* se observa, al igual que en los casos de las líneas descritas anteriormente, todos los ensayos presentaron un comportamiento hiperbólico similar entre sí. La dispersión de las determinaciones experimentales a concentraciones bajas de ATP/Mg fue pequeña y alrededor de 6 mM de la concentración de sustrato se llegó a la máxima actividad de a enzima.

Al final en la Figura 16D se muestran los resultados de seis ensayos realizados con dos preparaciones independientes de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 días posteriores a la exposición al inductor, observándose que los puntos siguieron un patrón similar de hidrólisis de ATP con respecto a la concentración de sustrato. La dispersión entre las determinaciones experimentales para cada concentración de sustrato fue reducida y en esta línea de *Arabidopsis*, la concentración máxima de ATP/Mg utilizada fue de 8 mM. Lo anterior se debió a que en esta línea la actividad de la enzima fue mayor, alcanzándose mayores concentraciones de ADP en el medio, mismo que inhibe la reacción de hidrólisis de ATP.



Figura 16. Determinación de la cinética de actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato en tres líneas de *Arabidopsis thaliana*. Los puntos experimentales están presentados con un color diferente para cada ensayo. **A** Línea silvestre; **B** Línea *Atlcb2a-1,* 7 días post-inducción; **C** Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a,* 0 días post-inducción; **D** Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a,* 7 días post-inducción. Datos mostrados en el Apéndice, Tablas XI, XII, XIII y XIV.

5. Análisis estadístico de los gráficos de hidrólisis de ATP contra concentración de sustrato

y obtención de los parámetros cinéticos para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* Con objeto de determinar el patrón cinético de la hidrólisis de ATP en cada una de las líneas de *Arabidopsis* para posteriormente compararlas entre sí, todos los datos experimentales mostrados en la Figura 16 fueron analizados estadísticamente. En la Figura 17 se muestran las gráficas resultantes del promedio de cada punto graficado con su error estándar respectivo. Estos datos experimentales fueron sometidos a dos tipos de ajustes: uno descrito por la ecuación de Michaelis-Menten (en rojo), que describe una cinética hiperbólica y otro ajuste a la ecuación de Hill (en azul), que describe una cinética sigmoidal. En ambos casos, se calcularon los valores de las contantes cinéticas de  $K_m$  y  $V_{max}$ . De igual forma se presenta el valor del coeficiente de correlación obtenido en cada ajuste. Los datos fueron sometidos a ambos ajustes ya que existen reportes en la literatura en los que la enzima muestra cooperatividad. Esta propiedad se refleja en el número de Hill (n), un número de Hill mayor a 1 indica que la enzima tiene cooperatividad positiva; en caso de ser menor a 1 la enzima tiene cooperatividad negativa. El caso de que el número de Hill sea 1 implica que la enzima no muestra cooperatividad y por lo tanto tiene un comportamiento de tipo michaeliano.

La Figura 17A corresponde al promedio del comportamiento cinético del promedio de siete ensayos con la línea silvestre, las líneas que corresponden a los diferentes ajustes se separan poco en el intervalo de 2 a 6 mM de ATP-Mg, sin embargo los valores del coeficiente de correlación son considerablemente buenos, lo cual puede relacionarse con el hecho de que todas las barras de error de cada punto tocan las líneas de ajuste evaluados a pesar de la diferencia de grupos que se presentó en la Figura 17A. El segundo control se presenta en la Figura 17B y corresponde a la línea Atlcb2a-1 con 7 dpi, con esta línea se elaboraron 11 ensayos. Al igual que en la línea silvestre los valores de los coeficientes de correlación de ambos ajustes son bastante buenos, en este caso las líneas que describen los diferentes comportamientos no se separa en ningún intervalo de concentración, además de que las barras de error son muy pequeñas a pesar de la amplia dispersión que se mostró en la Figura 17B y nuevamente todas siguen ambas líneas de los diferentes ajustes. El comportamiento de la tercera línea control se representa en la Figura 17C; corresponde a la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a con 0 dpi, la gráfica muestra el promedio de 6 experimentos independientes y se observa que todos los puntos cuentan con su respectiva barra de error que como era de esperarse son pequeños debido a que no se encontró gran dispersión en la comparación de los ensayos realizados y que a su vez ésta línea se intercepta con los diferentes ajustes evaluados. Los valores de los coeficientes de correlación son bastante buenos y los ajustes parecen tener diferencias en el intervalo de 0.5 a 6 mM de ATP-Mg. Por último se muestra en la Figura 17D el comportamiento cinético de la línea que presenta la reducción de esfingolípidos y observamos un comportamiento similar al de las líneas controles: las barras de error de cada punto se interceptan con ambas líneas de los ajustes, además de que éstas barras muestran poca movilidad de los valores; ambos valores del coeficiente de correlación son bastante buenos y en este caso se observa nuevamente que las líneas que describen el comportamiento de los ajustes evaluados no son diferentes en el intervalo de medición.



Figura 17. Actividad de hidrólisis de ATP en función de la concentración variable de sustrato para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*. Las determinaciones experimentales fueron sometidas a dos tipos de ajustes: — ajuste hiperbólico (modelo de Michaelis-Menten) y — ajuste Sigmoidal (Modelo de Hill). Se indican los valores de coeficiente de correlación respectivos. A Línea silvestre; B Línea *Atlcb2a-1;* C Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 0 días post-inducción; D Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7 días post-inducción. Los ajustes se realizaron con el programa Microcal Origin 6.0 *Data analysis and Graphing Software*®. Se muestran los valores promedios ± EE de los datos experimentales mostrados en el Apéndice, Tabla XV.

De los ajustes obtenidos, aparentemente todos los puntos experimentales se ajustaron a curvas tanto michaelianas como de Hill, reflejándose en altos valores del coeficiente de correlación (Figura 17). Con objeto de comparar todos los resultados de las gráficas de esta Figura, las curvas promedio se graficaron en la misma escala y así evidenciar mejor las semejanzas y diferencias entre las cinéticas de las tres líneas (Figura 18). Se observaron varias similitudes en la comparación de las cinéticas de las cuatro líneas: la descripción de curvas hiperbólicas, alcanzándose una actividad máxima a 4 mM de ATP-Mg aproximadamente. Asimismo, las líneas que describen el comportamiento cinético de la línea *Atclb2a-1* y la línea silvestre fueron

muy parecidas en el intervalo de concentración de sustrato de 2 a 10 mM. Sin embargo, aunque aparentemente también se observo un aumento en la actividad de la línea *Atlb2b hp/Atlcb2a* a 0 dpi, éste aumento no resultó ser significativo al hacer el análisis estadístico ANOVA de dos variables .Por último se muestra claramente el aumento en el valor máximo de actividad de ATPasa en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 dpi comparado con las otras tres condiciones controles.



Figura 18. Gráfico comparativo del comportamiento cinético de la ATPasa de H<sup>+</sup> en vesículas de la membrana plasmática aisladas de diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*. Línea silvestre • Línea *Atlcb2a-1* ▲ Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 0 dpi ▼Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 dpi. La hidrólisis de ATP fue determinada a 29 °C y durante 20 min de incubación, utilizando 4 µg de proteína membranal para las líneas controles: silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* y 2.5 µg para la línea con menor contenido de lípidos esfingoideos: *Atlcb2b hp/Atlb2a* con 7 dpi. Los valores se tomaron de las gráficas de la Figura 17. Se muestran los promedios ± EE.

De las gráficas ajustadas a los modelos de Michaelis-Menten y Hill, se obtuvieron los valores numéricos de  $K_m$  y  $V_{max}$  así como el número de Hill. Para ello, los ajustes hiperbólico y sigmoidal se llevaron a cabo por el programa Microcal Origin 6.0 *Data analysis and Graphing Software*®

con la herramienta "Non-linear analysis". Los resultados obtenidos a partir de los ajustes hiperbólicos se encuentran en la Tabla 4, mientras que los calculados a partir de los ajustes sigmoidales se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 4. Valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  obtenidos del ajuste hiperbólico para las cinéticas de saturación de la reacción de hidrólisis de ATP de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1, Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición al inductor y *Atlcb2b hp/Atlb2a* con 7 dpi. Los ajustes se realizaron con el programa Microcal Origin 6.0 *Data analysis and Graphing Software*®. Se muestran los valores promedios ± EE

Parámetro cinético	Líneas de Arabidopsis thaliana				
	Silvostro	Atlah2a-1	Atlcb2b hp/Atlcb2a	Atlcb2b hp/Atlcb2a	
	Silvestre	AllCDZa-1	0 dpi	7 dpi	
<b>K</b> m (mM)	2.06 ± 0.26	1.07 ± 0.05	1.29 ± 0.11	1.23 ± 0.1	
V <sub>max</sub> (nmol Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	168.5 ± 7.7	130.08 ± 1.75	223.2 ± 6.04	315.94 ± 9.19	
V <sub>max/</sub> K <sub>m</sub>	1.4x10 <sup>3</sup> ± 183	$2x10^{3} \pm 99$	2.9x10 <sup>3</sup> ± 258	4.3x10 <sup>3</sup> ± 370	

Con respecto al ajuste michaeliano, los valores de la Tabla 4 muestran similitud en el valor de  $K_m$  para todas las líneas de *Arabidopsis thaliana* estudiadas. Por el contrario los valores de  $V_{max}$  para las líneas silvestre, *Atlcb2a-1, Atlcb2b hp/Atlcb2a* 0 dpi fueron cercanos pero mostraron diferencias de hasta un 29% entre sí comparadas con la línea silvestre. Sin embargo, se puede denotar un claro aumento del valor de  $V_{max}$  en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7 dpi, en la que el incremento varió entre el 40 y el 80% aproximadamente dependiendo de la línea control contra la cual se compare. Al realizar el cálculo de  $V_{max}/K_m$  para evaluar la eficiencia catalítica de la enzima en las diferentes líneas, se encontraron valores con un patrón similar al de  $V_{max}$ . El valor de la eficiencia catalítica de la enzima contenida en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7 dpi la cual presenta un menor contenido de esfingolípidos fue mayor en un intervalo de 45 al 70% respecto a los controles considerados.

Tabla 5. Valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  obtenidos del ajuste sigmoidal para las cinéticas de saturación de la reacción de hidrólisis de ATP de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1, Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición al inductor y *Atlcb2b hp/Atlb2a* con 7 dpi. Los ajustes se realizaron con el programa Microcal Origin 6.0 *Data analysis and Graphing Software*®. Se muestran los valores promedios ± EE

Parámetro cinético	Líneas de Arabidopsis thaliana				
	Silvostro	Atlab22-1	Atlcb2b hp/Atlcb2a	Atlcb2b hp/Atlcb2a	
	Silvestre	AllCD2d-1	0 dpi	7 dpi	
<b>К</b> т (Мт)	2.66 ± 1.19	1.04 ± 0.07	1.12 ± 0.14	1.17 ± 0.21	
V <sub>max</sub> (nmol Pimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	186.17 ± 30.03	127.75 ± 3.69	211.19 ± 9.5	310.88 ± 20.8	
n	0.88 ± 0.15	$1.05 \pm 0.70$	1.14 ± 0.11	1.03 ± 0.12	
V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	1.2x10 <sup>3</sup> ± 555	$2x10^3 \pm 150$	$3.1 \times 10^3 \pm 418$	$4.4 \times 10^3 \pm 848$	

Analizando los valores obtenidos por el ajuste sigmoidal enlistados en la Tabla 4 encontramos que son muy similares a los obtenidos con el ajuste hiperbólico, por otra parte, el número de Hill, *n*, es muy cercano a 1. Respecto a los resultados del cociente  $V_{max}/K_m$  se encontró que sus valores y patrones fueron similares a los obtenidos con el ajuste hiperbólico.

## 6. Determinación de la I<sub>50</sub> para VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

Se sabe que el VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> es un inhibidor competitivo para la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (Bowman y Slayman, 1979; Coccuci *et al.*, 1980; Colombo *et al.*, 1981; Sze, 1983; O'Neil y Spanswick, 1984a), por lo que fue utilizado como una característica que podría indicar diferencias en el sitio activo de la enzima de las diferentes líneas de *Arabidopsis* estudiadas, en particular la de la línea con un menor contenido de esfingolípidos. Para ello, se evaluó la I<sub>50</sub> para el vanadato, utilizándose las siguientes líneas de *Arabidopsis thaliana: Atlcb2a-1* (7dpi) como línea control y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (7dpi) y así tener dos condiciones contrastantes para observar el efecto de la disminución de esfingolípidos en el sitio de reconocimiento al sustrato de la enzima; las preparaciones membranales utilizadas fueron las mismas con las que se determinaron la dependencia de la hidrólisis de ATP con respecto al tiempo y a la proteína, la reproducción de los resultados en condiciones óptimas y la determinación del comportamiento cinético de la enzima.

En la Figura 19 se muestran los resultados de la disminución de la actividad a diferentes concentraciones de Vanadato, para la línea *Atlcb2a-1* y para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con menor contenido de esfingolípidos; además de añadir diferentes concentraciones de Vanadato en el medio también se incluyeron tres concentraciones de sustrato: la concentración de ATP-Mg en la que se presenta la zona de saturación de la enzima (8 mM), una concentración superior a la  $K_m$  (3 mM) y una concentración menor a la  $K_m$  (0.5 mM). En la gráfica podemos observar que en todos los casos, la actividad disminuyó al aumentar la concentración de 150 µM de Vanadato aproximadamente, ya que a un valor de 300 µM de Vanadato la actividad ya no pareció disminuir considerablemente. En lo que respecta a las curvas de inhibición con diferentes concentraciones de ATP-Mg en el medio, se observa que la actividad fue más alta cuando había mayor concentración de ATP-Mg en el medio, pero de igual forma la actividad disminuyó y llegó a un mínimo valor en las tres determinaciones con diferente concentración de ATP-Mg.



Figura 19. Cinética de inhibición de la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por diferentes concentraciones de vanadato y medida a diferentes concentraciones de ATP-Mg. A Línea *Atlcb2a-1*, 7dpi, como representante de las líneas control. B Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a-1*, 7dpi con menor contenido de esfingolípidos. ■ 0.5 mM ATP-Mg en el medio de reacción. ● 3 mM ATP-Mg en el medio de reacción. ● 3 mM ATP-Mg en el medio de reacción. ▲ 8 mM ATP-Mg en el medio de reacción. Experimentos realizados con 4 µg para la línea *Atlcb2a-1* y 2.5 µg para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7 dpi. La actividad de determinó durante una incubación de 20 min a 29°C. Datos experimentales se muestran en el Apéndice, Tablas XVI, XVII y XVIII.

Los resultados anteriores fueron graficados de manera que se pudieran comparar las curvas con la misma concentración de ATP para las dos líneas de *Arabidopsis*, obteniéndose los gráficos mostrados en la Figura 20. Las gráficas se muestran de manera independiente para poder apreciar mejor las curvas comparativamente. El comportamiento es similar en ambas líneas en los tres gráficos; señalado con la letra A se ubica el gráfico que corresponde a la actividad medida con una concentración de 0.5 mM de ATP-Mg en el medio de reacción; se observa que los valores de actividad determinados a esta concentración de ATP presentaron una dispersión considerable, a juzgar por las barras de desviación estándar, pero a pesar de ello la disminución en la actividad que muestra la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. El gráfico señalado con la letra B corresponde a la actividad medida con una concentración de ATP-Mg, encontrándose que al igual que en el caso anterior las desviaciones son altas pero el comportamiento de ambas líneas fue similar nuevamente. En el caso de 8 mM de ATP-Mg señalado con la letra C se observó que las desviaciones estándar fueron menores a las de los otros dos casos y las líneas se superponen prácticamente en todo el intervalo de concentración de sustrato.



Figura 20. Comparación de la inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de dos líneas de *Arabidopsis thaliana* con diferente cantidad de esfingolípidos. La actividad fue evaluada a diferentes concentraciones de Inhibidor. A Concentración de 0.5 mM de ATP-Mg. B Concentración de 3 mM de ATP-Mg. C Concentración de 8 mM de ATP-Mg. La actividad se midió con 4 μg de proteína para la línea *Atlcb2a-1*, 7dpi (■), 2.5 μg para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, 7dpi (●), a 29 °C y 20 min de incubación. Los datos experimentales son los de la Figura 17.

Posteriormente, a partir de los datos anteriores, se calculó el porcentaje de inhibición que presentaba la actividad de hidrólisis de ATP en las dos líneas y fueron comparados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21. Con la letra A se muestra el gráfico que corresponde a las actividad medida a una concentración de 0.5 mM de ATP-Mg, observándose que las desviaciones estándar fueron amplias para ambas líneas además, lo que no permitió detectar diferencia entre las mismas. Este patrón también se observó a una concentración de 3

mM de ATP-Mg como se muestra en el gráfico marcado con la letra B, en el cual, aunque con desviaciones estándar menores, de igual forma los resultados no marcan diferencias en el comportamiento entre las dos líneas analizadas. En el gráfico señalado con la letra C se ubican los resultados de las mediciones con una concentración 8 mM de ATP y a pesar de que las desviaciones estándar no son tan grandes. Nuevamente, se repite el comportamiento de las dos concentraciones anteriores.



Figura 21. Comparación del porcentaje de inhibición por Vanadato de la actividad de hidrólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en dos líneas de *Arabidopsis thaliana*: (**•**) Línea *Atlcb2a-1*, 7 dpi (**•**).Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, 7 dpi. Entre ambas líneas la experimentación se llevó a cabo con 4 µg de la línea *Atlcb2a-1* y con 2.5 µg de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 29°C y 20 min de reacción. Datos experimentales se encuentran en el Apéndice, Tablas XIX, XX y XXI.

Mediante los valores de la Figura 21 y el programa Microcal Origin 3.0 Data analysis and graphic software® se llevó a cabo el cálculo del valor de  $I_{50}$  para  $VO_4^{3-}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 6.

	Líneas de Arabidopsis thaliana		
Concentración de ATP (mM)	I₅₀ para <i>Atlcb2a-1</i> (mM)	I₅₀ para <i>Atlcb2b hp//Atlcb2a</i> 7 dpi (mM)	
0.5	267.4 ± 61.46	373.7 ± 121.5	
3	143.7 ± 24.84	134.2 ± 9.18	
8	122.6 ± 21.42	96.10 ± 8.44	

Tabla 6. Valor de  $I_{50}$  para VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> calculado mediante la herramienta Fit I50 del programa Microcal Origin 3.0 Data analysis and graphic software. Utilizando los gráficos de la Figura 21.

Se puede observar que los valores de  $I_{50}$  entre las dos líneas no son significativamente diferentes; además los valores de  $I_{50}$  en las concentraciones de 3 y 8 mM son similares mientras que el valor calculado a 0.5 mM es mayor un 62% en promedio comparado con los demás valores

7. Reconstitución membranal de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 7 días post-inducción con esfingolípidos exógenos.

Para corroborar que era la deficiencia de esfingolípidos complejos lo que estaba aumentando la actividad de hidrólisis de ATP en la línea mutante silenciable, un experimento adecuado era determinar la influencia de esfingolípidos complejos exógenos en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la mutante en cuestión. Para ello, se tomaron diferentes cantidades de la fracción de esfingolípidos extraídos de vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre y se incubaron con las vesículas de membrana plasmática de las líneas Atlcb2a-1 y Atlcb2b hp/Atlcb2a utilizadas en los experimentos anteriores. A continuación, se llevaron a cabo experimentos de hidrólisis de ATP con cada una de ellas. Los resultados de estos experimentos se encuentran en la Figura 22. En ésta Figura se puede observar que en los tubos en donde se incubó a las membranas sin la fracción de esfingolípidos, los valores de las actividades fueron similares a las encontradas en experimentos anteriores para ambas líneas. La cantidad de fracción de esfingolípidos exógenos no afectó la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática presente en las vesículas provenientes de la línea Atlcb2a-1, la cual fungió como control de la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a. Sin embargo, en ésta, la actividad fue disminuyendo en función de la cantidad de los esfingolípidos exógenos añadidos hasta alcanzar los valores de actividad de la línea control Atlcb2a-1.



Figura 22. Reconstitución membranal con una fracción de esfingolípidos exógenos extraídos de membrana plasmática de la línea silvestre. (**■**) línea *Atlcb2a-1*, se utilizaron 4 µg de proteína membranal para los ensayos de actividad; (**●**) línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, se utilizaron 2.5 µg de proteína membranal para los ensayos de actividad. El tiempo de pre-incubación con esfingolípidos fue de 40 min; el tiempo de reacción de hidrólisis de ATP fue de 20 min a 29 °C, con una concentración de 8 mM de ATP-Mg. Resultados experimentales se encuentran en el Apéndice, Tabla XXII.

Por otra parte también se realizó la reconstitución membranal con una preparación comercial de glucosilceramida, los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 23. Se observa que el comportamiento es similar a lo sucedido al utilizar una fracción de esfingolípidos extraída; la actividad que presenta la línea *Atlcb2a-1* no se ve afectada al agregar glucosilceramida, por lo contrario la actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida va disminuyendo al aumentar la cantidad de glucosilceramida, hasta alcanzar valores similares de actividad de la línea control utilizada.



Figura 23. Reconstitución membranal con una preparación comercial de glucosilceramida. (■) línea *Atlcb2a-1*, se utilizaron 4 μg de proteína membranal para los ensayos de actividad; (●) línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, se utilizaron 2.5 μg de proteína membranal para los ensayos de actividad. El tiempo de pre-incubación con glucosilceramida fue de 40 min; el tiempo de reacción de hidrólisis de ATP fue de 20 min a 29 °C, con una concentración de 8 mM de ATP-Mg. Datos experimentales se muestran en el Apéndice, Tabla XXII.

### VIII. DISCUSIÓN

Dada la complejidad de la estructuración y composición de la membrana plasmática y de todas las membranas biológicas en general, no existe hasta ahora ningún modelo que permita saber con precisión cuáles, cuantos y en que posición los lípidos membranales rodean a una proteína membranal. Las metodologías empleadas son complicadas y requieren de instrumental sofisticado. Los pocos trabajos referentes a este problema se basan en evidencias cristalográficas de algunas proteínas y en ensayos de reconstitución de otras, haciendo posible identificar algunos lípidos que son esenciales para la función de algunas proteínas membranales y en algunos casos, de su influencia en la actividad de las proteínas (Imbrie y Murphy, 1984).

La ATPasa de H<sup>+</sup> de células vegetales es una proteína integral de la membrana plasmática que cataliza dos reacciones simultáneas: la reacción de hidrólisis de ATP y la expulsión de protones fuera del citosol. La primera aporta la energía necesaria para expulsar los protones fuera de la célula, mientras que la segunda impulsa diversas funciones fisiológicas como son la elongación celular, el transporte de nutrientes, apertura y cierre de estomas, entre otras (Morsomme y Boutry, 2000; Palmgren, 2001). Por ello, esta actividad enzimática es esencial para el desarrollo de la planta y para que ésta exprese respuestas a diferentes tipos de estreses bióticos o abióticos (Marré *et al.*, 1974; Ayres y Jones, 1975; Macri *et al.*, 1980; Zhang y Takemoto, 1987; Blein *et al.*, 1988; Palta, 1989; Arora y Palta; 1991; Susuki *et al.*, 1992; Niu *et al.*, 1993; Wevelsiep, 1993; Sondergaard *et al.*, 2004; Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005).

La importancia de la enzima en las actividades celulares de la planta ha ejercido una presión evolutiva para que la enzima presente varias formas de regulación de su actividad catalítica. A este respecto se ha establecido que la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática está altamente regulada por factores como la fosforilación (Palmgren *et al.*, 1991; Jahn *et al.*, 1997), la expresión diferencial de isoformas (Pérez *et al.*, 1992; Vitart *et al.*, 2001) y posiblemente la oligomerización (Briskin *et al.*, 1985; Briskin y Niesman-Reynolds, 1989; Lee *et al.*, 2002; Kanczewska *et al.*, 2005). La enzima también se regula a nivel de la expresión de los genes que codifican para las isoformas de la enzima.

Se ha encontrado que los lípidos son importantes moduladores de la actividad de la enzima (Coccuci y Marrè, 1984; Sandstrom y Cleland, 1989b; Brauer y Tu, Kasamo, 2003). Sin embargo, estos estudios han incluido sólo componentes lipídicos de la membrana como glicerolípidos y esteroles (Brauer y Tu, 1989; Grandmougin *et al.*, 1989a; Grandmougin *et al.*, 1989b; Sandstrom y Cleland, 1989a; Cooke *et al.*, 1994, Gomès *et al.*, 1996; Ramos *et al.*,

1994; Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1997). Una forma de averiguar el efecto de los lípidos en la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática ha sido ensayar la acción de diferentes lípidos que se añaden de manera exógena a preparaciones purificadas o semipurificadas de la enzima o incluso a preparaciones membranales. Adicionalmente, en este tipo de experimentos *in vitro* también se ha ensayado el efecto de otros anfífilos como lisofosfolípidos o detergentes (Tabla 7).

Tabla 7. Compuestos anfífilos modificadores de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática; se muestran los que activan ( $\uparrow$ ) o inhiben ( $\downarrow$ ) la actividad de la enzima (recopilación tomada de Vázquez-Vázquez *et al.*, 2007).

Glicerolínidos	Esteroles	Detergentes	
Cilceronpidos	Latervies	Zwitteriónicos	No Iónicos
Ácido fosfatídico ↓	Estigmasterol ↑	Lisofosfatidilcolina ↑	Lubrol WX ↑
Fosfatidilcolina ↑	Sitoesterol ↓	Zwittergent 3-10 ↑	TritonX-100 ↓
Fosfatidilserina ↑	Colesterol ↓	Zwittergent 3-12 ↑	Brij 58 ↑
Fosfatidilglicerol ↑	24-Metilcolesterol ↓	Zwittergent 3-14 ↑	Brij 35 ↑
Fosfatidiletanolamina ↓	24-Metilpolinastol ↓		
Fosfatidilinositol	14α,24-Dimetilcolest-8-en3β-ol↓		

Sin embargo, no se tienen reportes sobre la posible regulación de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas por esfingolípidos.

Los esfingolípidos son una clase de lípidos ubicua que está presente tanto en organismos eucariontes como en bacterias (revisado en Sperling y Heinz, 2003; Lynch y Dunn, 2004; Merrill *et al.*, 2007; Merril *et al.*, 2009; Spiegel y Milstien, 2003; Hannun y Obeid, 2008; Pruett *et al.*, 2008). Sólo en *Arabidopsis* se ha descrito que hay cerca de 168 esfingolípidos distintos (Markham y Jaworski, 2007). Los esfingolípidos se han revelado recientemente como elementos clave en las cascadas de transducción de señales que regulan procesos importantes de la fisiología celular como crecimiento, diferenciación y muerte celular (Chen *et al.*, 2006; Dietrich *et al.*, 2008; Pata *et al.*, 2010). Tienen doble papel como moléculas bioactivas: por un lado, actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, y por otro lado, regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las

membranas llamados balsas lipídicas (Mongrand *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2006; Sánchez y Díaz-Laviada, 2006; Lefebvre *et al.*, 2007)

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo estudios modificando la cantidad o la calidad de esfingolípidos en la membrana plasmática y luego se ha estudiado su efecto en diferentes funciones membranales, incluyendo la actividad de enzimas como la ATPasa de H<sup>+</sup>. Para ello se han utilizado enfoques bioquímicos en plantas genéticamente modificadas.

1. Determinación de la actividad de ATPasa de vesículas de membrana plasmática de líneas de *Arabidopsis thaliana* con diferente contenido de esfingolípidos

En particular, este trabajo de tesis se ha enfocado en la caracterización cinética de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en preparaciones purificadas de estas membranas que fueron obtenidas de plantas mutantes de Arabidopsis. Por ello se utilizaron varias líneas que funcionaron como controles de la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a, que es la que no expresa la actividad de la primera enzima de la síntesis de esfingolípidos (SPT), gracias a un silenciamiento génico de la subunidad LCB2b y a la mutación de inserción en el gene de la subunidad LCB2a, con lo que las dos formas posibles de la enzima quedan anuladas (Dietrich et al., 2008). Estas plantas presentan una disminución del 36% en la cantidad de bases de cadena larga totales, lo cual es un reflejo de la cantidad de esfingolípidos complejos, ya que cada molécula de esfingolípidos complejos está formada de una base de cadena larga, un ácido graso y una cabeza polar. Los esfingolípidos complejos son los esfingolípidos más abundantes en la membrana plasmática, y las ceramidas y las bases de cadena larga libres que son sus precursores están en baja cantidad en células vegetales (Markham et al., 2006). Estas plantas presentan el silenciamiento génico de la subunidad LCB2b solamente cuando es aplicado un inductor y en estas condiciones, las vesículas de membrana plasmática son obtenidas de las plantas. En estos estudios se requieren de preparaciones de vesículas de membrana plasmática que son obtenidas de varias líneas de Arabidopsis que fungen como controles y que son la línea silvestre, la cual es la progenitora de la línea Atlcb2a-1 y la cual a su vez lo es de la línea silenciable, la Atlcb2b hp/Atlcb2a. Los controles incluyen las preparaciones de las hojas de plantas de estas líneas expuestas o no a la metoxifenazida.

Anteriormente, se había observado que las membranas plasmáticas purificadas de las hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida, mostraban un aumento del 40% en su actividad con respecto a la línea silvestre (Vázquez-Vázquez *et al.*, 2007). En el presente trabajo de tesis, las condiciones de medición de actividad de la enzima fueron optimizadas y entonces el aumento de la actividad en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 7 dpi alcanzó un valor del 49% con respecto a la

línea silvestre. Estos experimentos fueron realizados con vesículas de membrana plasmática de 3 purificaciones independientes y cuatro ensavos de hidrólisis de ATP por triplicado, por lo que son representativos y confiables en el análisis. Las actividades de ATPasas de H<sup>+</sup> en nuestras preparaciones estuvieron en un intervalo de 120 a 170 nmol Pi min<sup>-1</sup> mo<sup>-1</sup> en las líneas controles analizadas, mientras que en la línea con menor contenido de esfingolípidos la actividad fue de 253 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Figura 14). Al comparar estos valores con los de la actividad de la enzima en membranas plasmáticas de otras especies, los valores están cercanos a los reportados, pues encontramos que en levaduras se han reportado valores de actividad de 540 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Alexandre *et al.*, 1996) y también de 2500 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Dambly and Boutry, 2001), mientras que en hojas de maíz se obtuvieron valores de 203 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Perlin y Spanswick, 1981). Por otra parte se ha reportado que la isoforma AHA2 expresada en levadura tiene una actividad de 330 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. Hay que mencionar que estos valores pueden ser influenciados por las condiciones de medición de la reacción de hidrólisis de ATP, por ejemplo la concentración de ATP y el pH, factores que modifican la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (Bennett et al., 1985; Du Pont et al., 1981) Además de que la velocidad o actividad enzimática depende de la cantidad de enzima en la membrana plasmática y que aún en la misma planta puede cambiar durante el desarrollo o por el tipo de tejido (Nelson y Cox, 2006). Desafortunadamente, además de los reportes en los que se han descrito algunas constantes cinéticas en Arabidopsis (ver adelante), no existen preparaciones de membrana plasmática en las que se haya descrito la caracterización de la actividad de hidrólisis de ATP de esta enzima. La mayoría de los trabajos publicados están enfocados a la expresión de genes y fenotipos producidos y en algunos casos, modificación post-traduccional de la proteína.

### 2. Determinación de la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP

Para encontrar las posibles diferencias en las constantes cinéticas, este estudio incluyó además de la línea que expresó progresivamente un menor contenido de esfingolípidos *(línea Atlcb2b hp/Atlcb2a)* a las tres líneas controles: la línea *Atlcb2 hp/Atlcb2a* sin exposición al inductor ya que al no ser inducida presenta cantidades normales de esfingolípidos; la línea *Atlcb2a-1* que fue utilizada como fondo genético en el diseño de la línea inducible; y por último la línea Silvestre como control general de todas las líneas. Las concentraciones de ATP-Mg que se evaluaron abarcaron el intervalo de 0.2 mM a 10 mM en todas las líneas. Las concentraciones incluidas son razonables ya que permitieron medir la velocidad de la reacción de hidrólisis de ATP tanto en la parte de velocidades iniciales, con bajas concentraciones de ATP-Mg, en la que se presenta una relación lineal entre la concentración de sustrato y la velocidad, como en la

parte de saturación de la enzima por su sustrato, la cual se alcanzó alrededor de 6 mM. De esta manera todas las curvas obtenidas presentaron 10 mM como valor máximo de concentración de sustrato, sin embargo en las Figuras 16, 17 y 18, el valor máximo utilizado de concentración de ATP-Mg fue de 8 mM, ya que a 10 mM se presentaba el fenómeno de inhibición por producto lo cual no permitía un análisis estadístico confiable. Este efecto se presentó en los casos de actividad más alta, en la que los productos, en particular el ADP, se acumulan en el medio, alcanzando concentraciones que llegan a inhibir a la enzima (Bennett *et al.*, 1985). Sin embargo lo anterior no fue un impedimento para medir adecuadamente la reacción, pues una o dos concentraciones menores a 10 mM ya ilustraban la fase de saturación.

Los experimentos que sustentaron la obtención de los patrones cinéticos fueron diseñados de manera que las determinaciones individuales tuvieran un número elevado de réplicas y que éstas se hicieran con al menos 2 preparaciones de membranas aisladas de manera independiente. De esta forma, se realizaron entre 6 y 11 réplicas y se usaron entre 2 y 4 preparaciones membranales para cada caso. Lo anterior derivó en resultados con una baja dispersión aunada a una buena reproducibilidad obtenida por un adecuado manejo experimental del sistema. Estos factores fueron fundamentales para hacer un análisis robusto de los resultados, mismo que les dieron confiabilidad. Otro factor que contribuyó a obtener buenos resultados fue el tratamiento de los datos basado en programas de software especializados, lo cual permitió delinear patrones cinéticos usando consideraciones objetivas.

La gran mayoría de los reportes de la literatura han descrito que esta enzima tiene un comportamiento cinético michaeliano o hiperbólico (Palmgren y Christensen, 1994; Monteiro y Sá-Correia, 1998), pero algunos otros han determinado cinéticas cooperativas o sigmoidales (Roberts *et al.*, 1995). Debido a lo anterior, se tuvo especial cuidado en analizar los datos cinéticos obtenidos tanto bajo el modelo descrito por la cinética hiperbólica como por la sigmoidal. En el análisis de los patrones cinéticos de la enzima, se observó que el comportamiento de las curvas experimentales cumplía favorablemente un ajuste michaeliano. Esto se reveló en todas las líneas analizadas, si bien en la línea silvestre se observó una pequeña diferencia entre los ajustes realizados, pero posteriormente se determinó que también tenía un comportamiento michaeliano. Lo anterior pudo establecerse ya que los ajustes realizados con la ecuación hiperbólica tuvieron un coeficiente de correlación en un intervalo de 0.9845 a 0.9974, mientras que con el ajuste realizado con la ecuación de Hill se encontró que el valor de n era de 1 y que por lo tanto la enzima no presentaba cooperatividad, ni positiva ni negativa. El coeficiente de correlación para el ajuste a la ecuación del Modelo de Hill también fue muy alto en todos los casos analizados (de 0.9824 a 0.9968).

Cuando se calcularon los valores de  $V_{max}$  con el ajuste michaeliano, se obtuvieron valores muy semejantes entre sí para las líneas controles silvestre, Atlcb2a-1 y Atlcb2b hp/Atlcb2a sin inductor. Estos valores estuvieron en el intervalo de 168 a 223 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> que son comparables a los reportados en la literatura, como los de la actividad de las isoformas AHA1, AHA2 y AHA3, que al ser expresadas en levadura y posteriormente purificadas, presentaron valores de  $V_{max}$  en un intervalo de 112 a 210 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Palmgren y Christensen, 1994), pero que fueron menores a los valores de V<sub>max</sub> de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de otras especias reportadas y que están en un intervalo muy amplio, de 342 a 833 nmolPimin<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (O'Neil y Spanswick, 1984a; Blum et al., 1988; Pedchenko et al., 1990; Lanfermeijer and Prins, 1994; Roberts *et al.*, 1995). Sin embargo, el valor determinado para la  $V_{max}$  de la línea con menor contenido de esfingolípidos (Atlcb2 hp/Atlcb2a, en presencia de metoxifenazida) fue 315.94 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, lo que indica un incremento del 58%, comparado con el valor de  $V_{max}$ determinado en las otras líneas. Este aumento puede tener dos explicaciones: puede deberse a un aumento en la cantidad de la enzima en la membrana o puede deberse a un aumento en la velocidad de la catálisis de la enzima. Con respecto a la primera posibilidad, experimentos recientes de inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> han demostrado que la cantidad de ATPasa de H<sup>+</sup> presente en la membrana plasmática es similar en todas las líneas de Arabidopsis thaliana con y sin inductor (Carmona-Salazar, 2010). Por lo tanto, la reducción del contenido de esfingolípidos en la línea Atlcb2 hp/Atlcb2a afecta la actividad de esta enzima membranal aumentando su velocidad de catálisis.

En cuanto al valor de la  $K_m$ , éste no fue diferente en ninguna de las líneas de *Arabidopsis thaliana* analizadas: ni en la silvestre, ni en la mutante, ni en la mutante silenciable, tanto en condiciones de inducción o control. El valor determinado en todas las líneas estuvo en un intervalo de 1.07 a 2.06 mM para ATP, lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura, que describe valores de 0.15 a 2.44 mM para ATP (Du Pont y Leonard, 1980; Perlin y Spanswick, 1981; Palmgren y Christensen, 1984; De Michelis y Spanswick, 1986; Kawata y Yoshida, 1988; Ramos *et al.*, 1994; Briskin *et al.*, 1995; Baunsgaard *et al.*, 1996; Lanfermeijer *et al.*, 1998; Wu y Seliskar, 1998; Maudoux *et al.*, 2000; Morsomme y Boutry, 2000; Fuglsang *et al.*, 2007). En particular, el bajo valor de  $K_m$  de 0.15 mM pudo ser determinado por marcaje isotópico del ATP, que es una técnica muy sensible. En el caso de la presente tesis, el método colorimétrico usado fue muy adecuado, lo que se puede corroborar por las determinaciones cinéticas obtenidas. El valor similar de la  $K_m$  entre las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas y en particular en la línea que presenta menor contenido de esfingolípidos, muestra que la enzima tuvo la misma afinidad por su sustrato, ATP-Mg, sugiriendo que la modificación en el ambiente

lipídico de la enzima no afectó el sitio de reconocimiento al sustrato. Este resultado es muy interesante al ser comparado con el de la  $V_{max}$ , que sí aumentó, planteando un modelo en el que la enzima cataliza más rápido la reacción sin que el reconocimiento del sustrato se vea más favorecido.

Por otra parte, al analizar el parámetro de la eficiencia catalítica de la enzima, calculada con los parámetros obtenidos del ajuste michaeliano, se hizo evidente el aumento de este valor en la línea con menor contenido de esfingolípidos, lo cual indica que la enzima esta catalizando la hidrólisis de más moléculas de ATP en el tiempo; desgraciadamente no podemos obtener el valor del número de recambio (número de reacciones efectuadas por sitio catalítico por segundo), lo cual es una función más precisa para establecer la eficiencia de la enzima, ya que para ésto se requiere saber la cantidad de moléculas de enzima añadida en el ensayo de actividad. A pesar de que las vesículas de membrana plasmática utilizadas tienen un valor alto de purificación (medido por sensibilidad a Vanadato) resulta imposible determinar la cantidad de moléculas de ATPasa de H<sup>+</sup> presente en la muestra, ya que las membranas contienen una gran diversidad de otras moléculas.

Adicionalmente, el hecho de que la I<sub>50</sub> para vanadato determinada haya sido la misma en todas las líneas, incluyendo a la línea Atlcb2 hp/Atlcb2a, implica que el vanadato, que es un inhibidor competitivo del sustrato en la reacción de hidrólisis de ATP (Bowman y Slayman, 1979; Coccuci et al., 1980; Colombo et al., 1981; Sze, 1983; O'Neil y Spanswick, 1984a),, fue reconocido en el sitio catalítico con la misma afinidad por la enzima de cualquiera de las líneas de Arabidopsis, implicando que los niveles de esfingolípidos no afectaron la estructura del sitio catalítico, por lo menos en cuanto al reconocimiento del vanadato o del sustrato. Hubiera sido conveniente obtener la K<sub>d</sub> o constante de disociación para el vanadato para tener más información sobre las características de la interacción del vanadato con el sitio catalítico. Desafortunadamente, los valores obtenidos no pudieron ser analizados por el programa específico, ya que el valor de la I<sub>50</sub> a 0.5 mM de ATP-Mg es mucho mayor a los otros dos resultados obtenidos. Al ser este valor el único determinado a una concentración de susutrato menor a la K<sub>m</sub> de la enzima, no podemos tener la certeza de que el resultado sea confiable, ya que los valores de  $I_{50}$ determinados en la literatura se evaluaron en concentraciones de ATP-Mg mayores a la Km (Perlin y Spanswick, 1981). No obstante, el valor de I<sub>50</sub> para vanadato en todas las líneas respalda el resultado de  $K_m$  sobre la afinidad por el ATP.

DISCUSIÓN

3. Reconstitución de las vesículas membranales con esfingolípidos exógenos

Como fue descrito por Dietrich *et al.* (2008), la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* muestra una disminución del 36% en las bases de cadena larga totales. Este contenido de bases de cadena larga fue determinado a partir de una preparación de plantas adultas completas a las cuales se les realizó una extracción selectiva y optimizada de esfingolípidos complejos (Markham *et al.*, 2006; Markham y Jaworsky, 2007) y a las que se les hizo una hidrólisis alcalina drástica para liberar las bases de cadena larga (cuya estequiometría es 1 mol de la base por mol de esfingolípido complejo). Esta extracción se hizo de las plantas completas, por lo que no se estableció cual era la disminución de los esfingolípidos complejos en las membranas celulares y menos en la membrana plasmática, si bien, por su naturaleza anfipática, es presumible que casi la totalidad de los esfingolípidos complejos deben estar formando parte de membranas. Desafortunadamente, este dato no existe en la literatura.

Para apoyar la propuesta de que los cambios cinéticos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática estaban provocados por un cambio en la cantidad o en la calidad de esfingolípidos presentes en la membrana, se realizó un conjunto de experimentos de reconstitución. La idea detrás de estos experimentos era que si las membranas plasmáticas de la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a tenían una ATPasa de H<sup>+</sup> con una actividad incrementada debido a que esas membranas eran deficientes en esfingolípidos complejos, entonces, al serles reconstituídos estos esfingolípidos de manera exógena, la actividad de la enzima en las membranas se recuperaría. Bajo este planteamiento se hicieron experimentos de reconstitución con dos fuentes de esfingolípidos: una, constituida por una fracción de esfingolípidos endógenos extraídos de la membrana plasmática de la línea silvestre y otra por una preparación comercial de glucosilceramida, uno de los esfingolípidos más abundantes en plantas (Yoshida y Uemura, 1986; Lynch y Steponkus, 1987; Sperling et al., 2005; Markham et al., 2006). Los resultados indican que en la línea control, la Atlcb2a-1, la incubación con la fracción de esfingolípidos o glucosilceramida no modificó la actividad de la enzima; mientras que en la línea Atlcb2b hp/Atlcb2a 7 dpi, al aumentar la cantidad de los esfingolípidos exógenos, la actividad se acercó al valor de la línea control utilizada. Estos resultados sugieren fuertemente que el aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea mutante silenciable, se debió efectivamente a la reducción en la cantidad o en la calidad de esfingolípidos presentes en la membrana, por ello, al reponer estos esfingolípidos, la línea silenciable recuperó los niveles de actividad característicos de la línea control, misma que contiene valores normales de esfingolípidos.

En la Figura 24 se presenta un modelo que trata de describir e interpretar los resultados obtenidos en esta tesis. En él se propone que los esfingolípidos membranales están en contacto con la ATPasa de H<sup>+</sup> y esta interacción tiene influencia en la conformación de la enzima, de tal manera que en la enzima silvestre los niveles de esfingolípidos mantienen a la enzima en un estado de actividad "moderada", y cuando el contenido de los esfingolípidos endógenos se reducen (línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida), la enzima deja su conformación "apretada", y se vuelve más activa. En este contexto, los esfingolípidos podrían estar siendo fundamentales en la expresión del poder catalítico de la enzima, constituyendo factores importantes en su regulación. El modelo es especialmente atractivo a la luz de los recientes estudios que ubican a la ATPasa de H<sup>+</sup> en microdominios membranales enriquecidos en esfingolípidos. Resulta tentador proponer que una de las razones por la que esta enzima migra de la membrana a estos microdominios es para controlar su nivel de actividad catalítica.

De cualquier manera, el hecho de que los esfingolípidos membranales estuvieran promoviendo un rígido control sobre la actividad de la enzima, les da mucho valor en términos fisiológicos, ya que su acción permitiría la activación de la proteína por otros factores celulares. 4. Modelo



Figura 24. Modelo del efecto de los esfingolípidos sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en *A. thaliana*. **A** Condiciones normales de contenido esfingoideo, la actividad de la ATPasa presenta los niveles moderados que se observaron en las líneas controles. **B** Línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, en la cual los esfingolípidos complejos están disminuidos en un 36%, lo cual provoca un aumento en la actividad de hidrólisis de ATP. La reducción de esfingolípidos complejos en la membrana puede modificar la conformación catalítica de la enzima, permitiendo una mayor movilidad que se expresa en un aumento en su  $V_{max}$ .

# IX. RESUMEN DE RESULTADOS

Se encontró un aumento del 49% en la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7dpi, la cual tiene una disminución del 36% en el contenido de bases de cadena larga totales.

Éste aumento se explica por el cambio del parámetro cinético  $V_{max}$ , ya que su valor aumenta en promedio 58% con respecto a los controles utilizados. De igual forma, éste aumento de  $V_{max}$  modifica el valor de la eficiencia catalítica, haciendo que ésta aumente 58% en la línea con menor contenido de esfingolípidos.

El valor de la  $K_m$  en todas las líneas utilizadas fue similar y el valor de la  $I_{50}$  tuvo el mismo comportamiento, sugiriendo que el cambio en la cantidad o calidad de esfingolípidos no modificó el sitio de reconocimiento al ATP o al vanadato.

La adición de esfingolípidos exógenos a las membranas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7dpi produjo una disminución de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, hasta niveles de la actividad de las líneas controles. Este resultado sugiere que el aumento en la actividad de la enzima en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* 7dpi, se debe a la disminución en los esfingolípidos membranales.

## X. CONCLUSIONES

De acuerdo con la hipótesis el aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de una línea de *Arabidopsis* con menor contenido de esfingolípidos se puede explicar a un aumento en el parámetro cinético  $V_{max}$ , según el análisis de las determinaciones cinéticas realizadas; sin embargo no se observaron cambios en el parámetro cinético  $K_m$ .

Los esfingolípidos de la membrana plasmática ejercen un efecto regulatorio de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, ya que al ser disminuidos en una línea de Arabidopsis genéticamente modificada se observó un aumento en la actividad de la enzima, misma que se restituyó después de una reconstitución con esfingolípidos exógenos.

## XI. PERSPECTIVAS

Determinar los niveles de esfingolípidos en la membrana plasmática de las líneas de *Arabidopsis thaliana*: Silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con y sin exposición al inductor para determinar qué esfingolípidos se modificaron y provocaron el cambio de actividad.

Purificar la enzima, determinar el número de recambio y posteriormente controlar el tipo y la cantidad de esfingolípidos para observar el comportamiento de dicho parámetro.

Caracterizar el comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP cambiando el pH del medio de reacción.

Medir la actividad de la enzima mediante el bombeo de protones a través de la membrana.

Determinar la interacción esfingolípido-proteína mediante diversos estudios que incluyan el uso de modificadores químicos de unión covalente (Haberkant *et al.*, 2008; Haberkant y van Meer, 2009).

## XII. BIBLIOGRAFÍA

Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P (2004) *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. Plant Cell Physiol **45**: 1543-1556.

**Alexandre H, Mathieu B, Charpentier C** (1996) Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. Microbiology **142**: 469-475.

Alsterfjord M, Sehnke PC, Arkell A, Larsson H, Svennelid F, Rosenquist M, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C (2004) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H<sup>+</sup>-ATPase interaction. Plant Cell Physiol **45**: 1202-1210.

**Anthon G, Spanswick RM** (1986) Purification and properties of the H<sup>+</sup>-translocating ATPase from the plasma membrane of tomato roots. Plant Physiol **81:** 1080-1085.

**Arora R, Palta JP** (1991) A Loss in the plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and postthaw recovery in onion bulb scale tissue. Plant Physiol **81:** 1080-1085.

**Ayres PG, Jones P** (1975) Increased transpiration and the accumulation of root absorbed <sup>86</sup>Rb in barley leaves infected by *Rhynchosporium secalis* (leaf blotch).Physiol Plant Pathol **7:** 49-58.

**Baunsgaard L, Venema K, Axelsen KB, Villalba JM, Welling A, Wollenweber B, Palmgren MG** (1996) Modified plant plasma membrane H+-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. Plant J **10:** 451-458.

**Baxter IR, Young JC, Armstrong G, Foster N, Peer WA, Murphy AS, Harper JF** (2005) A plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is required for the formation of proanthocyanidis in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA **7:** 2649-2654.

Blein JP, Bourdil I, Rossignol M, Scalla R (1988) *Cercospora beticola* toxin inhibits vanadatesensitive H<sup>+</sup> transport in corn root membrane vesicles. Plant Physiol **88:** 429-434.

Bloch KE (1983) Sterol structure and membrane function. CRC Crit Rev Biochem 14: 47-92.

**Blum W, Key G, Weiler EW** (1988) ATPase activity of plasmalemma-rich vesicles obtained by aqueous two-phase partitioning from *Vicia faba mesophyll* and epidermis: characterization and influence of abscisic acid and fusicoccin. Physiol Plant **72**: 279-287
Borner GHH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, MacAskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. Plant Physiol **137**: 104-116.

**Bennett AB, O'Neil SD, Eilmann M, Spanswick RM** (1985) H<sup>+</sup>-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. III. Modulation of ATPase activity by reaction substrates and product. Plant Physiol **78**: 495-499.

**Bowman BJ, Slayman CW** (1979) The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. J Biol Chem **254**: 2928-2934.

**Brasitus TA** (1983) Lipid dynamics and protein-lipid interactions in rat colonic epithelial cell basolateral membranes. Biochim Biophys Acta **728**: 20-30.

**Brauer D, Tu SI** (1989) Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. Plant Physiol **89:** 867-874.

**Briskin DP, Poole RJ** (1983) Evidence for a  $\beta$ -aspartyl phosphate residue in the phosphorylated intermediate of the red beet plasma membrane ATPase. Plant Physiol **72**: 1133-1135.

**Briskin DP, Thornely WR, Rotti-Rotti JL** (1985) Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. Plant Physiol **78:** 642-644.

**Briskin DP, Leonard RT, Hodges TK** (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. Methods Ensymol. **148:** 542-568.

**Briskin DP, 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

**Briskin DP, Basu S, Assmann SM** (1995) Characterization of the red beet plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase reconstituted in a planar bilayer system. Plant Physiol **108**: 393-398.

Carmona-Salazar L (2010) No publicado

**Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB** (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the identification and functional characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. Plant Cell, **18**: 3576–3593.

**Cocucci MC, Ballarin-Denti A, Marré MT** (1980) Effects of orthovanadate on H<sup>+</sup> secretion, K<sup>+</sup> uptake, electric potential difference and membrane ATPase activities of higher plant tissues. Plant Sci Lett **17:** 391-400.

**Coccuci MC, Marré E** (1984) Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate inhibited, Mg<sup>2+</sup>ATPase from radish microsomes. Biochim Biophys Acta **771:** 42-52.

**Colombo R, Bonetti A, Cerana R, Lado P** (1981) Effect of plasmalemma ATPase inhibitors, diethylstilbestrol and orthovanadate, on fusicoccin-induced H<sup>+</sup> extrusion in maize roots. Plant Sci Lett **21:** 305-315.

**Cooke DT, Burden RS, James CS, Seco T, Sierra B** (1994) Influence of sterol on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. Plant Physiol Biochem **32**: 769-773.

Cosgrove DJ (2003) How do plant cell walls extend?. Plant Physiol 102: 1-6.

**Dambly S, Boutry M** (2001) The two major plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases display different regulatory properties. J Biol Chem **276**: 7017-7022.

**DeWitt ND, Harper JF, Sussman MR** (1991) Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. Plant J **1**: 121-128.

**DeMichelis MI, Spanswick RM** (1986) H<sup>+</sup>-Pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. Plant Physiol **81**: 542-547.

**Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM, Cahoon EB** (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.

**Duby G, Boutry M** (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. Eur J Physiol **457**: 645-655.

**Du-Pont M**, **Leonard RT** (1980) Solubilization and partial purification of the adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. Plant Physiol **65**: 931-938.

**Du Pont FM, Burke LL, Spanswick RM** (1981) Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. Plant Physiol **67:** 59-63.

**Frías I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeíra JR, Navarro-Aviñó JP, Culiañez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R** (1996) A mayor isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. Plant Cell **8:** 1533-1544.

**Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS, Palmgren MG, Zhu JK** (2007) *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. Pant Cell **19:** 1617-1634.

**Gavilanes-Ruíz M, Sánchez-Nieto S, Enriquez-Arredondo MC, García-Rubio O** (1995) Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales. Ciencia **46:** 251-262.

Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007) Plant proton pumps. FEBS Lett 581: 2204-2214. **Giannini JL, Gildensoph LH, Briskin D** (1987) Selective production of sealed plasma membrane vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. Arch Biochem Biophys **254**: 621-630.

**Gibrat, R, Grouzis JP, Rigaud J, Galtier N, Grignon C** (1989) Electrostatic analysis of effects of ions on the inhibition of corn root plasma membrane Mg<sup>2+</sup>-ATPase by the bivalent orthovanadate. Biochim Biophys Acta **979:** 46-52.

**Gomès E, Venema K, Simon-Plas F, Milat ML, Palmgren MG, Blein JP** (1996) Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme?. FEBS **398:** 48-52.

**González-Romo P, Sánchez-Nieto S, Gavilanes-Ruíz M** (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. Anal Biochem **200:** 235-238.

Gouaux E, White SH (2001) Lipids lost, lipids regained. Struc. Biol 11: 393-396.

**Grandmougin A, Benveniste P, Hartmann MA** (1989a) Effect of sterols on reconstituted plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from maize roots. In Plant Membrane Transport: The Current Position (J Dainity, MI de Michelis, E Marrè, F Rasi-Caldongo, eds) Elsevier Amsterdam ISBN 0-444-81328-4: 113-114.

**Grandmougin A, Benveniste P, Hartmann MA** (1989b) Plasma membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPase from maize roots cells: Effects of sterols. In Plant Membrane Transport: The Current Position (J Dainity, MI de Michelis, E Marrè, F Rasi-Caldongo, eds) Elsevier Amsterdam ISBN 0-444-81328-4: 11-112.

**Grandmougin-Ferjani A, Schuller-Muller I, Hartmann MA** (1997) Sterol modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPAse activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. Plant Physiol **113**: 163-174.

**Grouzis JP, Gibrat R, Rigaud J, Grignon C** (1987) Study of sidedness and tightness to H<sup>+</sup> or corn root plasmalemma vesicles: preparation of a fraction enriched in inside-out vesicles. Biochim Biophys Acta. **903**: 449-464.

**Gutiérrez-Nájera N,** (2005) Interacción de la Fumonisina B1 con la membrana plasmática: Efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado. Facultad de Química UNAM.

**Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M** (2005) Fumonisin B<sub>1</sub>, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Planta **221:** 589-596. Haberkant P, Schmitt O, Contreras FJ, Thiele C, Hanada K, Sprong H, Rehinard C, Wieland FT, Brügger B (2008) Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. Lipid Research J **49**: 251-262.

Haberkant P, van Meer G (2009) Protein-lipid interactions: paparazzi hunting for snap-shots. Biol Chem **390:** 795-803.

**Hannun YA, Obeid LM** (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nature Reviews – Molecular Cell Biology **9:** 139–150.

Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barret-Wilt G, Kline KG, Mohsin SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR (2010) Molecular Characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. J Biol Chem **285**: 17918-17929.

Hartmann MA, Benveniste P (1987) Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis. Methods Enzymol 148: 632-650

Harwood JL (1989) Trans-bilayer lipid interactions. Trends Biochem Sci 14: 2-4.

**Houlne G, Boutry M** (1994) Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase whose expression is restricted to another tissue. Plant J **5**: 311-317.

**Imbrie CW, Murphy TM** (1984) Proton pumping by vesicles reconstituted from two fractions of solubilized rose-cell plasma membrane ATPase. Biochim Biophys Acta **778**: 229-232.

Jahn T, Fuglsand AT, Olsson A, Bruntrup IM, Collinge DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG, Larsson C (1997) The 14-3-3 protein interacts directly with the C terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Plant Cell **9:** 1805-1814.

Johannsson A, Keightley CA, Smith GA, Richards CD, Hesketh TR, Metcalf JC (1981) The effect of bilayer thickness and n-alkanes on the activity of the Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem **256**: 1643-1650.

**Kanczewka J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud JL, Boutry M** (2005) Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. Proc Nat Acad Sci USA **102**: 11675-11680.

**Kasamo K** (2003) Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity by the membrane environment. J Plant Res **116**: 517-523.

**Kawata T, Yoshida S** (1988) Characterization of ATPases associated with various cellular membranes isolated from etiolated hypocotyls of *Vigna radiate* (L) Wilczek. Plant and Cell Physiol **29:** 1399-1410.

**Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX** (2009) Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-cyclodextrin and quantitative proteomics. Mol Cell Proteomics **8**: 612-623.

Lanfermeijer FC, Prins HBA (1994) Modulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity by fusicoccin in Plasma Membrane Vesicles from Oat (*Avena sativa L.*) Roots (A Comparison of Modulation by Fusicoccin, Trypsin, and Lysophosphatidylcholine). Plant Physiol **104:** 127-1285.

**Lanfermeijer FC, Venema K, Palmgren MG** (1998) Purification of a histidine-tagged plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in yeast. Protein expression and purification **12:** 29-37.

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, 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.

**Larsson C, Møller IM, Widell S** (1990) Introduction to the plant plasma membrane. Its molecular composition and organization. In The Plant Plasma membrane Structure, Function and Molecular Biology (C Larsson, IM Møller, eds) Springer-Verlag, Berlin. ISBN **3-540-50836-8**: 1-15.

**Larsson C, Sommarin M, Widell S** (1994) Isolation of highly purified plant plasma membrane separation of inside-out and right-side-out vesicles. Methods Enzymol. **228:** 451-469.

Lee MCS, Hemamoto S, Schekman R (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. J Biol Chem **227:** 22395-22401.

Lefebvre B, Furt F, Hartmann M-A, Michaelson LV, Carde J-P, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule J-J, 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.

**Lynch DV, Dunn TM** (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. New Phytologist **161**: 677–702.

Lynch DV, Steponkus PL (1987) Plasma membrane lipids alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale L.* cv Puma) Plant Physiol **83**: 761-767.

**Macri F, Vianello A, Cerana R, Rasi-Caldongo F** (1980) Effects of *Cercospora beticola* toxin on ATP level of maize roots and on the phosphorylating activity of isolated pea mitochondria. Plant Sci Lett **18:** 207-214.

Markham JE, Li J, Cahoon EB Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. J Biol Chem **281**: 22684-22694.

**Markham JE, Jaworsky JG** (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

Marré E, Colombo R, Lado P, Rasi-Caldongo F (1974) Correlation between cell enlargement in pea internode segments and decrease in the pH of the medium of incubation. I. Effects of fusicoccin, natural and synthetic auxins and mannitol. Plant Sci Lett **2**: 139-150.

**Maudoux O, Batoko H, Oecking C, Gevaert K, Vandekerckhove J, Boutry M, Morsomme P** (2000) A plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. J Biol Chem **275:** 17762-17770.

Merrill AH Jr, Wang MD, Park M, Sullards MC (2007) (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology. Trends in Biochemical Sciences **32**: 457–468.

Merrill AH Jr, Stokes TH, Momin A, Park H, Portz BJ, Kelly S, Wang E, Sullards MC, Wang D (2009) Sphingolipidomics : a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease. Journal of Lipid Research **50**: S97–S102.

**Michelet B, Boutry M** (1995) The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. Plant Physiol **108:** 1-6.

Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y, Uemura M (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. Plant Cell Physiol **50**: 341-359.

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J-P, Hartmann M-A, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J-J (2004) Lipid rafts in higher plant cells. J Biol Chem 279: 36277-36286.

**Monteiro GA, Sá-Correia** (1998) In vivo activation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. Biochim Biophys Acta Mar **1370**: 310-6

Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule J-J, Blein J-P, Simon-Plas F (2006) Proteomics of plant detergent resistant membranes. Mol. Cell. Proteomics 5: 1396-1411.

**Morsomme P, Boutry M** (2000) The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. Biochim Biophys Acta **1465**: 1-16

Nelson DL, Cox MM (2006) Lehninger Principios de Bioquímica. 4ta. Edición. Pág. 374.

Niu X, Narasimhan ML, Salzman RA, Bressan RA, Hasegawa PM (1993) NaCl-Induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression. Plant Physiol **103**: 713-718.

Nüse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2003) Large-scale analysis of *in vivo* phosphorylated membrane proteins by inmovilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. Mol Cell Proteomics **2**: 1234-1243.

Nüse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2004) Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database. Plant Cell **16:** 2394-2405.

**O'Neill S, Spanswick RM** (1984a) Characterization of native and reconstituted plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from the plasma membrane of *Beta vulgaris*. J Membr Biol **79:** 245-256.

**O'Neill S, Spanswick RM** (1984b) Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. Plant Physiol **75**: 586-591.

**O'Sullivan WJ, Smithers GW** (1979) Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. Methods Enzymol. **63:**294-336.

**Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskov P, Josgensen PL** (1988) Modulation of plasmamembrane H<sup>+</sup>-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty-acids and phospholipase A<sub>2</sub>. Physiol Plant **74:** 11-19.

**Palmgren MG** (1991) Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. Plant Physiol **83**: 314-323.

**Palmgren MG, Chistensen G** (1994) Functional comparisons between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms expressed in yeast. J Biol Chem **269**: 3027-3033.

**Palmgren MG** (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **52:** 817-845.

**Palta JP** (1989) Plasma membrane ATPase as a key site of perturbation in response to freezethaw stress. Curr Top Plant Biochem Physiol **8:** 41-68.

**Pata MO, Hannun YA, Ng CK-Y** (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. New Phytol, **185:** 611–630.

**Pedchenko VK, Nasirova GF, Palladina TA** (1990) Lysophosphatidycholine specifically stimulates plasma membrane H+-ATPase from corn roots. FEBS Lett **275:** 205-208.

Pedersen BP, Buch-Pedersen M, Morth P, Palmgren MG, Nissen P (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. Nature **450:** 1111-1115.

**Pedersen PL, Carafoli E** (1987) Ion motive ATPases. Ubiquity, properties, and significance to cell function. Trends Biochem Sci **12**: 146-150.

**Peterson GL** (1977) A simplification of the protein assay of Lowry *et al* wich is more generally applicable. Anal Biochem **83:** 346.

**Perlin DS, Spanswick RM** (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. Plant Physiol **68:** 521-526.

**Perez C, Badouin M, Ferrant V, Boutry M** (1992) Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. J Biol Chem **267:** 1204-1211.

**Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liotta DC, Merrill AH Jr** (2008) Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. Journal of Lipid Research **49:** 1621–1639.

**Ramos RS, Caldeira MT, Arruda P, de Meis L** (1994) The two Km's for ATP of corn-root H<sup>+</sup>-ATPase and the use of glucose-6-phosphate and hexokinase as an ATP-regenerating system. Plant Physiol **105**: 853-859.

**Reich JG, Wangermann G, Falk M, Rhode K** (1972) A general strategy for parameter estimation for isosteric and allosteric-kinetic data and binding measurements. Eur J Biochem **26**: 368-379.

**Robert G, BerberAlan G, Beaugé L** (1995) Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H<sup>+</sup>-ATPase from higher plants. Plant Physiol **108**: 813-819.

**Robert G, Beaugé L** (1997) Complex ATP-activation kinetics of plant H<sup>+</sup>-transporting ATPase may or may not require two substrate sites. Eur J Biochem **246:** 228-232.

**Roberts G, Berberián G, Beaugé L** (1995) Evidence of two catalytic sites in the functional unit of H<sup>+</sup>-ATPase from higher plants. Plant Physiol **108**: 813-819.

Sánchez AM, Díaz-Laviada I (2006) Papel de los esfingolípidos en la señalización celular. Dianas 1: 3-7.

**Sandstrom RP, Cleland RE** (1989a) Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes. Lack of short-term change in response to auxin. Plant Physiol **90**: 1207-1213.

**Sandstrom RP, Cleland RE** (1989b) Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Enrichment of sterols and activation of ATPase. Plant Physiol **90:** 1524-1531.

Sánchez-Nieto S, Rodríguez-Sotres R, González-Romo P, Bernal-Lugo I, Gavilanes-Ruíz M (1992) Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize lines of high or low vigour. Seed Sci Res 2: 105-111.

Sazuka T, Keta S, Shiratake K, Yamaki S, Shibata D (2004) A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* by peptide sequencing. DNA Res **11**: 101-113.

**Senn AP, Goldsmith MHM** (1998) Regulation of electrogenic proton pumping by auxin and fusicoccin as related to the growth of avena coleoptiles. Plant Physiol **88**: 131-138.

**Serrano R, Montesinos C, Sánchez J** (1988) Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. Plant Sci **56:** 117-122.

**Serrano R** (1990) The Plant Plasma Membrane (Larsson C and Moller IM eds) Springer-Verlag. Berlin ISBN **3-540-50836-8:** 127-153.

**Shahollari B, Peskan-Berghöfer T, Oelmüller R** (2004) Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. Physiol Plant **122**: 397-403.

Simmonds AC, East JM, Jones OT, Rooney EK, McWhirter J, Lee AG (1982) Annular and non-annular binding sites on the  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$  ATPase. Biochim Biophys Acta **693**: 398-406.

**Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG** (2004) Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Plant Physiol **136**: 2475-2482.

Sperling P, Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis,

first genes and functions. Biochimica et Biophysica Acta 1632: 1–15.

**Sperling P, Franke S, Lüthje S, Heinz E** (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membrane?. Pant Physiol and Biochem **43**: 1038-1038.

**Spiegel S, Milstien S** (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. Nature Reviews – Molecular Cell Biology **4:** 397–407.

**St. Marty, Bourdil FI, Rossignol M, Blein JP** (1988) Active vanadate-sensitive H<sup>+</sup> translocation in corn roots membrane vesicles and proteoliposomes. Plant Sci **54:** 177-184.

**Sterin-Speziale N, Leocata-Nieto F** (2007) Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular. Revista Química Viva **3:** 234-350.

**Sussman MR, Surowy TK** (1987) Physiology and molecular biology of membrane ATPases. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology **4**: 47-70.

**Susuky Y, Wang Y, Takemoto JY** (1992) Syringomycin-stimulated phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from red beet storage tissue. Plant Physiol **99:** 1314-1320.

**Sze H** (1983) H<sup>+</sup>-pumping ATPase in membrane vesicles of tobacco callus: sensitivity to vanadate and K<sup>+</sup>. Biochim Biophys Acta **732**: 586-594.

**Vara F, Serrano R** (1983) Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes. J Biol Chem **258**: 5334-5336.

Vázquez-Vázquez CA, Dietrich C, Cahoon EB, García-Cruz F, Enríquez-Arredondo MC, Gavilanes-Ruíz M (2007) *Arabidopsis* plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in conditions where the serine palmitoyltransferase is silenced. XII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Veracruz, México. Noviembre 11-15.

**Vitart V, Baxer I, Doerner P, Harper** JF (2001) Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the root endodermis. Plant J **27**: 191-201.

**Wevelsiep L, Rupping E, Knogge W** (1993) Stimulation of barley plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. Plant Physiol **101**: 297-301.

**Wu J, Seliskar DM** (1998) Salinity adaptation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the salt marsh plant *Spartina patens*: ATP hydrolisis and enzyme kinetics. J Exp Botany **49**: 1005-1013.

**Yeagle PL** (1983) Cholesterol modulation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. Biochim Biophys Acta **727:** 39-44.

Yeagle PL (1985) Cholesterol and the cell membrane. Biochim Biophys Acta 822: 267-287.

**Yoshida S, Uemura M** (1986) Lipid composition of plasma membrane and tonoplasts isolated from etiolated mung bean (*Vigna radiate L*.). Plant Physiol **82:** 808-812.

**Zhang L, Takemoto JY** (1987) Effects of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin, on plasma membrane functions of *Rhodotorula pilimanae*. Phytopatology **77**: 297-303.

## XIII. APÉNDICE

Medio de hidrólisis de ATP en condiciones de sustrato saturante

250 mM sacarosa

20 mM PIPES/BTP pH 6.5

7 mM CCCP

0.015% Brij 58

10 mM ATP

10 mM MgCl

Reactivos para la determinación de Pi

Reactivo B/C

Volúmenes iguales de las siguientes soluciones

12% ácido ascórbico en HCI 1N

2% molibdato de amonio en HCI 1N

Reactivo E

2% Ácido acético

2% Metarsenito de sodio

2% Citrato de sodio

Inhibidores utilizados (concentraciones finales)

0.2 mM Ortovanadato de sodio

50 mM Nitrato de potasio

2 mM Molibdato de sodio

2 mM Azida de sodio

Preparación de la solución de vanadato

Solución stock 0.2 mM de VO4<sup>3-</sup>

ATP-Mg	ATPHMg
(mM)	(mM)
0.2	0.1266
0.3	0.2079
0.4	0.2892
0.6	0.4518
0.8	0.6144
1	0.777
2	1.59
4	3.216
6	4.842
8	6.468
10	8.094

Tabla I. Equivalencia de la concentración de ATP-Mg añadida y la concentración de ATPHMg como sustrato de la reacción de hidrólisis de ATP (O'Sullivan and Smithers, 1979; Reich *et al.*, 1972)

## OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL DE HOJAS DE Arabidopsis thaliana.

Christian Vázquez, Laura Carmona. ABRIL 2010.

1. Se cosechan las hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* y se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su uso.

Se pesan las hojas todavía congeladas y después se vacían en una licuadora. Una vez vaciadas, a la licuadora también se añade el amortiguador de homogenización en una relación 1/3 (p/v) cuya composición se muestra en la Tabla 8.

3. Se homogeniza la mezcla por espacio de 15 segundos exactamente.

4. Se filtra el homogenado por 4 capas de gasa y se recibe el filtrado en un vaso de precipitados en hielo.

5. Se vierte en tubos de centrífuga.

6. Se centrifuga a 11,000 rpm en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4 °C durante 15 min.

7. Se toma el sobrenadante y se vierte en tubos para ultracentrífuga.

8. Se centrifuga el sobrenadante a (45,000 rpm en rotor 60 Ti Beckman) 200,000 g a 4 °C durante 80 min.

9. Una vez finalizada la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el botón se resuspende con un pincel fino en amortiguador de ajuste de peso cuya composición se muestra en la Tabla 9.

10. Una vez resuspendido el botón, se determina la cantidad de proteína por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977).

Tabla II. Composición de amortiguadores para la obtención y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz.

Amortiguador	Composición
	Sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, β-Mercaptoetanol 15
De homogenización	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 hecho en
	casa*
De ciucto de paso y	Sorbitol 620 mM, $KH_2PO_4$ 5 mM, pH 7.8, KCl 3.5 mM, DTT 1 mM y
De ajuste de peso y	EDTA 0.1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas Complete,
resuspension	Roche, 1.6 μg/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, 1.6 mg/mL

\* Para la preparación del cocktail de inhibidores hecho en casa, ver protocolo correspondiente.

B) Obtención de VMP de hojas de plantas adultas de Arabidopsis thaliana.

- Se cargan 3.3 mg de proteína microsomal a cada fase de acuerdo al método de partición de fases de polímeros acuosos (Briskin *et al.*, 1987; Larsson *et al.*, 1994).
- La composición de polímeros y de sales de la mezcla de fases se muestra en la Tabla 10.
- Una vez vertida la proteína a los tubos con la mezcla de fases, se mezcla por inversión 25 veces.
- 4. Se centrifuga a 4,000 rpm en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4 °C durante 15 min.
- 5. Terminada la centrifugación, se recupera la fase superior y se vierte en tubos de ultracentrífuga.
- Se centrifuga entonces a 200,000 g (45,000 rpm en rotor 60 Ti Beckman) a 4 °C durante 80 min.
- 7. Finalizada la centrifugación, se procede a decantar el sobrenadante.
- 8. El botón del fondo se resuspende con un pincel fino en amortiguador de lavado.
- 9. Se determina la cantidad de proteína por el método de Lowry modificado (Peterson 1977).

Tabla III. Composición de la mezcla de fases y del sistema de fases para la purificación de MP a partir de la fracción microsomal obtenida de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Reactivo	Mezcla de fases (concentración final)
Dextran *	6.2%
Peg	6.2%
Sorbitol	620 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH	E Mm
7.8	5 Mill
DTT	5 Mm
EDTA	0.1 Mm

\* Hay que determinar la concentración de Dextran con un refractómetro antes de preparar las mezclas de fases, de lo contrario, no saldrán las mezclas de fases.

El cálculo para saber la cantidad a pesar de Dextran en el tubo donde se realizaran las mezclas de fases, es como sigue:

(A) Valor de concentración reflejado en el refractómetro = 21 %

(B) Concentración final de Dextran en la mezcla de fase = 6.2 %

(C) Volumen final en la mezcla de fases = 4 mL

Cálculo: (B x C) / A

Cálculo: (6.2 % x 4 mL) / 21 % = 1.18 g de Dextran en esta mezcla de fases.

Nota: Para tener una buena purificación es crítico que el  $KH_2PO_4$  esté a pH 7.8, de lo contrario, no se recuperarán VMP.

	Concentración		Consideraciones		
Polímero	de la solución patrón	Concentración final	importantes		
Dextran	20 % (p/p)	6.2 % (p/p)	Al momento de preparar esta disolución hay que pesar el Dextran o el		
Polietilenglicol	40 % (p/p)	6.2 % (p/p)	<ul> <li>polietilenglicol y pesar el H<sub>2</sub>O. Si no se hace esto, la condición a la cual se harán las mezclas de fases variaran.</li> </ul>		

Tabla IV. Preparación de polímeros para los repartos de fases hechos en la extracción de VMP.

La metodología que se siguió para el aislamiento y purificación de las VMP de hojas de Arabidopsis thaliana se presenta de forma esquemática en la Fig. A.



Figura A. Procedimiento de purificación de las VMP. MF: mezcla de fases, SF: sistema de fases, U1: fase superior uno, dex: DEXTRAN, peg: polietilenglicol.

## RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE HIDRÓLISIS DE ATP REALIZADOS DURANTE LA ELABORACIÓN DE ESTA TESIS

A continuación se presentan los datos originales a partir de los cuales se generaron las figuras de la sección de Resultados de esta tesis.

Tabla V. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP (nmolPimin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>) llevados a cabo con la línea *Atlcb2a-1* (7 dpi).Se utilizaron 4  $\mu$ g de proteína por ensayo, con un tiempo de incubación de 30 minutos a 29 °C.

Tipo de hidrólisis	Actividad de ATPasa (nmolPimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )						
	257.597	331.622	252.405				
Hidrólisis total	218.902	329.425	254.517				
	246.462	330.994	291.129				
ATPasa sensible VO₄ <sup>3-</sup>	87.227	160 786	145.975				
	130.098	162.254	170.265				
	128.427	102.234	142.455				
<b>ATPasa NO</b> 172.969		214.874	136.235				
sensible $aNO_3 N_3$	156.823	211.422	127.787				
MoO <sub>4</sub>		216.443	135.179				
ATPasa sonsible	68.018	115.806	129.782				
and N. Moo.	84 165	119.258	138.23				
$a_1 O_3 O_3 O_4$	84.165	114.237	130.105				
% Inhibición por VO43-	36.2	51.34	54.87				
	53.99	49.07	64.01				
	46.71		53.55				

Tabla VI. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP llevados a cabo con la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (7 dpi). Se utilizaron 4  $\mu$ g de proteína por ensayo, con un tiempo de incubación de 30 minutos a 29 °C.

Tipo de	Actividad de ATPasa (nmolPimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )							
hidrólisis								
	411.593	428.673	329.77	338.69				
Hidrólisis total	402.054	423.319	321.947	324.405				
	343.407	429.303	336.196	321.131				
ATPasa	218.221	213.234	147.051	223.313				
AIFasa	203.029	217.329	159.064	209.921				
Sensible VO <sub>4</sub>	220.694	210.4	188.959	207.54				
ATPasa NO	265.681	311.82	246.233					
sensible aNO <sub>3</sub>	275.573	322.529	242.322					
$N_3 MoO_4$	285.466	335.127	238.69					
ATPasa	120.004	115.279	83.071					
sensible aNO <sub>3</sub>	110.112	104.57	86.983					
$N_3 MoO_4$	100.219	91.971	90.615					
% Inhibición	56.58	49.93	44.65	68.07				
$\frac{1}{100}$ mar VO $^{3-}$	52.64	50.88	48.3	63.99				
	57.22	49.26	57.38	63.26				

Tabla VII. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP llevados a cabo a diferentes tiempos de incubación Se utilizaron 4 µg de proteína por ensayo, a 29 °C.

	Actividad de ATPasa (nmolPimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )				
Tiempo (min)	Atlcb2a-1 (7 dpi)	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7 dpi)			
0	0.0	0.0			
10	1407.3	2632.7			
20	2415.0	5795.9			
30	3690.5	8469.4			
40	5463.4	10632.7			
50	6305.3	13898.0			

Tabla VIII. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP llevados a cabo con diferentes cantidades de proteína de la línea *Atlcb2a-1*(7 dpi). El tiempo de incubación fue de 30 minutos a 29 °C.

Línea Atlcb2a-1 (7 dpi)						
Proteina (μg)	Actividad	d de ATPasa (nm	olPimin⁻¹mg⁻¹)			
0	0.0	0.0	0.0			
1	316.0	245.7	217.5			
2	359.6	380.7	335.7			
3	486.2	536.8	515.7			
4	847.6	763.2	757.6			
5	912.3	932.0	943.3			
6	1155.7	1128.9	1131.7			
8	1393.3	1377.9	1368.0			

Tabla IX. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP llevados a cabo con diferentes cantidades de proteína de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (7 dpi). El tiempo de incubación fue de 30 minutos a 29 °C.

<i>Línea Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7 dpi)							
Proteina (μg)	Actividad de	Actividad de ATPasa (nmol Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )					
0	0.0	0.0	0.0				
1	361.9	287.4	238.2				
2	534.9	530.7	518.1				
3	833.1	803.6	806.4				
4	1113.0	1134.1	1070.8				
5	1380.2	1405.5	1354.9				
6	1630.6	1520.9	1561.7				
8	1827.5	1778.3	1783.9				

Tabla X. Actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* expuestas diferentes tiempos al inductor del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT (Metoxifenazida). Las determinaciones se hicieron medidos con 20 min de incubación y con 4  $\mu$ g de proteína para las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* con y sin inductor y para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor; con 2.5  $\mu$ g para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con 7 días posteriores a la inducción.

Línea <i>de A.</i>	Días post	Actividad de ATPasa						
thaliana	inducción	(nmolPimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )						
		89.29	143.01	134.38	165.13			
Silvestre	0	80.05	142.28	160.63	153.95			
		90.52	156.25	140.63	149.34			
		134.58	126.28	144.37	136.18			
Atlcb2a-1	0	118.51	84.82	161.25	128.29			
		131.07	91.20	126.25	131.58			
		101.60	138.60	121.88	138.82			
	7	104.06	170.96	156.25	148.03			
		107.14	156.99	134.38	131.58			
		133.01	171.99	168.75	201 32			
Atlcb2b hp/Atlcb2a	0	155.17	173.75	166.25	201.52			
		147.78	178.60	145.00	212.5			
		199.51	216.91	263.75	310.53			
	7	224.14	256.62	277.5	311.84			
		250.00	240.44	256.25	277.63			

Tabla XI. Actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* sin exposición al inductor. Las determinaciones se hicieron con 20 min de incubación y con 4  $\mu$ g de proteína a 29 °C

ATP	Actividad de ATPasa						
(mM)			(nm	າolPimin⁻¹m	g⁻¹)		
	16.80	25.33	13.27	18.25	19.00	37.19	32.14
0.2	28.68	17.62	10.32	18.25	20.22	36.56	26.79
	23.88	18.17	8.55	18.64	22.67	43.44	28.57
	33.61	21.48	8.55	22.08	32.78	55.31	40.48
0.3	18.28	23.68	13.56	23.22	24.82	48.44	41.07
		21.48	20.05	22.08	24.20	53.44	42.26
	14.45	20.93	24.47	28.96	23.59	53.44	36.90
0.4	22.70	20.93	23.88	22.08	25.43	61.56	43.45
	32.72	25.33	22.70	26.66	30.33	47.81	39.88
	20.93	21.20	26.53	24.94	40.44	67.50	66.37
0.6	22.11	22.30	34.20	23.80	30.64	73.13	52.68
	13.27		37.74	28.38	34.31	67.50	59.23
	21.82	29.74	31.54	24.64	40.75	92.19	73.51
0.8	25.94	24.23	40.39	29.83	32.78	90.31	72.32
	16.51	28.08	25.65	23.38	32.17	92.81	64.58
	23.58	27.81	36.26	35.84	34.31	106.56	77.08
1	13.56	22.31	32.72	30.10	29.41	116.56	187.80
	18.28	28.36	38.03	36.98	40.44	102.19	90.77
	85.50	50.66	58.08	62.98	49.02	144.69	160.12
2	72.52	55.77	65.15	62.98	52.70	134.69	125.60
	81.96	54.52	69.87	63.36	53.31	135.31	130.36
	138.56	103.25	107.31	78.56	69.55	140.00	171.13
4	98.47	104.90	96.70	84.86	60.97	170.00	179.46
	123.23	109.86	85.50	94.61	60.36	165.63	165.18
	93.16	117.94	117.92	123.57	80.88	174.06	163+69
6	104.36	115.64	100.24	94.90	85.78	175.94	159.52
	125.59	120.59	202.83	94.32	69.24	156.56	143.45
8	150.69	127.75	111.14	126.43		182.81	188.39

	144.16	127.75	116.45	122.99		115.94	191.96
	147.70	132.71	125.29	113.25		197.19	204.46
	134.73	127.48	111.73	120.99	90.99	383.75	175.00
10	137.73	117.02	118.22	123.85	106.92	251.88	295.24
	137.60	129.13	136.50	128.44	100.80	222.80	104.76

Tabla XII. Actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la línea *Atlcb2a-1* de *Arabidopsis thaliana* con 7 días posteriores a la exposición al inductor. Las determinaciones se hicieron con 20 min de incubación y con 4  $\mu$ g de proteína a 29 °C

ATP	Actividad de ATPasa								
(mM)			(nmolPin	nin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )					
	26.39	3.94	22.64	16.88	14.95	19.16			
	22.15	10.62	21.44	17.50	12.56	17.98			
0.2	24.58		22.04	20.63	11.96	22.11			
0.2	30.18	12.62	8.23	21.17					
	28.58	6.61	8.23	17.08					
	33.92	4.21	13.11	21.17					
	30.04	29.29	26.32	42.74	22.24	31.08			
	32.46	29.29	24.52	40.06	26.44	46.11			
	31.25	29.89	23.33	43.80	26.44	33.13			
0.3	16.08	28.13	28.89	23.90	26.83				
	17.29	25.63	27.71	22.06	28.05				
	15.47	25.00	31.25	25.12	30.49				
	42.48	38.04	35.63	27.51	37.44	46.74			
	33.98	36.84	32.50	29.31	35.67	51.55			
0.4	33.98	37.44	39.38	29.31	33.31	45.14			
0.4	27.61	26.96	47.78	31.10	20.15				
	30.64	32.48	47.18	30.49	11.95				
	45.81	25.12	42.97	40.29	15.37				
	60.68	51.93	42.19	36.48	44.81	51.55			
0.6	56.43	47.71	40.31	32.30	40.68	45.14			
	57.04	47.10	40.31	32.30	45.99	47.81			

	33.98	45.96	66.41	59.76	21.17	
	39.44	47.79	54.99	60.37	23.91	
	37.01	44.73	46.57	62.20	17.76	
	72.51	67.97	48.13	37.08	40.68	49.95
	63.41	59.18	50.00	41.27	39.50	55.29
	64.02	59.18	48.13	38.88	38.33	63.69
0.8	35.50	47.49	80.79	39.96		
	31.86	58.52	75.52	38.59		
	34.89	48.71	83.84	38.59		
	77.67	69.75	55.94	37.38	51.59	60.36
	67.35	57.76	49.69	39.77	54.54	59.83
4	67.96	71.56	55.31	37.98	49.82	61.43
1	35.50	53.92	53.49	84.45	43.37	
	40.35	47.18	47.48	82.62	36.54	
	48.25	42.28	55.29	82.62	36.54	
	102.24	92.69	71.88	61.90	70.75	68.64
	99.21	84.24	65.63	58.91	75.47	71.31
0	96.78	84.24	65.63	60.11	76.65	85.20
2	86.47	59.13	79.33	117.68	93.58	
	99.82	59.74	82.33	111.59	91.53	
	96.78	59.13	79.33	123.17	106.56	
	142.60	92.69	100.94	91.51	88.74	97.22
	120.75	96.92	92.81	72.37	89.33	94.02
4	132.89	85.45	92.81	84.93	91.69	99.89
4	111.65	81.80	79.03	152.13	103.48	
	114.08	69.55	77.82	159.45	93.24	
	121.97	69.55	77.82	169.82	104.17	
	147.76	116.55	106.23	87.92	103.77	93.48
6	145.33	111.11	115.00	87.32	92.57	112.71
	132.58	114.13	108.13	81.34	99.06	93.48

	136.83	114.28	121.09	122.87		
	131.37	93.44	137.92	139.94		
	122.27	95.89	134.31	136.28		
	147.15	115.27	125.30	120.31	91.21	68.10
0	141.69	118.93	127.11	120.31	97.79	88.15
	146.54	92.23	203.80	107.19	89.41	93.46
0	108.17					
	99.63					
	71.85					
	163.23	111.65	144.02	131.56	00.61	88.74
	140.17	98.91	141.61	114.06	00.01	82.25
10	152.91	120.15	145.83	100.94	00.02	87.56
	102.03					
	102.56					

Tabla XIII. Actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* con 0 días posteriores a la exposición al inductor. Las determinaciones se hicieron con 20 min de incubación y con 4 μg de proteína a 29 °C

ATP			Actividad	de ATPasa					
(mM)	(nmolPimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )								
	28.30	22.49	12.09	27.64	44.93	33.91			
0.2	27.12	20.15	12.09	26.04	42.48	38.81			
	28.30	27.16	10.91	30.05	51.47	25.74			
	39.50	23.66	26.83	87.74	48.61	59.64			
0.3	45.99	23.07	30.96	136.62	53.51	54.74			
	45.40	54.82	26.83	106.17	52.70	47.39			
	44.81	27.75	28.01	115.38	53.90	82.93			
0.4	49.53	24.82	32.72	112.98	67.80	69.85			
	50.12	30.67	33.90	116.99	67.81	73.94			
	59.26	32.61	22.70	114.18	67.40	90.69			
0.6	66.33	33.29	25.06	201.52	75.57	85.78			
	68.10	35.63	26.24	94.15	78.84	85.78			

	60.44	72.72	35.08	90.95	84.15	112.75
0.8	62.79	75.64	32.72	89.34	93.14	96.41
	66.30	82.65	39.21	92.55	111.93	89.87
	85.79	51.40	45.70	108.57	86.19	125.41
1	79.30	44.39	51.59	102.16	95.18	98.45
	74.59	51.40	50.41	109.38	101.72	126.27
	133.84	100.47	74.59	169.87	185.05	169.12
2	126.18	99.30	84.61	177.88	190.77	137.95
	119.10	106.89	83.43	173.88	179.33	160.95
	162.44	147.20	111.73	212.74	167.48	170.34
4	158.31	135.51	111.73	219.15	173.20	183.42
	158.31	144.86	121.76	225.26	161.76	176.06
	198.41	132.01	121.46	220.35	183.01	
6	194.87	130.60	122.64	216.35	178.92	116.83
	160.67	125.58	130.31	207.35	175.65	
	163.92	154.79	130.90	219.95	213.24	
8	176.89	136.68	133.25	224.76	202.61	
	168.04	137.27	127.36	216.75	214.05	
	120.87	120.33	126.47	227.56	203.43	
10	128.54	133.76	118.81	221.15	187.09	
	120.87	134.35	107.02	214.74	213.24	

Tabla XIV. Actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* con 7 días posteriores a la exposición al inductor. Las determinaciones se hicieron con 20 min de incubación y con 2.5  $\mu$ g de proteína a 29 °C

ATP		Actividad de ATPasa								
(mM)	(nmolPimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )									
	30.60	50.78	56.09	19.17	45.38	49.30				
0.2	32.82	53.10	55.29	20.74	45.38	51.64				
	30.60	51.55	52.08	27.78	53.21	53.99				
	52.73	45.74	64.90	20.74	71.21	55.56				
0.3	52.73	47.29	57.69	23.87	67.29	53.21				
	59.37	49.61	55.29	26.21	69.64	53.99				

	52.36	79.46	67.31	37.56	89.98	63.38
0.4	50.15	72.48	71.31	32.86	85.29	72.77
	47.49	81.78	68.11	36.78	84.51	75.12
	72.64	102.71	89.34	80.99	98.59	91.94
0.6	78.54	91.09	101.36	79.42	104.85	93.51
	71.17	108.14	95.75	89.50	82.16	93.51
	86.28	124.81	118.99	101.72	125.98	97.81
0.8	93.66	120.16	120.59	80.59	120.50	106.42
	98.82	131.01	123.80	100.16	121.28	93.90
	117.26	130.23	125.00	122.07	117.76	
1	109.40	133.33	130.61	118.94	114.63	
	107.67	136.46	125.80	136.93	115.41	
	182.89	157.36	163.46	172.54	166.67	
2	164.45	170.54	174.68	167.06	130.67	
	160.77	173.64	180.29	172.54	154.93	
	206.49	210.85	239.58	106 07	192.49	
4	207.23	234.11	201.92	216 74	194.05	
	237.46	235.66	209.94	210.74	196.40	
	233.78	257.36	243.59	177.23	209.31	
6	245.58	262.79	307.69	235.92	196.79	
	222.71	254.26	274.04	203.83	199.92	
	281.78	240.38	234.74	207.75	231.22	
8	260.08	201.12	260.56	199.92	207.75	
	295.74	205.13	200.31	199.92	153.76	
	230.77	225.35	176.84	219.48		
10	221.15	215.96	149.45	199.14		
	251.60	245.70	168.23	193.66		

Tabla XV. Actividad de hidrólisis de ATP en función de la concentración variable de sustrato para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra el promedio de la actividad en nmolPimin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> y error estándar. Los valores tomados corresponden a las Tablas XI, XII, XIII y XIV.

ΔΤΡ	Líneas	Silvestre	Línea A	tlch2a_1	Línea A	Atlcb2b	Línea /	Atlcb2b
(mM)	Lineas	Silvestie		10028-1	hp/Atlcb2	? <i>a</i> (0 dpi)	<i>hp/Atlcb2a</i> (7 dpi)	
()	Actividad	E. E.	Actividad	E. E.	Actividad	E. E.	Actividad	E. E.
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.2	23.04	1.22	18.14	2.18	30.29	3.10	56.68	4.97
0.3	28.99	5.14	30.01	2.20	43.77	3.83	68.14	4.07
0.4	30.87	4.52	35.36	2.64	53.26	6.55	79.44	7.64
0.6	37.57	7.34	47.75	3.27	67.88	8.01	100.70	9.85
0.8	43.07	10.18	56.08	3.69	79.65	10.32	121.53	14.10
1	48.81	12.73	59.28	3.87	88.21	10.78	136.47	10.86
2	84.19	14.44	84.83	5.12	147.66	13.16	183.08	15.88
4	114.67	14.69	106.76	7.42	177.88	9.81	243.78	10.74
6	120.35	11.83	111.24	4.78	183.47	7.67	268.45	15.13
8	145.91	11.32	112.64	5.90	192.92	9.03	254.58	21.88
10	133.01	11.75	116.03	9.37	187.91	12.90		

Tabla XVI. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP a diferentes concentraciones de de inhibidor Vanadato. Se midieron con una concentración de 0.5 mM de ATP-Mg en el medio de reacción, 20 minutos como tiempo de incubación a 29°C. Se utilizaron 4  $\mu$ g para la línea *Atlcb2a-1* y 2.5  $\mu$ g para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

	Actividad de ATPasa							
			(nmolPin	nin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )				
VO₄ <sup>3-</sup> (mM)	Línea <i>Atlcb2a-1</i> (7 dpi)		Línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7 dpi)					
	23.00	30.57	41.27	78.25	64.08	62.67		
0	27.30	21.21	47.59	89.82	55.71	81.76		
	19.89	51.21	43.25	88.77	56.53	58.42		
	21.81	29.74	15 75	85.09	56 43	55.25		
10	23.74	32.99	40.70	83.93	57 45	58.69		
	24.02	29.74	40.11	92.14	57.45	56.88		
	23.91	25.02	32.85	66.25	43.37	61.49		
40	20.63	28.02	36.93	65.19	48.57	47.38		
	21.41	23.24	36.01	71.93	46.22	51.63		
	15.03	22.85	36.80	62.56	35.31	42.58		
80	11.75	20.24	38 31	61.30	50.92	43.76		
	19.33	17.05	50.51	59.98	50.51	53.17		
	18.31	16.60	28.97	51.51	36.22	49.28		
150	19.33	15.65	25.68	47.82	49.69	42.49		
	21.70	15.84	37.13	51.61	39.18	47.19		
	9.03	13.73	18.84	46.98	29.08	46.92		
300	17.85	15.33	28.18	38.98	37.24	29.91		
	13.05	11.76	19.82	25.09	30.92	47.47		

Tabla XVII. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP a diferentes concentraciones de de inhibidor Vanadato. Se midieron con una concentración de 3 mM de ATP-Mg en el medio de reacción, 20 minutos como tiempo de incubación a 29°C. Se utilizaron 4  $\mu$ g para la línea *Atlcb2a-1* y 2.5  $\mu$ g para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

	Actividad de ATPasa								
		(nmolP	imin⁻¹mg⁻¹)						
VO₄ <sup>3-</sup> (mM)	Línea <i>Atlcb</i>	Línea <i>Atlcb2a-1</i> (7 dpi)		p/Atlcb2a (7 dpi)					
	116.22	98.69	233.36	188.28					
0	109.12	91.35	244.64	204.37					
	114.4	104.80	252.34	208.54					
	94.91	77.46	204.99	157.65					
10	92.93	81.03	205.93	157.05					
	109.81	76.08	180.80	100.04					
	78.08	71.83	153.87	130.41					
40	79.90	57.57	156.18	115.77					
	76.42	59.86	150.28	113.30					
	65.42	53.37	122.76	90.75					
80	66.76	52.36	133.62	101.56					
	76.28	62.25	122.59	101.48					
	46.94	32.84	95.58	79.60					
150	58.90	37.57	103.02	76.62					
	60.40	42.09	116.01	82.84					
	49.98	34.11	97.98	86.33					
300	48.49	34.59	99.86	69.73					
	56.13	35.60	96.01	67.43					

Tabla XVIII. Resultados de los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP a diferentes concentraciones de de inhibidor Vanadato. Se midieron con una concentración de 8 mM de ATP-Mg en el medio de reacción, 20 minutos como tiempo de incubación a 29°C. Se utilizaron 4  $\mu$ g para la línea *Atlcb2a-1* y 2.5  $\mu$ g para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

		Actividad de ATPasa								
			(nm	olPimin⁻¹mថ	g <sup>-1</sup> )					
VO₄ <sup>3-</sup> (mM)		Línea Atlcb	2a-1 (7 dpi)	Línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7 dpi)						
	118.73	123.23	142.63	137.58	191.54	190.48	197.35			
0	118.12	99.44	110.72	174.14	171.06	174.81	180.43			
	117.52	128.53	107.89	209.16	157.90	198.77	168.49			
	93.85	95.70	124.36	121.72	122.28	149.00	129.68			
10	85.96	114.94	73.10	112.52	124.23	130.57	132.67			
	88.39	103.88	97.26	166.41	143.74	134.25	119.73			
	81.11	64.02	79.15	72.19	112.51	107.53	98.84			
40	51.98	69.89	110.15	98.90	76.42	94.62	63.02			
	55.62	73.35	110.30	118.53	97.89	81.72	90.88			
	53.80	57.16	106.69	77.02	99.84	76.19	86.90			
80	50.77	46.97	71.41	71.01	65.69	65.13	76.95			
	50.16	61.71	75.32	119.69	93.98	56.84	84.91			
	41.06	50.19	66.31	58.75	79.35	72.50	67.00			
150	41.67	45.76	56.75	58.16	74.47	60.52	67.00			
	31.96	50.60	67.21	86.63	57.89	70.66	79.93			
	11.33	40.92	70.39	84.98	60.81	60.52	56.05			
300	28.32	31.99	58.97	46.36	39.35	43.93	49.09			
	30.79	31.30	59.82	51.58	50.08	37.48	55.06			

	Inhibición (%) a 0.5 mM de ATP-Mg								
VO₄ <sup>3-</sup> (mM)	Línea <i>Atlcb2a-1</i> (7 dpi)			Línea Atlcb2b hp/Atlcb2a (7 dpi)					
0	98.30 116.68 85.10	98.96 101.04	93.72 108.70 98.20	91.40 104.90 103.69	109.03 94.79 96.18	92.68 120.92 86.40			
10	93.22 101.47 102.66	96.28 106.80 96.28	103.89 109.25	99.39 98.03 107.62	96.01 97.75	81.71 86.80 84.12			
40	102.19 88.17 91.51	81.00 90.71 75.23	74.60 83.86 81.77	77.38 76.14 84.02	73.79 82.64 78.64	90.94 70.07 76.36			
80	64.24 50.22 82.62	73.97 65.52 55.20	83.57 87.00	73.07 71.60 70.06	60.08 86.64 85.94	62.97 64.72 78.63			
150	78.26 82.62 92.65	53.74 50.66 51.28	65.79 58.32 84.32	60.17 55.86 60.28	61.63 84.55 66.66	72.88 62.84 69.79			
300	38.60 72.92 55.78	44.45 49.63 38.07	42.78 63.99 45.01	54.87 45.53 29.31	49.48 63.36 52.61	69.39 44.23 70.20			

Tabla XIX. Resultados de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por Vanadato. Valores calculados con los resultados de la Tabla XVI.

	Inhibición (%) a 3 mM de ATP-Mg				
VO₄ <sup>3-</sup> (mM)	Línea <i>Atlcb2a-1</i> (7 dpi)		Línea Atlcb2b hp/Atlcb2a (7 dpi)		
	102.63	100.42	95.86	93.95	
0	96.36	92.95	100.49	101.98	
	101.02	106.63	103.65	104.96	
	83.81	78.82	84.20	78.67	
10	82.06	82.45	84.59	92.25	
	96.97	77.41	74.27	03.25	
	68.45	73.09	63.20	65.08	
40	70.55	58.58	64.15	57.77	
	67.48	60.91	61.73	56.54	
	57.77	54.30	50.43	45.29	
80	58.95	53.28	54.89	50.68	
	67.36	63.34	50.36	50.64	
	41.45	33.41	39.26	39.72	
150	52.01	38.23	42.32	38.23	
	53.33	42.83	47.65	41.34	
300	44.13	34.71	40.25	43.08	
	42.82	35.20	41.02	34.80	
	49.56	36.22	39.44	33.65	

Tabla XX. Resultados de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por Vanadato. Valores calculados con los resultados de la Tabla XVII.

	Inhibición (%) a 8 mM de ATP-Mg						
VO₄³⁻ (mM)		Línea Atlch	2 <i>a-1</i> (7 dpi)		Línea Atlc	b2b hp/Atlcl	b2a (7 dpi)
	100.51	105.26	118.45	79.24	110.40	101.31	108.38
0	100.00	84.94	91.95	100.30	98.59	92.97	99.09
	99.49	109.79	89.60	120.47	91.01	105.72	92.53
	79.45	81.75	103.28	70.10	70.48	79.25	71.22
10	72.77	98.18	60.71	64.18	71.60	69.44	72.86
	74.83	88.74	80.77	95.84	82.85	71.40	65.75
40	68.67	54.69	64.90 91.65	41.58	64.85	57.19	54.28
	44.00	59.70		56.96	44.05	50.32	34.61
	47.09	62.66		68.27	56.42	43.46	49.91
	45.55	48.83	88.60	44.36	57.54	40.52	47.72
80	42.98	40.12	59.30	40.90	37.86	34.64	42.26
	42.46	52.71	62.55	68.94	54.17	30.23	46.63
	34.76	42.87	55.07	33.84	45.73	38.56	36.79
150	35.28	39.09	47.13	33.50	42.92	32.19	36.49
	72.06	43.22	55.82	49.89	33.37	37.58	43.90
300	9.59	34.95	58.46	48.94	35.05	32.19	30.78
	23.97	27.33	48.97	26.70	22.68	23.36	26.96
	26.07	26.74	49.68	29.71	28.86	19.93	30.24

Tabla XXI. Resultados de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por Vanadato. Valores calculados con los resultados de la Tabla XVIII.

Tabla XXII. Resultados de la medición de actividad de hidrólisis de ATP (nmolPimin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>) por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la reconstitución membranal con una fracción de esfingolípidos extraída de la línea silvestre.

Línea <i>Atlcb2a-1</i> (7 dpi)							
0 µg		8 µg	16 μg	32 μg	48 μg		
Esfingolípidos		Esfingolípidos	Esfingolípidos	Esfingolípidos	Esfingolípidos		
90.09	101.34	77.40	90.21	93.78	95.37		
100.12	93.40	88.59	92.60				
100.37	111.47						
142.15	107.64						
102.76	107.64						
Línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7dpi)							
0 µg		8 µg	16 μg	32 μg	48 μg		
Esfingolípidos		Esfingolípidos	Esfingolípidos	Esfingolípidos	Esfingolípidos		
277.40	188.25	174.38	164.04	122.96	92.29		
176.13	229.64	148.35	152.59				
238.83	244.86						

Tabla XXII. Resultados de la medición de actividad de hidrólisis de ATP (nmolPimin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>) por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la reconstitución membranal con una preparación comercial de glucosilceramida.

Línea <i>Atlcb2a-1</i> (7 dpi)							
0 µg GC		8 μg GC 16 μg GC		32 μg GC	48 μg GC		
122.12	106.25	94.38	81.96	86.25	115.84		
101.04	105.14	76.45	96.88	98.71	96.25		
99.34	103.01						
Línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7dpi)							
0 µg GC		8 μ <b>g GC</b>	16 μg GC	32 μg GC	48 μg GC		
156.92	214.42	181.28	146.15	127.69	126.67		
190.77	235.58	217.18	165.90	108.97	138.12		
195.13	234.20		183.24	150.51	83.56		
185.90	229.81						
201.28							