



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

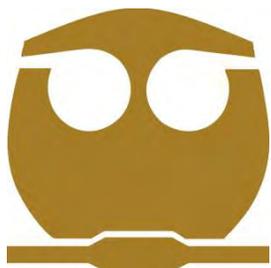
INFLUENCIA DE LA HIDROXILACIÓN
DE ESFINGOLÍPIDOS EN LA ACTIVIDAD
DE LA ATPasa DE H⁺ DE MEMBRANA
PLASMÁTICA EN *Arabidopsis thaliana*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

GLORIA CAROLINA FACIO GAXIOLA



MÉXICO, D.F.

2010



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	Dr. Blas Lotina Hennsen
Vocal	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Secretario	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
1er suplente	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
2º suplente	M. en C. Martha Giles Gómez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesora

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor técnico

Q.F.B María Consuelo Enríquez Arredondo

Sustentante

Gloria Carolina Facio Gaxiola

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, y bajo la supervisión técnica de la Q.F.B María Consuelo Enríquez Arredondo.

Gloria Carolina Facio Gaxiola realizó esta tesis gracias a becas de CONACYT (101521) y PAPIIT 211409, DGAPA (UNAM).

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de CONACYT (proyecto 101521) y PAPIIT-DGAPA, UNAM (proyecto 211409),).

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a mis padres. Su amor incondicional ha sido fundamental para el logro de mis metas y para el desarrollo y cumplimiento de mis sueños. Gracias por apoyarme e intentar comprenderme en todo momento.

A mis hermanos, por seguirme consintiendo hasta ahora, por colocarme en mis cabales cuando ha sido necesario, por sus infinitos y tan variados consejos.

A Esteban, por compartir conmigo todo este tiempo, por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista, por tolerar mi estrés en los finales de semestre, los altibajos de la carrera y en mi vida personal, por construir conmigo un presente y un futuro, por apoyarme en mis decisiones, por ambientar y aligerar con su música mi estudio, por estar a mi lado a pesar de todo, por ser mi mejor amigo, por amarme y por hacerme feliz.

A mis amigos Zubi, Alina, Araceli, Daniel, Carmelina, Rulo y Trucas, que siempre han estado ahí a pesar de frecuentarnos poco en estos años, y por ayudarme a distraerme del ambiente de la facultad cuando hacía falta y cuando no.

A mis amigos Alicia, Gabo, Rafa, Memo, Kory, Myrna, Piffs, Estibi, Cariño, Fabi D, Chava y Fabi A por compartir conmigo estos increíbles años en la facultad, por ser siempre un motivo para llegar a la facultad y para salir juntos de ella, por todas esas banales pero muy significativas pláticas en la jardinera, por las tardes de béisbol, por todos los recuerdos en la facultad.

Finalmente, a todos mis compañeros del laboratorio 101 Chelo, Karla, Edgar, Doris, Lupita, Laura y Ari, que hicieron estos 2 largos años de investigación menos estresantes, por sus consejos, su paciencia y su comprensión en los momentos en los que mi déficit de atención se manifestaba.

A todos, Gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. Estructura y función de las membranas biológicas	8
2.2. Componentes de la membrana plasmática	9
2.2.1. Carbohidratos de membrana. Glicoproteínas y Glicolípidos	9
2.2.2. Lípidos de membrana	10
2.2.2.1. Glicerolípidos	11
2.2.2.2. Esteroles	11
2.2.2.3. Esfingolípidos	11
2.2.2.3.1. <u>Estructura de los esfingolípidos</u>	12
2.2.2.3.2. <u>Síntesis de esfingolípidos.</u>	14
2.2.2.3.3. <u>Función de los esfingolípidos</u>	18
2.2.2.3.3.1. <i>Estabilidad membranal</i>	18
2.2.2.3.3.2. <i>Señalización y regulación celular</i>	18
2.2.2.3.3.3. <i>Respuesta a estrés</i>	19
2.2.2.3.3.4. <i>Patogénesis</i>	19
2.2.2.3.3.5. <i>Muerte celular programada</i>	20
2.2.3. Proteínas de membrana	20
2.3. ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática	22
2.3.1. Estructura	24
2.3.2. Localización	25
2.3.3. Función	26
2.3.4. Regulación.	28
3. ANTECEDENTES	30
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1. Objetivos generales	33
5.2. Objetivos particulares	33

6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1. Material biológico	34
6.2. Metodología	34
6.2.1. Crecimiento de las plantas.	34
6.2.2. Obtención de fracciones subcelulares	35
6.2.3. Determinación de proteína.	38
6.2.4. Obtención de membranas plasmáticas (VMP) de las fracciones microsomales.	39
6.2.5. Separación electroforética de proteínas	40
6.2.6. Detección de proteínas por réplica en Western	43
6.2.7. Determinación de Actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	45
6.2.8. Actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática bajo diferentes periodos de incubación a 29°C.	46
7. RESULTADOS	48
7.1. Determinación de la pureza de VMPs de Col-0, <i>Atsbh1-1</i> y <i>Atsbh1-2</i> por Réplica en Western.	48
7.2. Determinación de la hidrólisis de ATP de VMP de plantas del genotipo silvestre, y de las líneas mutantes <i>Atsbh1-1</i> y <i>Atsbh1-2</i> .	59
7.3. Determinación de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de las VMP de <i>A. thaliana</i> de las líneas silvestre y mutante <i>Atsbh1-1</i> expuestas a diferentes tiempos de incubación.	64
8. DISCUSIÓN	68
8.1. Estandarización de condiciones para la inmunodetección de enzimas marcadoras	68
8.2. Determinación de la pureza de las muestras de VMP de Col-0 y <i>Atsbh1-1</i> .	70
8.3. Determinación de la actividad de ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática.	71
8.4. Estabilidad de las VMP de <i>A. thaliana</i> de las líneas silvestre y mutante <i>Atsbh1-1</i> .	73
8.5. Resumen	76
9. CONCLUSIONES	77
10. PERSPECTIVAS	78
11. BIBLIOGRAFÍA	79

1. RESUMEN

Los esfingolípidos son componentes estructurales esenciales en las membranas biológicas en plantas y otros eucariontes. La estabilidad que los esfingolípidos complejos le confieren a la membrana se ha relacionado con su nivel de hidroxilación, tanto en las cadenas de los ácidos grasos, como en las bases de cadena larga (BCL). La ATPasa de H^+ , que es una ATPasa tipo-P se encuentra exclusivamente en membranas plasmáticas de plantas y hongos. La función principal de la ATPasa de H^+ es bombear protones desde el citosol hacia afuera de la célula, generando un gradiente de concentración de H^+ y un gradiente eléctrico transmembranal que provee la energía necesaria para el transporte activo de solutos y otras funciones celulares.

En este trabajo se utilizaron plantas *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre y de dos líneas manipuladas genéticamente (*Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*) para tener un defecto en una de las proteínas con actividad de hidroxilasa (SBH1) de las bases de cadena larga de los esfingolípidos. En este trabajo se determinó la influencia del grado de hidroxilación de las BCL de esfingolípidos de *Arabidopsis thaliana* sobre la actividad de la ATPasa de H^+ , así como sobre su estabilidad a la temperatura midiendo su hidrólisis de ATP, lo cual se hizo en preparaciones de vesículas de membrana plasmática (VMP) purificadas tanto de la línea silvestre como de las mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*. Las fracciones obtenidas se examinaron en cuanto a su pureza determinando la presencia de enzimas marcadoras por medio de Réplicas en Western y determinando la actividad de enzimas marcadoras por medio de ensayos de hidrólisis de ATP.

Las modificaciones genéticas realizadas sobre las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* producen una disminución en la cantidad de BCL trihidroxiladas y un aumento en las BCL dihidroxiladas, en comparación con la línea silvestre. Con base en lo anterior, no se encontró una influencia del grado de hidroxilación de las BCL de los esfingolípidos en la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, al no presentarse diferencias consistentes entre las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* con respecto a la línea silvestre. Tanto las VMP de la línea silvestre como las de las de la mutante *Atsbh1-1* presentaron la misma tendencia negativa en la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática con respecto al tiempo de incubación a 29 °C, lo cual indica que es sensible a la temperatura. Por otro lado, la línea mutante *Atsbh1-1* presentó una actividad menor después de 60 min de incubación en comparación a la línea silvestre, sugiriendo que el grado de hidroxilaciones de las BCL de los esfingolípidos membranales influye sobre la actividad de la ATPasa de H^+ .

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Estructura y función de las membranas biológicas

Las membranas plasmáticas son cubiertas que delimitan la interfase entre la célula y el ambiente, por lo que juegan un papel importante en muchas funciones fisiológicas, tales como la nutrición de la célula (transporte de solutos), endocitosis, respuesta contra estímulos (patógenos o cambios en el ambiente), entre otros (Morel *et al.*, 2006). Las membranas biológicas dividen el espacio intercelular en compartimientos especializados que ejecutan procesos metabólicos específicos. Están encargadas de organizar un gran número de reacciones que tienen como fin tanto la conservación biológica de energía, como la comunicación celular. Las notables propiedades físicas de las membranas biológicas generan las actividades biológicas de las mismas; son flexibles, auto-sellables y selectivamente permeables a solutos polares. La flexibilidad permite cambios de forma y tamaño a lo largo del crecimiento y movimiento celular. La habilidad auto-sellable permite la ruptura y cierre de las células, lo que permite por ejemplo la fusión de dos membranas, o el sello de una misma membrana, como sería en el caso de la división celular. La permeabilidad selectiva de las membranas hace posible retener o expulsar ciertos compuestos e iones, ya sea en el citoplasma o bien dentro de los organelos (Nelson y Cox, 2000).

A partir de evidencias microscópicas y estudios sobre la composición química de las membranas, actualmente se concibe la estructura de las membranas según el modelo del mosaico fluido, el cual plantea que las membranas son láminas continuas y cerradas formadas por una bicapa lipídica formada por dos monocapas que se contraponen entre sí por la parte no-polar y exponiendo la cara polar al exterior. En esta bicapa lipídica se encuentran insertados diferentes compuestos, como proteínas, lípidos y carbohidratos, los cuales juegan papeles fundamentales en las funciones de las membranas. Las caras o monocapas de la bicapa lipídica son asimétricas, ya que los componentes de ellas suelen ser diferentes, por ejemplo, en el caso de las proteínas asociadas a las membranas, las proteínas pueden ser periféricas, localizándose ya sea en la cara interior o exterior de la célula; o bien pueden ser proteínas integrales (transmembranales o en un solo extremo); adicionalmente, los lípidos que componen ambas monocapas están en proporciones diferentes (Buchanan *et al.*, 2000).

El mosaico de la membrana puede modificarse en su organización constantemente gracias a la fluidez. Ésta se da gracias a que las interacciones moleculares entre los

componentes son no-covalentes, por lo que los lípidos y proteínas como moléculas individuales pueden moverse lateralmente con gran libertad.

2.2. Componentes de la membrana plasmática

La membrana plasmática está integrada por diferentes componentes que se encuentran insertados en la bicapa lipídica. La mayor parte de estos componentes son proteínas, mientras que los carbohidratos se encuentran asociados a lípidos o a proteínas.

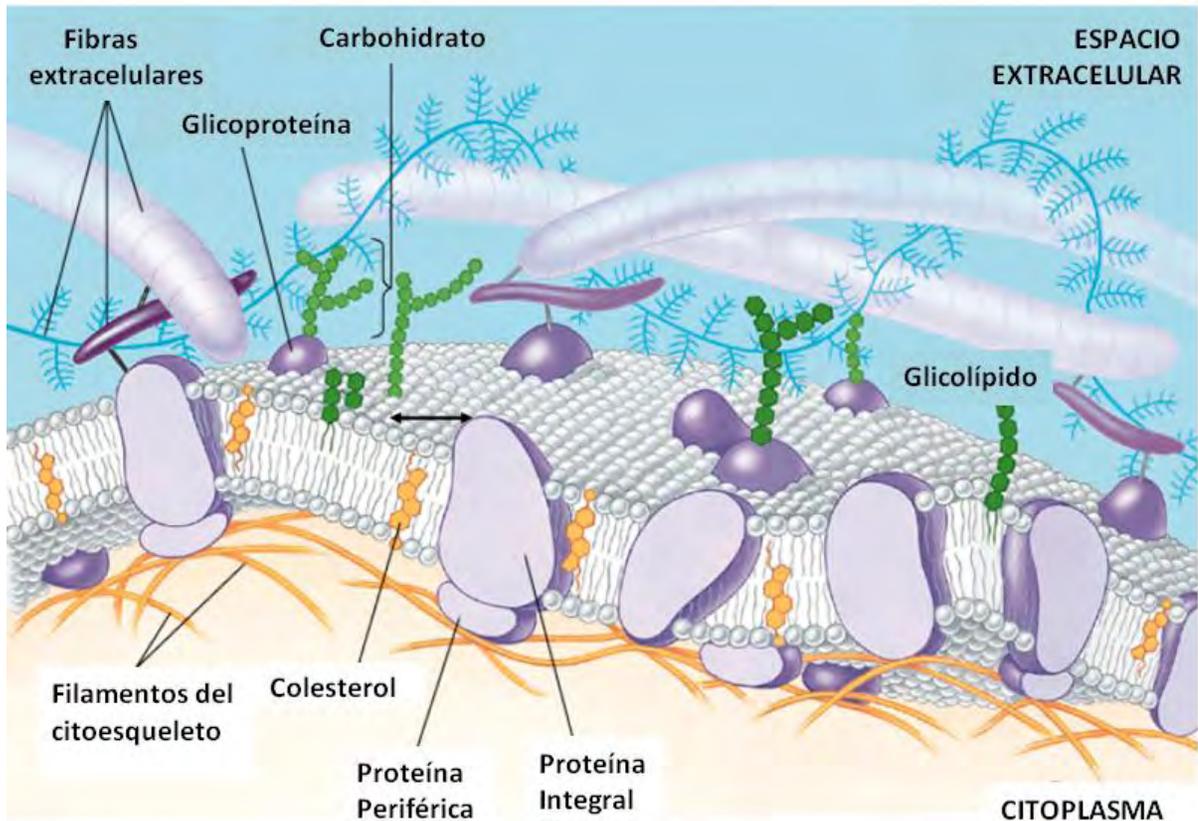


Figura 1. 1 Estructura de la membrana plasmática

2.2.1. Carbohidratos de membrana. Glicoproteínas y Glicolípidos

Los carbohidratos presentes en las membranas plasmáticas se encuentran asociados covalentemente a otras macromoléculas como proteínas, formando glicoproteínas, o bien a lípidos, formando glicolípidos.

Las glicoproteínas tienen uno o más tipos de oligosacáridos de diferente complejidad. Suelen estar presentes en la cara externa de la membrana plasmática. También pueden encontrarse en otro tipo de membranas de organelos citoplásmicos, tales como las membranas del Aparato de Golgi, lisosomas y gránulos secretores. Los oligosacáridos de las

glicoproteínas constituyen estructuras que forman sitios de reconocimiento de alta especificidad y que tienen alta afinidad de unión a otras proteínas.

Los glicolípidos son lípidos membranales cuya cabeza hidrofílica está constituida por oligosacáridos. De igual manera que las glicoproteínas, los glicolípidos actúan como sitios de reconocimiento específicos mediante proteínas con uniones a carbohidratos (Nelson y Cox, 2000).

2.2.2. Lípidos de membrana

La base estructural de las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la cual actúa como barrera de paso para moléculas polares e iones. Los lípidos membranales son de naturaleza anfifílica, teniendo una zona hidrofóbica y otra hidrofílica. A continuación se presentan los tres principales tipos de lípidos membranales: los glicerolípidos, los esteroides y los esfingolípidos. La enorme variedad en la estructura fina de las membranas biológicas es el resultado de diferentes combinaciones de la variedad de estos tres grupos, contribuyendo a la arquitectura de las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas y a la diversidad de las membranas celulares.

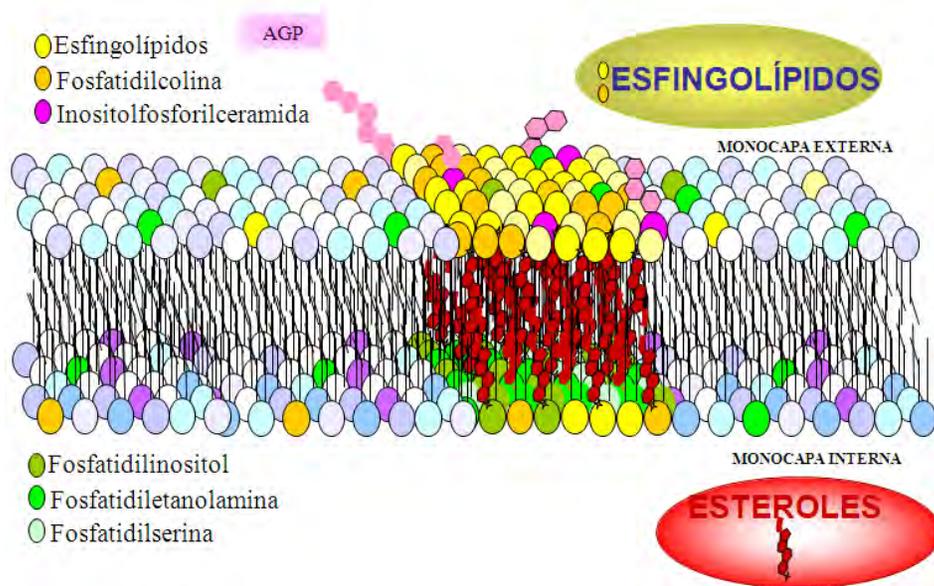


Figura 1. 2 Modelo de la membrana plasmática que incluye una región de balsa lipídica. Se ilustran varios tipos de lípidos componentes de la bicapa lipídica en su región desordenada así como de la región ordenada (balsa lipídica) en el centro. Esta región contiene esfingolípidos junto con esteroides. (Carmona, 2008).

2.2.2.1. Glicerolípidos

Los glicerolípidos son lípidos membranales en los que dos ácidos grasos se encuentran unidos por medio de un enlace éster al primero y segundo carbonos de una molécula de glicerol, cuyo tercer carbono puede estar unido a un azúcar, formando un glicoglicerolípidos, o bien puede estar unido un grupo polar o con carga como un alcohol fosforilado a través de un enlace éster, formando un fosfoglicerolípidos, siendo éstos más abundantes que los glicoglicerolípidos. La variedad de los ácidos grasos unidos al glicerol que constituyen los glicerolípidos es muy amplia, y suelen ser específicos para diferentes tejidos o bien para diferentes tipos de organismos. En general, los glicerolípidos contienen un ácido graso saturado generalmente de C₁₆ o C₁₈ en el carbono uno y un ácido graso insaturado de C₁₈ hasta C₂₀ en el carbono dos (Chen *et al.*, 2008)

2.2.2.2. Esteroles

Los esteroles son lípidos que constan de un núcleo esteroide, formado por cuatro anillos unidos, tres de seis carbonos y uno de cinco carbonos. El núcleo esteroide es prácticamente rígido, ya que la unión de los anillos dificulta la movilidad de los enlaces C-C. La mayoría de los esteroles presentes en la naturaleza son de naturaleza anfifílica; contienen una cabeza polar en el carbono tres, conformada generalmente por un grupo hidroxilo, y un cuerpo no-polar, conformado por el núcleo esteroide y por cadenas alifáticas asociadas al C17 del núcleo. Los esteroles de todos los organismos eucariontes son sintetizados a partir de moléculas de acetil Co-A que sufren un gran número de reacciones.

El contenido de esteroles en la membrana plasmática es uno de los factores que determina la temperatura de transición de la membrana, la cuál es una característica de las membranas y que se refiere a la temperatura a la cual los sólidos paracrystalinos (como puede considerarse una membrana) cambian de estado físico, en este caso de cristalino a cristal líquido o viceversa. Debajo de la temperatura de transición, la presencia de esteroles previene el ordenamiento de ácidos grasos incrementando la fluidez. Por encima de la temperatura de transición, el anillo rígido de los esteroles reduce el movimiento y asociación entre las cadenas de los ácidos grasos, reduciendo la fluidez de la membrana (Nelson y Cox, 2000).

2.2.2.3. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes esenciales en las membranas biológicas en plantas y otros eucariotes. Son los lípidos más abundantes en las membranas celulares de las plantas, componiendo >40% de la misma, además de encontrarse también en endomembranas como el tonoplasto. La investigación biológica de los esfingolípidos en

plantas ha crecido y se ha vuelto un área emergente en los últimos 10 años, siendo acompañada por investigaciones enfocadas al metabolismo de esfingolípidos en mamíferos y levaduras. Hoy en día, se conoce que la función de los esfingolípidos en plantas es multifacética (Chen *et al.*, 2006)

2.2.2.3.1. Estructura de los esfingolípidos

Los esfingolípidos son moléculas anfifílicas compuestas por una cabeza polar y dos cadenas alifáticas. La porción hidrofóbica es conformada por una ceramida, la cual se compone por una base de cadena larga y una molécula de ácido graso de cadena larga. La porción hidrofílica se conforma por un grupo polar unido a la ceramida por un enlace glicosídico o en algunos casos por enlaces éster (Nelson y Cox, 2000).

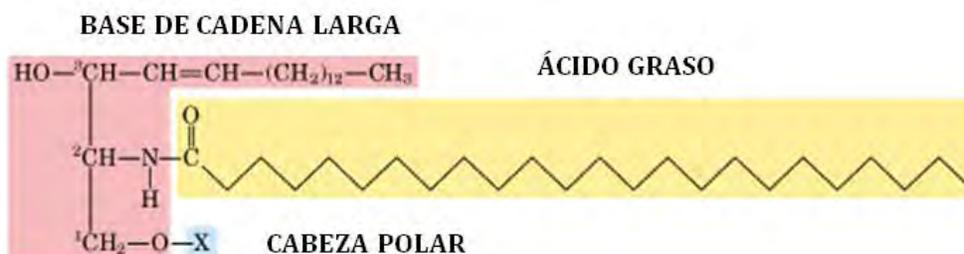


Figura 1. 3 Estructura general de esfingolípidos complejos (Nelson y Cox, 2000).

Las ceramidas son las moléculas precursoras de todos los esfingolípidos complejos y son la forma *N*-acetilada de las bases de cadena larga (BCL), al tener unido en el C-2 de la BCL un ácido graso por medio de un enlace amida (Nelson y Cox, 2000). La estructura base de las ceramidas puede ser modificada posteriormente por cambios en el largo de las cadenas alifáticas, metilaciones, hidroxilaciones e insaturaciones tanto en las BCL como en los ácidos grasos. La conjugación de grupos polares en el primer hidroxilo de la BCL de la ceramida da lugar a la cabeza polar y por lo mismo, a la síntesis de esfingolípidos complejos (Pata *et al.*, 2009).

Los ácidos grasos de los esfingolípidos pueden variar de longitud, grado de hidroxilación e insaturación. En plantas, los ácidos grasos están predominantemente α -hidroxilados, con una longitud que varía de 14 a 26 carbonos. Una característica importante de los esfingolípidos en plantas es precisamente el tamaño de los ácidos grasos, ya que suelen presentarse en mayor proporción, cadenas muy largas de ácidos grasos (VLCFA) (Lynch y Dunn, 2004), lo cual le confiere características funcionales a los esfingolípidos que serán tratadas más adelante.

	Nombre	Designación corta
	Esfinganina	d18 : 0
	(E)-4-esfinganina (esfingosina)	d18 : 1 ^{ΔE} / d18 : 1 ^{ΔE,ns}
	(E)-8-Esfinganina	d18 : 1 ^{ΔE} / d18 : 1 ^{ΔE,ns}
	(Z)-8-Esfinganina	d18 : 1 ^{ΔZ} / d18 : 1 ^{ΔZ,ns}
	(4E,8E)-4,8-diesfinganina	d18 : 2 ^{ΔE,ΔE} / d18 : 2 ^{ΔE,ns,ΔE,ns}
	(4E,8Z)-4,8-diesfinganina	d18 : 2 ^{ΔE,ΔZ} / d18 : 2 ^{ΔE,ns,ΔZ,ns}
	4-Hidroxiesfinganina (fitoesfingosina)	t18 : 0
	(E)-4-Hidroxiesfing-8-anina	t18 : 1 ^{ΔE} / t18 : 1 ^{ΔE,ns}
	(Z)-4-Hidroxiesfing-8-anina	t18 : 1 ^{ΔZ} / t18 : 1 ^{ΔZ,ns}

Figura 1. 4 Estructuras de BCL representativas en plantas (Pata *et al.*, 2009).

La mayoría de los esfingolípidos en plantas están conformados por BCL de 18 carbonos, las cuales son formadas a partir de la unión del aminoácido serina y el ácido graso palmitoil-CoA. El producto formado es la cetoesfinganina, cuya reducción produce a la esfinganina que es la BCL que sufre tres tipos de modificaciones enzimáticas: insaturaciones, fosforilaciones e hidroxilaciones. Las BCL en plantas se caracterizan por el grado de hidroxilación que presentan; pueden tener hasta tres hidroxilaciones las cuales se encuentran comúnmente en los carbonos C-1, C-3 y C-4. Las hidroxilaciones del C-1 y del C-3 provienen de la síntesis de la esfinganina a partir de las moléculas precursoras serina y palmitoil-CoA, mientras que el tercer grupo hidroxilo se localiza en el C-4 y es unido después de la síntesis de esfinganina por medio de la actividad catalítica de hidroxilasas. El grupo hidroxilo del C-1 puede ser sustituido con residuos polares formando esfingolípidos más complejos: glucosilceramidas y glicosilinositolfosforilceramidas. La hidroxilación del C-4 puede ser omitida en algunos casos formando esfingolípidos con BCL dihidroxiladas, los cuales son menos abundantes en las plantas. Las BCL trihidroxiladas constituyen el 90% de BCL de los esfingolípidos del extracto total de hojas de *Arabidopsis* (Markham *et al.*, 2006). Otra característica de las BCL de plantas es la doble insaturación que presentan en los carbonos C-4, C-8. La insaturación entre C-4 y C-5 suele presentarse en forma *trans*,

mientras que la doble ligadura entre C-8 y C-9 puede presentarse *cis* o *trans* (Chen *et al.*, 2009).

Algunas BCL pueden encontrarse libres, es decir, sin estar aciladas a un ácido graso o esterificadas a algún grupo polar, ejemplos de esto son la esfinganina, una base de cadena larga dihidroxilada, y la 4-hidroxi esfingina, una base de cadena larga trihidroxilada, sin embargo, sus niveles son muy bajos en las células (Figura 1.4). Las ceramidas libres también se encuentran en bajas concentraciones, pero son más abundantes que las BCL libres.

Las dos clases de esfingolípidos presentes en plantas en mayor proporción son las glucosilceramidas y los derivados de la inositolfosforilceramida. En ambos tipos de compuestos, la cabeza polar (glucosa e inositolfosfato, respectivamente) está unida al C-1 de la ceramida correspondiente. (Lynch *et al.*, 2009). Existen tres grupos de esfingolípidos, los cuales se clasifican dependiendo de la cabeza polar que presentan: las esfingomielinas, los glicosfingolípidos y los gangliósidos. Las esfingomielinas tienen fosocolina o fosfoetanolamina como cabeza polar. Los glicosfingolípidos suelen tener uno o más azúcares unidos al carbono C-1 de la ceramida; dependiendo del azúcar unido pueden ser clasificados como cerebrósidos, con un sólo azúcar unido, o como globósidos, con dos o más azúcares unidos. Los gangliósidos son los esfingolípidos más complejos al tener oligosacáridos como cabeza polar y uno o más residuos de ácido-*N*-acetilneurámico o ácido siálico, lo cual los diferencia de los globósidos (Chen *et al.*, 2009).

Las diferencias entre las moléculas de esfingolípidos son los tipos de cabeza polar, y en la parte hidrofóbica, el tamaño, grado de hidroxilaciones, el número y posiciones de dobles enlaces en el ácido graso y en la base de cadena larga. Dichas diferencias generan una gran variedad de tipos de esfingolípidos en las plantas; hasta ahora se conocen más de 200 tipos de esfingolípidos diferentes. La proporción de esfingolípidos suele depender de la especie, pero también puede variar dependiendo del tipo de célula en un mismo organismo.

Los esfingolípidos de plantas pueden dividirse en cuatro grupos de estructuras generales: las glucosilinositolfosforilceramidas, las glucosilceramidas, las ceramidas y las BCL libres (Pata *et al.*, 2009). Las estructuras de estos tres grupos se ilustran en la Figura 1.5.

2.2.2.3.2. Síntesis de esfingolípidos.

El metabolismo de esfingolípidos suele considerarse en tres pasos principales: síntesis de esfinganina y sus cambios, transformación de ceramida a esfingolípidos; y modificaciones a las BCL y a las cadenas de ácidos grasos.

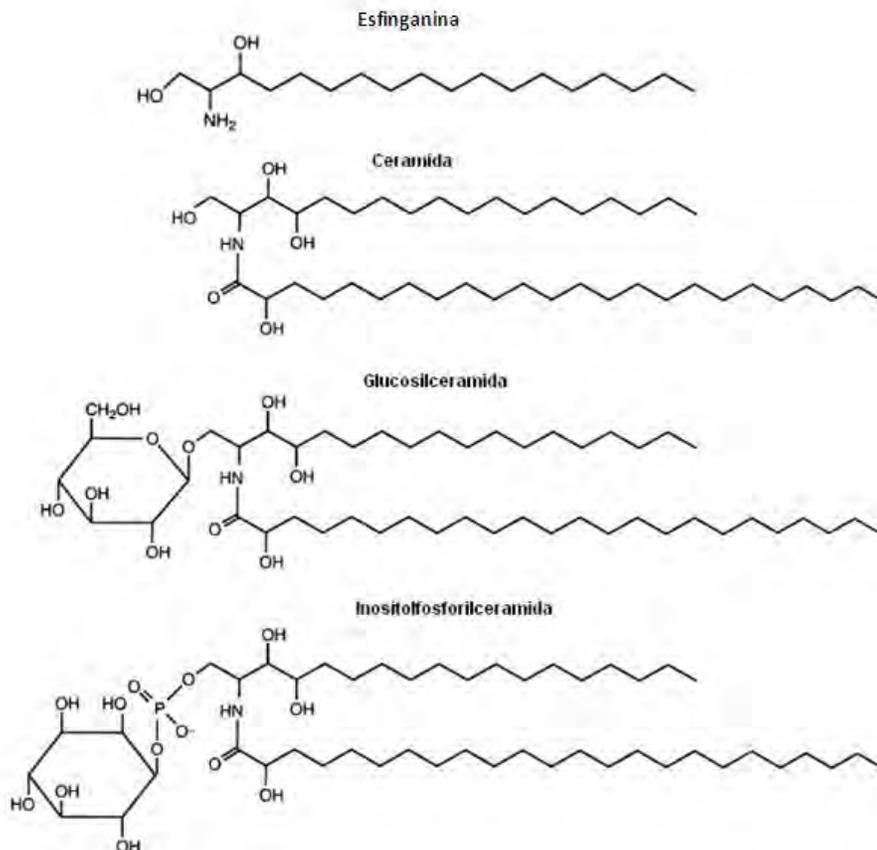


Figura 1. 5 Estructura de esfingolípidos complejos presentes en plantas y moléculas precursoras (Lynch y Dunn, 2004).

La síntesis de esfinganina involucra dos reacciones consecutivas: la condensación de palmitoil-CoA y serina formando 3-ceto esfinganina, catalizada por la enzima serina-palmitoiltransferasa, a la que sigue la reducción de este compuesto por medio de una reacción dependiente de NADPH que es catalizada por la 3-ceto esfinganina reductasa. La actividad de la enzima serina palmitoil transferasa es considerada como un paso importante en la regulación de la síntesis de esfingolípidos. Una vez formada la esfinganina, ésta puede tener tres posibles destinos: puede acilarse formando una ceramida mediante un enlace amida, puede fosforilarse, formando la esfinganina-1-fosfato, o bien, puede hidroxilarse formando la 4-hidroxi esfinganina (ver Figura 1.6).

La ceramida producida mediante la acilación de la esfinganina va a ser sustrato para la formación de esfingolípidos complejos como la glucosilceramida y la inositolfosforilceramida. La síntesis de glucosilceramida requiere de UDP-glucosa como donador de glucosa, mientras que la síntesis de inositolfosforilceramida suele obtener al inositolfosfato del fosfatidilinositol. Las modificaciones que sufren los LCFA (long chain fatty acid) para formar

VLCF (very long chain fatty acid) involucran enzimas de elongación, las cuales parten generalmente de ácido palmítico como sustrato, añadiendo de dos en dos carbonos y utilizando malonil-CoA como donador de los carbonos. Además de la elongación, los VCLFA pueden ser hidroxilados. Bromeley *et al.* (2003), encontraron que las hidroxilaciones en VCLFA en frijol (*Phaseolus vulgaris*) suelen presentarse principalmente en el carbono α . Dicha hidroxilación es realizada por una α -hidroxilasa, la cual ha sido estudiada en otras plantas y organismos (Sperling y Heinz, 2003; Gaidd *et al.*, 2005).

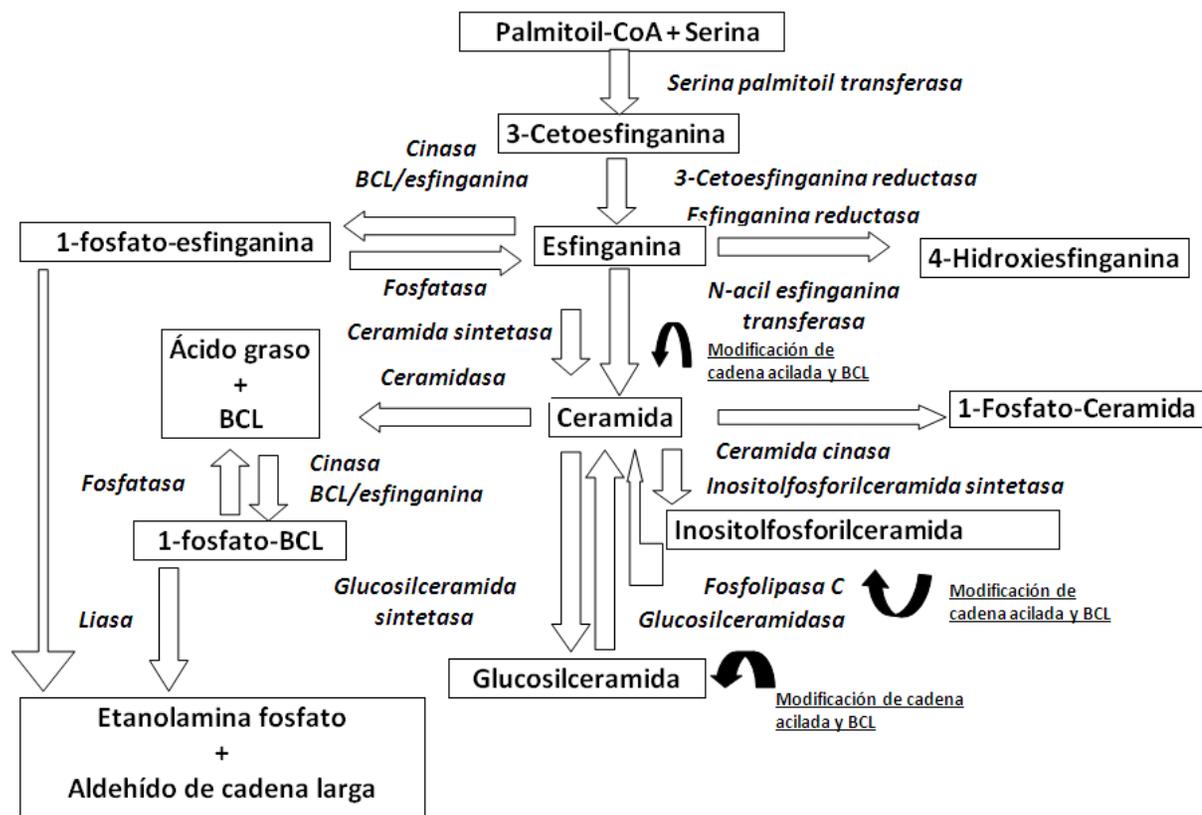


Figura 1. 6 Vía de síntesis de esfingolípidos en plantas. Reacciones enzimáticas (flechas blancas), enzimas involucradas (letras en cursiva), productos y/o sustratos (enmarcados), modificaciones a cadenas de ácidos grasos y a BCL (letras subrayadas) (Lynch y Dunn, 2003).

Se cree que las modificaciones a las BCL ocurren posteriormente a la formación de las ceramidas. Las principales modificaciones a las BCL corresponden a las insaturaciones en el C-8, C-4 y la hidroxilación en el C-4 (Wright *et al.*, 2003). Los tres procesos son independientes, pero la combinación genera una gran variedad de esfingolípidos (Figura 1.7).

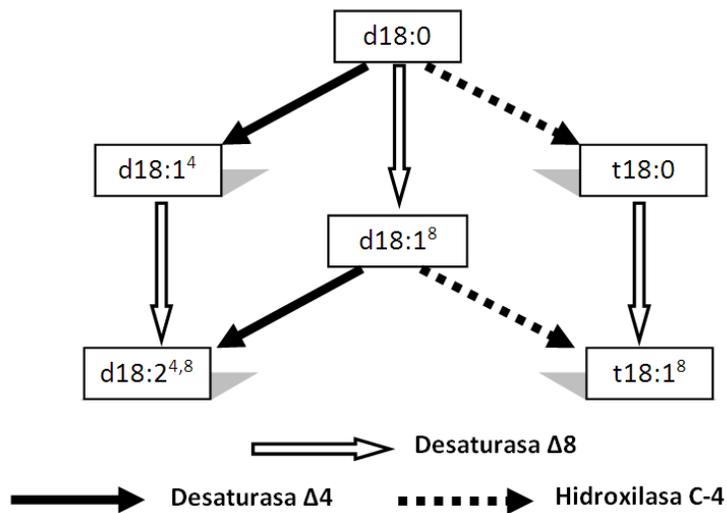


Figura 1. 7 Modificaciones de las BCL. La flecha negra representa la actividad de la enzima desaturasa $\Delta 4$, encargada de la insaturación en el C4. La flecha blanca representa la desaturasa $\Delta 8$ encargada de la insaturación en el C8. Finalmente, la flecha punteada representa la enzima hidroxilasa del C4, encargada de la hidroxilación en el C4 de las BCL (Lynch y Dunn, 2003).

La enzima hidroxilasa C-4 de BCL cataliza la introducción de un grupo hidroxilo al C-4 en BCL dihidroxiladas, a partir de una reacción acoplada a NADPH y O_2 en presencia de protones libres. El proceso de hidroxilación del C-4 ha mostrado gran importancia en el crecimiento y viabilidad en *Arabidopsis*. De igual manera, la síntesis de BCL trihidroxiladas tiene un papel importante en el mantenimiento de la composición de ácidos grasos de esfingolípidos y el contenido total de esfingolípidos en *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2008). *Arabidopsis* presenta dos enzimas hidroxilasas de BCL: SBH1 y SBH2 (Sphingoid Base Hydroxylase), de las cuales el gene correspondiente a la *SBH1* es el más expresado. Ambas enzimas se localizan en el Retículo Endoplásmico (Gaidd *et al.*, 2005; Markham *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Pata *et al.*, 2009)

La insaturación en el C-8 es modificada a partir de la actividad de la enzima desaturasa- $\Delta 8$ de BCL, la cual se ha demostrado tener bifuncionalidad estereoespecífica al poder realizar insaturaciones en posiciones *cis* y *trans*. En la mayoría de las plantas, el isómero *trans* es el más abundante, sin embargo, se ha observado que en *Arabidopsis thaliana*, el isómero *cis* se encuentra más enriquecido en glucosilceramidas a comparación de inositolfosforilceramida (Markham *et al.*, 2006). Por otro lado, la enzima desaturasa- $\Delta 4$ de BCL es la encargada de realizar la insaturación en el C-4 de BCL, la cual se presenta principalmente en glucosilceramidas (Lynch y Dunn, 2004).

2.2.2.3.3. Función de los esfingolípidos

La función de los esfingolípidos ha sido ampliamente estudiada en células eucarióticas, sin embargo existe relativamente poca información sobre la función específica en plantas. En general, los esfingolípidos han sido reconocidos como componentes estructurales de las membranas celulares, y también han sido consideradas como moléculas involucradas en la transducción de señales, en la regulación celular, la patogénesis, la respuesta a estrés, la apoptosis y las interacciones célula-célula (Wright *et al.*, 2003). Los papeles de los esfingolípidos en plantas en cada una de las funciones antes mencionadas se presentan a continuación.

2.2.2.3.3.1. Estabilidad membranal

La estabilidad estructural que los esfingolípidos complejos le confieren a la membrana plasmática se ha relacionado a su nivel de hidroxilación, tanto en las cadenas de los ácidos grasos, como en las BCL. De igual manera, los altos niveles de hidroxilaciones en los esfingolípidos han sido asociados a la disminución de permeabilidad de las membranas. Las hidroxilaciones pueden lograr dicha estabilidad al participar en la formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares entre los grupos hidroxilo y los grupos amida de las porciones de las ceramidas de los esfingolípidos. De igual manera, se cree que la presencia de glucosilceramidas altamente hidroxiladas en muchos tejidos de plantas pudieran contribuir a la integridad de la membrana plasmática y del tonoplasto, las cuales son las membranas biológicas más enriquecidas en esfingolípidos, afectando las funciones más críticas y variables de las bicapas como barreras lipídicas (Lynch y Dunn, 2004).

Los esfingolípidos también tienen una función importante en la organización celular. Los esfingolípidos de hongos, mamíferos y plantas tienen la tendencia de asociarse con esteroides específicos formando microdominios dentro de la membrana plasmática llamados balsas lipídicas. Dichos dominios son importantes para el acomodo de proteínas ancladas a lípidos, transporte celular, transducción de señales y fluidez de la membrana. El modelo de las balsas lipídicas sugiere que varios tipos de lípidos no se encuentran uniformemente distribuidos a lo largo de la membrana plasmática, sino esparcidos organizadamente en parches laterales con una composición característica. Muchas proteínas membranales suelen asociarse con balsas lipídicas, las cuales tienen funciones relacionadas a señalización, adhesión, respuesta a estrés y a reacomodo de pared celular (Bath y Panstruga, 2005; Lynch *et al.*, 2003; Pata *et al.*, 2009).

2.2.2.3.3.2. Señalización y regulación celular

Recientemente, se han encontrado dos papeles de esfingolípidos en la señalización celular en plantas. En diferentes estudios se ha observado que las BCL libres en altas

concentraciones, en especial esfinganina-1-fosfato o fitoesfingosina-1-fosfato presentan un efecto negativo en el crecimiento y viabilidad (Lynch y Dunn, 2004). Según un estudio con células de avena, se encontró que las BCL libres estaban involucradas en la actividad de reacciones óxido-reducción (Pata *et al.*, 2009). La esfinganina-1-fosfato juega un papel importante en la transducción de la señal de falta de agua en células guardia dependiente de ácido abscísico, funcionando como mediador en el cambio de volumen que lleva al cierre de los estomas (Sperling y Heinz, 2003. Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2005).

2.2.2.3.3.3. Respuesta a estrés

Se ha encontrado que los esfingolípidos le confieren estabilidad a las membranas de plantas en situaciones de estrés debido a sequía, bajas temperaturas y congelamiento (Wright *et al.*, 2003; Sperling y Heinz, 2003). La porción de glucosilceramidas en las membranas plasmáticas suele ser menor en plantas resistentes al congelamiento que en plantas sensibles, además el contenido de glucosilceramida se ha visto disminuido una vez que la planta ha sido expuesta a un clima frío. Por otro lado, el nivel de α -hidroxi-VCLFA monoinsaturados, aumenta en plantas resistentes al frío y se cree que tiene una influencia en el cambio de la temperatura de transición de la membrana (Lynch y Dunn, 2004; Sperling y Heinz, 2003).

En células animales, se ha encontrado que glucosilceramidas con BCL trihidroxiladas y α -hidroxi-VCLFA aumentan la estabilidad de la membrana y reducen la permeabilidad de los iones. Esto mismo se ha propuesto para glucosilceramidas en plantas (Pata *et al.*, 2009).

2.2.2.3.3.4. Patogénesis

Diferentes estudios han demostrado la participación de glucosilceramida en interacciones planta-patógeno. Por ejemplo, se ha encontrado que la producción de esporangios en hongos como *Schizophyllum commune* es estimulada por la presencia de 8-esfingenina, 4,8-diesfingenina y otras especies de glucosilceramidas, lo cual ha mostrado una dependencia de la presencia de la insaturación en el C8 de la BCL en la patogénesis (Lynch y Dunn, 2004; Sperling y Heinz, 2003; Pata *et al.*, 2009).

Estudios más recientes han mostrado que algunos cerebrósidos de hongos funcionan como estimulantes de la muerte celular hipersensible, la acumulación de fitoalexinas y una resistencia a infecciones a patógenos posteriores en la planta. Otra evidencia de la patogénesis de esfingolípidos es el aumento de la expresión de la enzima serina palmitoiltransferasa durante la respuesta hipersensible o de hipersensibilidad (HR) (ver Figura 1.5) (Lynch y Dunn, 2004; Sperling y Heinz, 2003; Pata *et al.*, 2009).

En levadura (*S. cerevisiae*), se ha observado que el gene *IPT1* que codifica para la manosa-(inositol-fosfato)₂-ceramida sintetasa, determina la sensibilidad contra una defensa

antifúngica en plantas. Estos datos se basan en el modelo en el que las balsas lipídicas que contienen glucosilinositolfosforilceramida pueden actuar como sitios de unión para las defensinas de plantas o pueden ser requeridas como anclaje para proteínas membranales (Lynch y Dunn, 2004; Pata *et al.*, 2009).

2.2.2.3.3.5. Muerte celular programada

La ceramida se ha reconocido como inductor de la apoptosis o muerte celular programada (MCP). Liang y colaboradores (2003) encontraron que el balance entre la ceramida y sus derivados fosforilados es importante en la modulación de MCP en plantas en respuesta contra patógenos y en respuestas de señalización a estrés. Por otro lado, el aumento de BCL libres en plantas ha sido asociado con la inducción de MCP (Pata *et al.*, 2009).

2.2.3. Proteínas de membrana

La gran variedad de proteínas asociadas a la bicapa lipídica refleja la diversidad de funciones enzimáticas y estructurales que dichas proteínas presentan. Según el modelo del mosaico fluido, las proteínas membranales pueden dividirse en dos grupos, proteínas integrales y proteínas periféricas (Buchanan *et al.*, 2000).

Las proteínas integrales se encuentran firmemente asociadas a la membrana debido a las interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de la membrana y los dominios hidrofóbicos de las proteínas. Se encuentran atravesando la bicapa lipídica, por lo que también son conocidas como proteínas intrínsecas. Dentro de las proteínas integrales o intrínsecas, pueden dividirse a su vez en dos grupos: las proteínas transmembranales, las cuales atraviesan de cara a cara la bicapa lipídica y las proteínas asociadas a una monocapa (caras interna o externa). Ambos tipos de proteínas integrales pueden ser removidas únicamente por agentes como detergentes, solventes orgánicos o desnaturalizantes, que afecten las fuertes interacciones hidrofóbicas. La naturaleza y tamaño de los dominios hidrofóbicos de estas proteínas pueden variar, desde una única región hidrofóbica interna, hasta grandes y diferentes regiones, incluso las interacciones hidrofóbicas pueden darse entre los lípidos de las membranas y los grupos aminos y carboxilos terminales de las proteínas. Varias familias de proteínas integrales proveen puntos específicos de anclaje para las interacciones célula-célula o entre células-proteínas extracelulares, lo cual puede estar involucrado en diferentes procesos, como en la acumulación de plaquetas en heridas, en la reparación de tejido, en la actividad de células del sistema inmune, etc.. Además, las proteínas integrales sirven como proteínas transportadoras, como canales de iones, receptores de hormonas, neurotransmisores, entre otras funciones (Nelson y Cox, 2000).

Las proteínas periféricas se encuentran unidas a la membrana plasmática por medio de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre los dominios hidrofílicos de las proteínas y las cabezas polares de los lípidos membranales. A diferencia de las proteínas integrales, las proteínas periféricas son en ser removidas por tratamientos suaves que interfieren con las interacciones electrostáticas o rompen los puentes de hidrógeno. Algunas proteínas periféricas se unen covalentemente a diferentes lípidos de las membranas, conocidas como proteínas ancladas a lípidos; principalmente se unen a ácidos grasos de cadena larga, a compuestos isoprenoides, o a compuestos glicosilados derivados del fosfatidilinositol (GPI). El anclaje hidrofóbico formado por la unión a lípidos inserta a las proteínas dentro de la bicapa lipídica y las sostiene en la superficie. Las proteínas periféricas se encuentran localizadas en las caras externas (extracelular) e internas (citosólica) de las membranas. El lípido asociado a la proteína parece tener un papel específico, por ejemplo, las proteínas ancladas a GPI suelen encontrarse en la cara extracelular, mientras que el anclaje a otro tipo de lípidos suele encontrarse predominantemente en la cara citosólica; es por lo mismo que se piensa que la unión a lípidos específicos puede tener una función al localizar las proteínas en los lugares correctos dentro de las membranas (Nelson y Cox, 2000).

Gran parte de la permeabilidad selectiva de las membranas plasmáticas se debe a la función de proteínas transportadoras en la membrana; pueden ser proteínas tipo bomba (impulsadas por energía generada por la hidrólisis de ATP); proteínas acarreadoras o translocadoras, o canales iónicos.

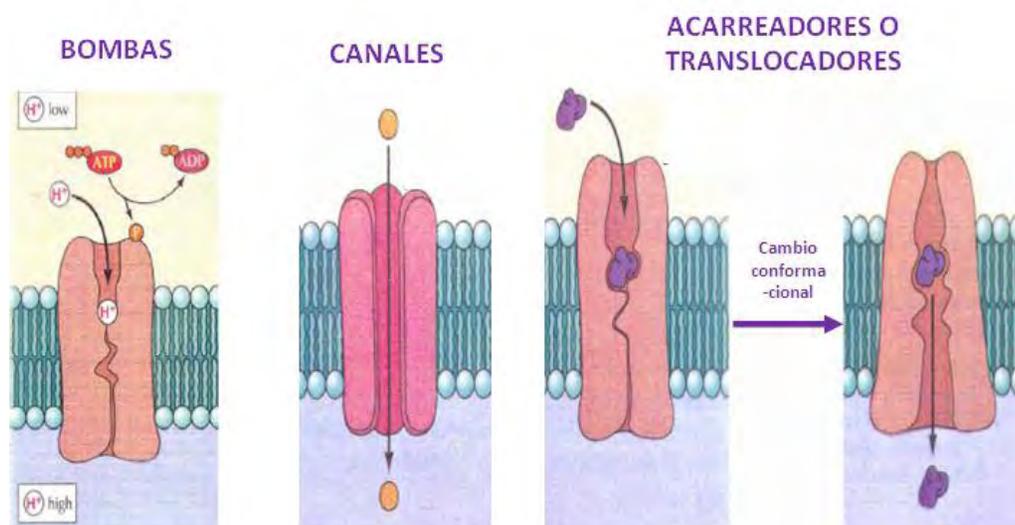


Figura 1. 8 Mecanismos de transporte de solutos a través de proteínas membranales. Se muestran las bombas, los canales y las proteínas acarreadoras (Nelson y Cox, 2000).

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman un poro en su interior por donde atraviesan los solutos. El tamaño del poro es particular, dejando pasar moléculas o iones de cierto tamaño, por lo que son ligeramente inespecíficos. La dirección del transporte va a favor del gradiente de concentración del soluto transportado. La apertura de los canales se señala por unión de ligandos a la proteína formadora del canal o bien, por un cambio de voltaje en la membrana. Este tipo de transportadores presentan una cinética no-michaeliana o de saturación.

Las proteínas acarreadoras son proteínas transmembranales que mueven solutos de uno a otro lado de la membrana sufriendo cambios conformacionales (Figura 1.8). La dirección del transporte va a favor del gradiente de concentración del soluto. A diferencia de los canales iónicos, las proteínas translocadoras presentan una cinética michaeliana, es decir, la enzima se satura de soluto, teniendo valores cinéticos como V_{max} y K_M .

Las bombas son proteínas transmembranales que requieren de energía para transportar el soluto en contra de su gradiente de concentración. La energía requerida se obtiene a partir de una reacción catalítica, la cual es generalmente la hidrólisis de ATP, por lo mismo, dichas bombas son también conocidas como ATPasas. El sitio de catálisis se encuentra en la región hidrofílica de la proteína y en la cara intracelular de la bicapa lipídica, mientras que la región de transporte involucra regiones hidrofílicas pero principalmente hidrofóbicas de la proteína. Las ATPasas al igual que las proteínas acarreadoras presentan una cinética michaeliana.

2.3. ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

Como se mencionó anteriormente, un tipo de transporte celular es mediado por proteínas membranales conocidas como bombas, las cuales requieren de energía proporcionada por la hidrólisis de ATP para transportar el soluto en contra del gradiente de concentración. Existen tres diferentes tipos de ATPasas que transportan diferentes tipos de solutos, tienen estructuras, mecanismos y localizaciones diferentes. Éstas son clasificadas como ATPasas tipo-P, tipo-V y tipo-F.

Las ATPasas tipo-V son enzimas presentes en hongos y plantas que se encuentran embebidas en la membrana de vacuolas. Se encargan principalmente de regular el pH intracelular, manteniendo un valor entre 3 y 6. También se encargan de acidificar lisosomas, endosomas, el Aparato de Golgi, y vesículas excretoras. Están estructuralmente relacionadas a las ATPasas de tipo-P, sin embargo, las ATPasas tipo-V no son fosforiladas en el ciclo catalítico y no son inhibidas por vanadato.

Las ATPasas tipo-F juegan un papel importante en reacciones de conservación de la energía y se localizan en las membranas interiores de mitocondrias y cloroplastos. Estas bombas catalizan reversiblemente el transporte de H^+ a partir de la hidrólisis de ATP. Debido

a la reversibilidad de la reacción, son también conocidas como ATP sintetasas (Nelson y Cox, 2000). Al encontrarse en este tipo de organelos, su función principal es la síntesis de ATP.

Las ATPasas tipo-P son enzimas que durante el ciclo catalítico de transporte de cationes son fosforiladas reversiblemente por el ATP. La mayoría de las ATPasas tipo-P presentan secuencias de aminoácidos similares, especialmente cerca al residuo que es fosforilado, generalmente el residuo es un aspártico cercano al extremo carboxilo de la cadena polipeptídica. Todas las ATPasas tipo-P son sensibles a la inhibición por el vanadato, el cuál es una molécula estructuralmente análoga al fosfato del ATP. La mayoría de las ATPasas tipo-P se encuentran esparcidas en diferentes regiones de la membrana plasmática. Esta familia de ATPasas incluye a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas y hongos, la ATPasa de Na^+/K^+ de membranas de células animales, la ATPasa de Ca^{2+} de plantas y animales, entre otras (Duby y Boutry, 2009).

Una de las ATPasas tipo-P de plantas que han sido más estudiada es la ATPasa de Ca^{2+} . Las bombas de calcio se encuentran distribuidas en la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, en el cloroplasto y en la membrana de vacuola. Estas bombas se encargan de regular la concentración del ión Ca^{2+} en el citosol, teniéndolo alrededor de 0.2 μM , expulsando a los iones fuera del citosol. Dicha concentración es esencial en todas las células para prevenir la precipitación de fosfatos, y en células eucariotas se ha encontrado que dicha regulación es importante en la respuesta a estímulos. La estructura de las diferentes ATPasas de Ca^{2+} cambia dependiendo de la membrana en la que se encuentran embebidas. En diferentes estudios se han encontrado muchas similitudes de estructura y mecanismos entre las bombas de Calcio y la ATPasa de H^+ en plantas (Buchanan *et al.*, 2000).

La ATPasa de H^+ de membrana plasmática es una ATPasa tipo-P que se encuentra exclusivamente en membranas plasmáticas de plantas y hongos. La principal función de la ATPasa de H^+ es proveer una fuente de energía para el transporte de nutrientes hacia dentro de la célula. La enzima se encarga del transporte de protones hacia fuera de la célula en contra de su gradiente de concentración a partir de la hidrólisis de ATP, lo cual genera un potencial electroquímico en la membrana alrededor de -250 mV, además de acidificar el espacio apoplástico alcanzando un pH de 5-6. Debido al gradiente electroquímico generado, los solutos entran a la célula, por ejemplo, los cationes son atraídos por el potencial y la carga negativa al interior, por lo que entran por canales pasivos. Cationes, aniones y solutos neutros entran a través de diferentes proteínas acarreadoras, cuya energía de transporte es otorgada por la entrada simporte de protones. De esta manera, la mayoría de las proteínas transportadoras de la membrana plasmática obtienen su energía indirectamente a partir de la

ATPasa de H^+ con proteínas 14-3-3 será desglosada más adelante, ya que su importancia recae en la regulación de la enzima (Nelson y Cox, 2003).

Se cree que las ATPasas tipo-P suelen presentarse en dos principales conformaciones, E_1 y E_2 . La forma E_1 tiene alta afinidad por ATP y el ión que va a ser transportado fuera del citoplasma. La forma E_2 tiene baja afinidad por ambos ligandos, pero una alta afinidad por el inhibidor vanadato. El transporte del catión a través de la membrana está asociado al cambio conformacional entre E_1 y E_2 (Figura 1.10); el catión entra desde el citoplasma y se une a la enzima con la conformación E_1 , posteriormente el residuo de un ácido aspártico es fosforilado formando E_1P la cual es convertida en E_2P . El catión está unido ahora a la enzima con la conformación de menor afinidad, por lo que es liberado del otro lado de la membrana. El fosfato unido al residuo del ácido aspártico es liberado por hidrólisis y la forma E_2 se revierte a la forma E_1 (Palmgren, 2001).

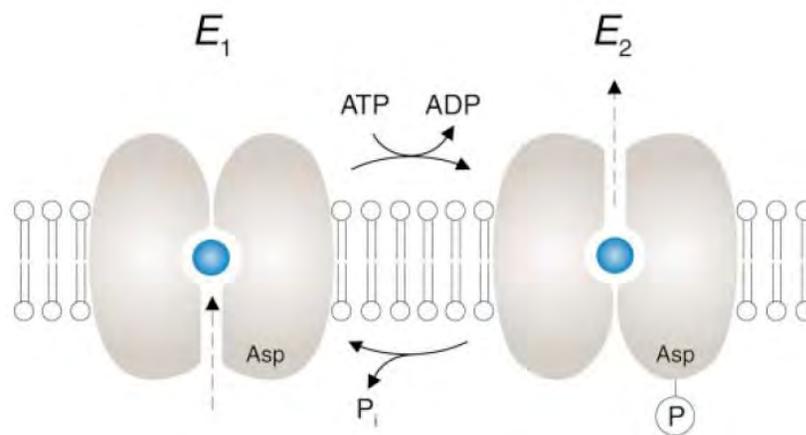


Figura 1. 10 Modelo del mecanismo de transporte de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. El H^+ se une a un sitio de unión específico. En la conformación E_1 , el sitio de unión es accesible desde el lado citoplásmico de la membrana. En la conformación E_2 , el sitio de unión es accesible desde el lado extracelular de la membrana. Las diferencias de afinidad determinan si el protón se une o se libera (Palmgren, 2001).

A partir de la secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* en el año 2000, se han identificado 12 genes que codifican para ATPasas de H^+ de membrana plasmática, conocidas como AHAs. Filogenéticamente, las AHAs se dividen en tres grupos basados en la secuencia de aminoácidos: el primer formado por AHA1, AHA2, AHA3 y AHA5; el segundo grupo formado por AHA6, AHA8 y AHA9; y el tercer grupo lo forman AHA4, AHA7, AHA10 y AHA11, más el pseudogene de AHA12, lo cuales se dividen en otras tres ramas. Hasta ahora, no se ha logrado dilucidar una asociación entre las familias de AHAs y funciones fisiológicas específicas.

2.3.2. Localización

Como se mencionó anteriormente (sección 1.2.2.3.3), actualmente se cuenta con un modelo de membrana plasmática que habla sobre la organización de cierto tipo de lípidos, en especial de esfingolípidos, distribuidos sin uniformidad a lo largo de la bicapa lipídica, formando microdominios conocidos como balsas lipídicas. Estas estructuras se han analizado a través de varios procedimientos, entre ellos a su resistencia a la solubilización por detergentes (DRM). En dichas estructuras de membranas plasmáticas de plantas, se ha identificado la presencia de diferentes proteínas membranales, dentro de las que destaca la ATPasa de H⁺ y las acuaporinas (Morel *et al.*, 2006).

Todas las isoformas AHAs con excepción de la AHA3, AHA7 y AHA8 han sido detectadas en DRMs. Dicha asociación sugiere que la membrana plasmática contiene diferentes nichos en los que es requerida la función de la ATPasa de H⁺ y dentro de las cuales destacaría su participación como receptor de señales extracelulares. Los genes de *AHA1* y *AHA2* se han encontrado expresados en todos los tejidos de la planta, por lo que se cree que tienen función de genes de mantenimiento doméstico (*housekeeping*) requerida en la homeostasis iónica. La expresión de *AHA3* se ha localizado en las células del floema, el cual consiste en el tejido conductor encargado del transporte de moléculas orgánicas, como azúcares. Las isoformas *AHA3*, *AHA4* y *AHA11* también suelen expresarse ampliamente a lo largo de la planta, sin embargo no se expresan al mismo nivel. Se ha observado que *AHA4* tiene cierta especificación en endodermis de raíz; *AHA1*, *AHA2*, *AHA3* y *AHA11* se encuentran en mayor proporción en plantas. Por otro lado, los patrones de expresión de las *AHA5*, *AHA6*, *AHA7*, *AHA8*, *AHA9* y *AHA10* sugieren que las bombas codificadas por dichos genes tienen una función más especializada (Gaxiola *et al.*, 2007).

2.3.3. Función

La función principal de la ATPasa de H⁺ es bombear protones a través de la membrana plasmática desde el citosol hacia afuera de la célula. Dicho transporte genera un gradiente de concentración de H⁺ y un gradiente eléctrico a través de la membrana plasmática, lo cual provee la fuerza necesaria para el transporte activo de diferentes solutos importantes en la célula, por ejemplo la absorción de nutrientes de la raíz (Worrall *et al.*, 2003). Asimismo, se ha considerado que la ATPasa de H⁺ está involucrada en otros procesos fisiológicos importantes, como la apertura de estomas, la elongación celular, en la respuesta al estrés salino y como un importante regulador de pH dentro y fuera de la célula (Duby y Boutry, 2009).

A partir de diferentes estudios enfocados al análisis de la expresión de las isoformas de los genes *AHA1-12* se ha observado que cada membrana plasmática de cada célula puede

presentar más de una isoforma de ATPasas de H^+ . Esta diversidad significa que la planta requiere ATPasas de H^+ específicas en diferentes momentos del desarrollo de la planta o bien, con funciones especializadas. Hasta ahora no se ha logrado dilucidar la función específica de todas las diferentes isoformas de la ATPasa de H^+ (Sondergaard *et al.*, 2004; Gaxiola *et al.*, 2007).

Los estomas son poros en la superficie de la hoja responsables del intercambio gaseoso (O_2 , CO_2 y H_2O) a nivel de la hoja. La apertura de estomas se debe a la turgencia de las células que los rodean, llamadas células guardia. Estudios inmunológicos han mostrado que la ATPasa de H^+ se encuentra enriquecida en las células guardia. La apertura y cierre de los estomas son controlados por muchos factores. Por ejemplo, una corta exposición a luz azul es suficiente para iniciar el proceso de apertura. La luz azul es registrada por un receptor de las células guardia y la señal es transmitida a la ATPasa de H^+ , la cual inicia el bombeo de H^+ . Se cree que dicha señal de transducción involucra una cinasa que fosforila a la ATPasa de H^+ y promueve la unión de una proteína regulatoria 14-3-3 (Palmgren, 2001).

El crecimiento de una planta y su forma dependen de la división celular y de la elongación de la célula. La elongación celular depende de varios factores, como la turgencia de la célula, la extensibilidad celular, y la síntesis y descomposición de componentes de la pared celular. La teoría llamada “teoría del crecimiento ácido” propone que los protones bombeados hacia fuera de la célula por parte de la ATPasa de H^+ provoca la disminución del pH en el espacio apoplástico, lo cual activa enzimas involucradas en la modificación estructural de los componentes de la pared celular, que al relajarse, generan un mayor espacio apoplástico que es aprovechado por la célula para expandirse (Duby y Boutry, 2009).

Se ha propuesto que la ATPasa de H^+ juega un papel importante en la tolerancia al estrés salino. Las células de plantas son más sensibles a Na^+ que las células animales a pesar de no contar con una bomba de Na^+/K^+ . La regulación de iones Na^+ en plantas es controlado por un transportador-antiporte de Na^+/H^+ , cuya actividad depende en el gradiente de pH generado por la ATPasa de H^+ (Duby y Boutry, 2009).

Además de la regulación de iones, el transporte de compuestos orgánicos también depende de la actividad de la ATPasa de H^+ . La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática se encuentra altamente concentrada en células del floema, lo que sugiere que es crucial en la carga de sacarosa y otros compuestos a este tejido. La ATPasa se encuentra enriquecida en las células acompañantes del floema, las cuales también son ricas en mitocondrias y por lo tanto pueden sintetizar grandes cantidades de ATP requeridas por la bomba de protones. La carga de sacarosa es mediada por un transportador co-simporite H^+ /sacarosa (Palmgren, 2001).

2.3.4. Regulación.

La regulación de la ATPasa de H^+ se realiza con mayor eficiencia a nivel post-traducciona, ya que los cambios en la transcripción y expresión de la proteína son muy bajos al exponer a las plantas a diferentes estímulos, tales como diferentes concentraciones de sal, azúcares, a sequía o bajas temperaturas. Los genes que codifican para las diferentes isoformas de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, muestran una regulación baja en respuesta a estrés de nutrientes o a diferentes condiciones ambientales (Gaxiola *et al.*, 2007; Speth *et al.*, 2010).

La regulación a nivel post-traducciona incluye dos procesos principales que están relacionados. La primera se refiere a la fosforilación/defosforilación de proteínas, lo cual altera la actividad de la misma. La segunda se refiere a la autoinhibición de las ATPasas de H^+ a partir de su dominio regulador (dominio R, Figura 1.5), el cual es fosforilable. Ambos procesos involucran la unión de las proteínas 14-3-3 al dominio R. El dominio regulador de las ATPasas de H^+ está constituido por una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos en el carboxilo terminal, que presenta por lo menos un residuo propenso a ser fosforilado (Alsterfjord *et al.*, 2004). Cuando este residuo es fosforilado impulsa la activación de la enzima. En plantas, la fosforilación ocurre en el penúltimo residuo, una treonina (Thr947 en AHA2) (Palmgren, 2001; DUBY *et al.*, 2009), promoviendo la unión a proteínas regulatorias 14-3-3, las cuales desplazan al dominio R que activa a la enzima. Otros estudios, han mostrado que en la enzima de Arabidopsis hay otros sitios propensos a ser fosforilados en el carboxilo terminal (Ser-899 y Ser-904) (Palmgren, 2001; Alsterfjord *et al.*, 2004; Gaxiola *et al.*, 2007). Si la unión de proteínas 14-3-3 al dominio-R provoca la activación de la ATPasa de H^+ , la reacción inversa necesita de la defosforilación del residuo correspondiente mediada por una proteína fosfatasa. En maíz se ha logrado purificar una fosfatasa 2A que se cree pudiera ejecutar la defosforilación, inactivando la ATPasa de H^+ (Palmgren, 2001).

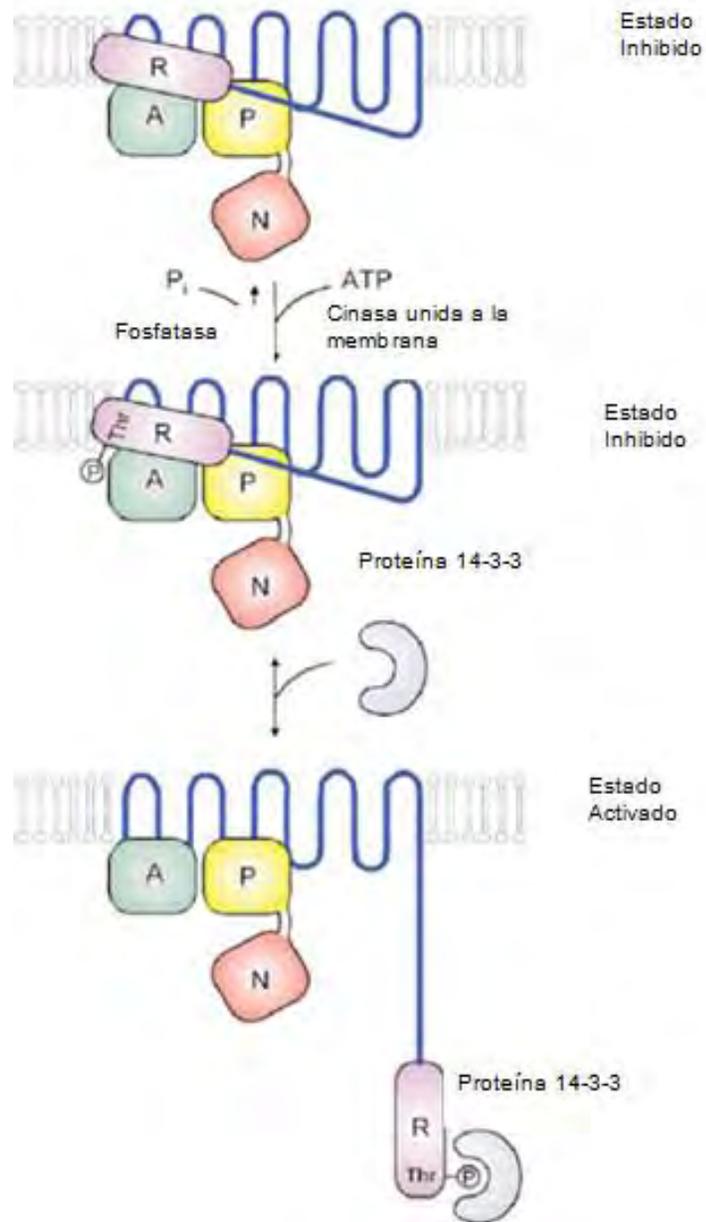


Figura 1. 11 Regulación post-translación de la ATPasa de H^+ (Palmgren, 2001).

3. ANTECEDENTES

Con el fin de determinar la importancia funcional de la hidroxilación de las BCL en los esfingolípidos de plantas, Chen *et al.* (2008) generaron y caracterizaron líneas mutantes de *A. thaliana* con inserciones en los genes que codifican a las hidroxilasas C4, responsables de la tercera hidroxilación de BCL en la síntesis de esfingolípidos. Las hidroxilasas se han denominado SBH1 y SBH2. Las plantas mutantes presentaban una reducción en BCL trihidroxiladas, como se esperaba, pero se encontró que también presentaban un aumento en BCL dihidroxiladas. En estas plantas de las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh2-1* no se observaron defectos en el crecimiento en comparación con la silvestre, sin embargo, se observó que a medida que disminuía la cantidad de BCL trihidroxiladas en la planta, el crecimiento era más lento. Por otro lado, también se encontró que mientras disminuía la cantidad de BCL trihidroxiladas, se presentaba un aumento en la cantidad de esfingolípidos totales en peso seco. La doble mutante, una línea que contenía mutaciones en los genes codificantes de las dos hidroxilasas, presentaba defectos mayores en su desarrollo.

Meza-Bernal (2008) estudió a una de las líneas de *A. thaliana* mutantes de Chen *et al.* 2008, la *Atsbh1-1*, que contiene al gen mutado que codifica para la hidroxilasa SBH1. En esta mutante, Meza Bernal detectó características fenotípicas que no habían sido descritas por Chen y colaboradores, por ejemplo la presencia de clorosis en las puntas de las hojas en las líneas mutantes, un color y forma de la hoja diferentes para la línea mutante y la silvestre, y la pérdida de turgencia más rápidamente una vez cortada la hoja en la línea mutante en comparación con la silvestre. El fin de ese trabajo era caracterizar las membranas plasmáticas de la mutante *Atsbh1-1*. Para ello se realizaron determinaciones de pureza de las VMP por la actividad de enzimas marcadoras y a partir del análisis ultraestructural por microscopía electrónica. También se realizaron ensayos de hidrólisis de ATP, en los cuales se determinaba la pureza de las membranas y la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. La actividad de la ATPasa de H⁺ presentó una disminución del 75% en las VMP de la línea mutante *Atsbh1-1* en comparación con las de la línea silvestre en preparaciones de alta pureza. Estos resultados sugirieron que la actividad de la enzima ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática podría encontrarse modulada directamente por BCL trihidroxiladas o por BCL dihidroxiladas formando parte de esfingolípidos complejos, ya que podrían ser las responsables de crear un ambiente propicio para que la enzima fuera activa. Las BCL libres también podrían estar involucradas, sin embargo, debido a que los niveles de BCL libres en las membranas plasmáticas de Arabidopsis son muy bajos (Markham *et al.*, 2006), era probable que la diferencia de actividades de la ATPasa de H⁺

entre la mutante y la silvestre se debiera principalmente a un efecto de los esfingolípidos complejos con BCL trihidroxiladas.

Considerando estos antecedentes, se decidió corroborar la influencia del grado de hidroxilaciones de las BCL sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ utilizando otra línea mutante, *Atsbh1-2*, la cual presenta una mutación independiente en el mismo gene que la *Atsbh1-1*. Por otro lado, se decidió determinar si el grado de hidroxilación de las BCL influye en la actividad de la ATPasa de H⁺.

4. HIPÓTESIS

Mutaciones en el gene de la hidroxilasa SBH1 producen una inhibición en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática al igual que un cambio en la estabilidad de la estructura de la membrana plasmática.

Lo anterior implica que la hidroxilación de las BCL de los esfingolípidos complejos es importante para la actividad de la enzima.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos generales

- Comprobar la pureza de las fracciones membranales obtenidas de la línea silvestre y de la mutante en la hidroxilasa SBH1.
- Corroborar la influencia del grado de hidroxilación de las BCL de esfingolípidos de *A. thaliana* sobre la actividad de la enzima membranal ATPasa de H⁺, usando la línea mutante *Atsbh1-1* y explorar el mismo efecto en la línea mutante *Atsbh1-2*.
- Determinar la influencia del grado de hidroxilación de las BCL de esfingolípidos de *A. thaliana* sobre la estabilidad de la ATPasa de H⁺ expuesta a una temperatura alta.

5.2. Objetivos particulares

- Sembrar y cosechar plantas adultas de tres líneas de *Arabidopsis thaliana*: Col-0, *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*. Obtener tres fracciones subcelulares de cada línea: fracción de homogenado, fracción microsomal y fracción de vesículas de membrana plasmática.
- Establecer las condiciones ideales para la técnica de réplica en Western de proteínas membranales de hojas de una línea mutante de *Arabidopsis thaliana* optimizándola en cuanto a concentraciones de anticuerpos, tipo de bloqueador y tipo de revelado.
- Determinar la pureza de las fracciones subcelulares obtenidas a través de réplicas en Western con diferentes anticuerpos y ensayos de actividad hidrolítica de ATP de la ATPasa de H⁺.
- Realizar ensayos de hidrólisis de ATP con vesículas de membrana plasmática de las líneas de *A. thaliana* silvestre Col-0 y de las mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* para determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.
- Incubar vesículas de membrana plasmática de las líneas silvestre Col-0 y mutante *Atsbh1-1* de *A. thaliana* durante diferentes periodos a una temperatura de 29°C para después realizar ensayos de hidrólisis de ATP y determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

a. Anticuerpos utilizados para las réplicas en Western.

Los anticuerpos utilizados reaccionan contra los siguientes antígenos proteicos:

- i. ATPasa de H^+ , localizada en la membrana plasmática (Agrisera, AS07 206)
- ii. Oxidasa alterna, localizada en la membrana interna mitocondrial (Agrisera, AS04 054A).
- iii. Psb-A, localizada en las membranas tilacoidales del cloroplasto. (Agrisera, AS05 084)
- iv. Subunidad E de la ATPasa de H^+ , localizada en la membrana de las vacuolas (tonoplasto). (Agrisera, AS07 213)

b. Plantas de *Arabidopsis*.

Plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*, líneas silvestres y mutantes Col-0 y *Atsbh1-1*, proporcionadas por el Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, EU). La línea silvestre tiene el genotipo intacto del ecotipo Col-0. La mutación en la línea *Atsbh1-1* consiste en una inserción de T-DNA en el gene de la hidroxilasa SBH1, que conduce a un defecto en las hidroxilaciones de la bases esfingoideas de los esfingolípidos presentes en la membrana plasmática de las células de la planta.

6.2. Metodología

6.2.1. Crecimiento de las plantas.

Se germinaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (silvestre y mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*) en agar y se crecieron de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Las semillas se colocan en un tubo eppendorf y se le agrega 1 mL de $NaHClO_4$ al 20% (estéril) y 1 mL de Tween 20 (cf. 0.1%). Se agitan vigorosamente por 20 min.
2. Posteriormente, las semillas se lavan con $NaHClO_4$ al 20% por 10 min con agitación suave.
3. El tubo con las semillas se centrifuga por aproximadamente 10 seg y se elimina el $NaHClO_4$ con micropipeta usando siempre puntas estériles.

4. Las semillas se enjuagan varias veces (un mínimo de 5 veces), cada vez con 1 mL de agua estéril y agitando suavemente durante 30 seg hasta eliminar completamente el NaHClO_4 y el Tween. En cada ocasión, las semillas se centrifugan en la minifuga por 10 seg y se elimina el sobrenadante con una pipeta. Después del último lavado, las semillas se resuspenden en agua estéril.

5. Las semillas desinfectadas se siembran en cajas petri conteniendo el medio de Gamborg B-5/agar al 1% de preferencia en una campana de flujo laminar. El medio de Gamborg se prepara como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 6. 1 Composición y preparación del medio sólido de Gamborg. Se indican las concentraciones finales.

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

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

7. Después de 2 semanas, las plántulas se trasplantan a macetas con sustrato hecho de la mezcla de Mix-4 Agreggate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canadá Ltd.), agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlanepantla, Edo. De México) y vermiculita (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canadá Ltd.). La proporción fue la siguiente 1.5 de Mix-4, 0.5 de vermiculita y 0.5 de agrolita, humedecida con agua estéril. Las semillas se mantienen en el invernadero a 25°C con un fotoperiodo de 8 h de luz por 16 h de oscuridad entre 20 a 24 semanas (las plántulas se riegan cada tercer día).

8. Al cabo de 5 meses se cosechan las hojas de las plantas. Para ello, sólo se utiliza la roseta (parte aérea) de las plantas, se les quitan los restos de sustrato con una brocha y se cortan con tijera las hojas adultas y las jóvenes de buen tamaño e inmediatamente se sumergen en nitrógeno líquido. Se almacena el material biológico a -70°C hasta su uso.

6.2.2. Obtención de fracciones subcelulares

Para los diferentes procedimientos se utilizaron tres diferentes fracciones subcelulares de las líneas silvestre y mutante de *A. thaliana*; fracciones de homogenado (HOM), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP). Las muestras se obtuvieron según la metodología utilizada por Meza Bernal, 2008.

A) La obtención de la fracción microsomal de las líneas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento mostrado en la Figura 6.1.

Las soluciones empleadas para la obtención de fracciones subcelulares de hojas de *Arabidopsis thaliana* se muestra en la Tabla 6.2.

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

- HEPES 500 mM ajustado a pH de 7.8 con BTP
- HEPES 500 mM ajustado a pH de 7.8 con Mes
- DTT 300 mM
- KH₂PO₄ 200 mM ajustado a pH 7.8 con KOH
- EDTA 100 mM ajustado a pH 7.8 con KOH
- KCl 50 mM.

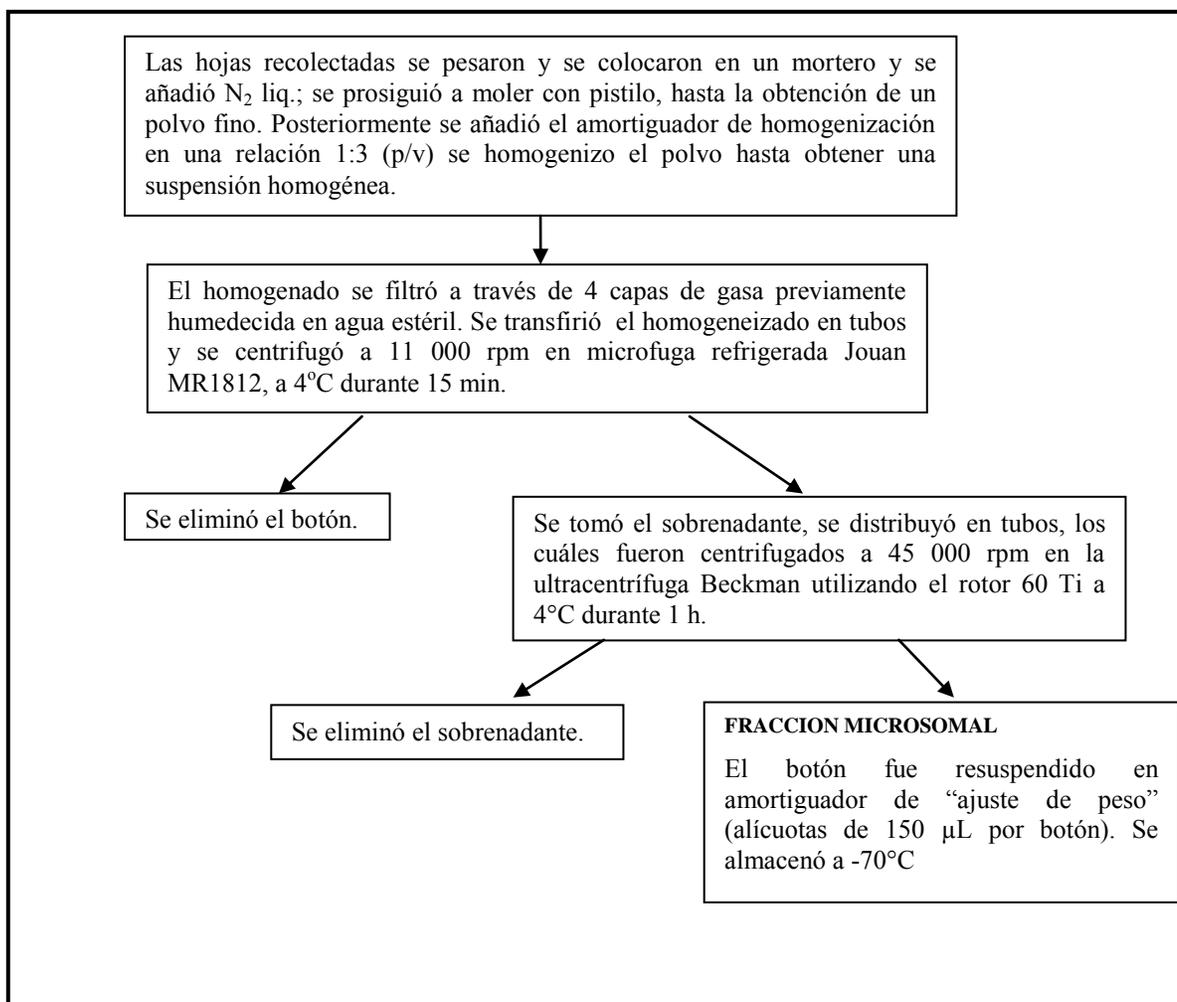


Figura 6.1. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Preparación del cocktail de inhibidores

Para la preparación del cocktail de inhibidores se utilizaron los siguientes reactivos (las concentraciones de los reactivos se muestran en la Tabla 6.3).

- Quimostatina
- Leupeptina, Sigma (L2884-50MG)
- PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoruro), Biochemika (78830)
- TLCK (N-*p*-Tosyl-phenylalanine-Chloromethyl ketone), Sigma (T-4376)
- TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine-Chloromethyl-ketone), Sigma (T-4376)

Tabla 6. 2 Composición de amortiguadores para la obtención y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

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

Para la preparación del cocktail se partió de soluciones concentradas

- Leupeptina 4.204 mM
- Quimostatina 10.3 mM

Tabla 6. 3 Composición de soluciones empleadas para la preparación del cocktail de inhibidores de proteasas

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

Peso molecular de los inhibidores:

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

Pasos a considerar en la preparación:

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

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

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

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

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

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

6.2.3. Determinación de proteína.

Se empleó la técnica de Lowry modificada por Peterson (1977). Se elaboró una curva estándar con albúmina sérica bovina (Tabla 6.4) para posteriormente obtener la concentración de proteína en las fracciones subcelulares de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. La albúmina forma un complejo colorido con el reactivo B (reactivo de Folin Ciocalteu), este complejo absorbe la luz de una longitud de onda de 750 nm, pudiéndose leer la absorbencia en un espectrofotómetro. Posteriormente se obtiene el gráfico y se calcula la regresión para obtener la ecuación de la recta. Se calcula la cantidad de proteína por gramo de muestra. En la Tabla 6.4 se muestra la preparación de cada uno de los tubos de la curva estándar.

Tabla 6. 4 Determinación de proteína en las fracciones membranales de las líneas de *Arabidopsis thaliana*

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

Na-DOC es desoxicolato de sodio 0.15%

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

Reactivo B.- Folin Ciocalteau y H₂O.

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

Después de obtener la fracción microsomal se hizo la determinación de la concentración de proteína según el método descrito en el punto 6.2.3 de Materiales y Métodos, para continuar con la obtención de la preparación enriquecida en vesículas de membrana plasmática (VMP), y que se describe a continuación.

1.- Se prepararon las mezclas de fases como se describe en la Tabla 6.5.

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

Tabla 6. 5 Composición de las soluciones empleadas para preparar la mezcla de fases.

REACTIVOS	Mezcla de fases (concentración final)
Dextrán T500	6.2%
Polietilenglicol (PEG)	6.2%
KH ₂ PO ₄	5 mM
KCl	3 mM
DTT	1 mM
EDTA	0.01 mM
Sorbitol	620 mM

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

- Dextrán T500 al 20%
- Polietilenglicol (PEG) al 40%
- KH₂PO₄ 200 mM ajustado a pH 7.8 con KOH
- KCl 50 mM
- DTT 300 mM
- EDTA 100 Mm

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

6.2.5. Separación electroforética de proteínas.

Se utilizaron geles de poliacrilamida SDS. Los geles de acrilamida-bisacrilamida fueron de 1.0 mm y 1.5 mm de grosor de acuerdo al experimento. La composición se indica en la Tabla 6.6.

- Preparación de geles: Se ensambla un cassette con dos placas de vidrio, previamente lavadas con alcohol, con separadores de 1.0 o 1.5 mm de grosor, se sellan los extremos y esquinas inferiores con vaselina y capas de parafilm. Se realizan pruebas de fugas con agua desionizada. Una vez comprobada la eficacia del cassette, se vacía el gel separador entre las dos placas y se espera 30 min a que éste polimerice. Después se agrega el gel concentrador y se esperan otros 30 min, agregando el peine del grosor correspondiente con 10 o 15 pozos, según convenga al experimento.

- Cargado de muestra: las muestras utilizadas en los diferentes geles realizados se preparan previamente añadiéndoles amortiguador de digestión. Las concentraciones y tipos de muestras se presentan más adelante en los resultados.
- Separación electroforética: Una vez cargados los geles, los cassettes se colocan en la cámara de electroforesis, cubriéndola por dentro con amortiguador del cátodo y por fuera con amortiguador del ánodo.
Los geles se someten a una intensidad de corriente de 60 volts durante 30 min y posteriormente a 100 v hasta terminar el recorrido de las muestras, aproximadamente 60 min. En algunas ocasiones se sobre-corre el gel para separar mejor bandas muy cercanas. También se pueden sobre-correr los geles toda la noche (15 h a 20 volts) llegando al misma distancia.
- Una vez terminada la separación electroforética, los geles pasan por diferentes tratamientos. Algunos se tiñen con Azul de Coomassie, otros por tinción de plata y otros se utilizan para la detección de proteínas por réplica en Western.

Tabla 6. 6 Formulación de Geles de Poliacrilamida

REACTIVOS	Gel 1.0mm		Gel 1.5mm	
	Gel separador (ul)	Gel concentrador (ul)	Gel separador (ul)	Gel concentrador (ul)
Acrilamida-bisacrilamida (10%T-%6C)	1632	225	1967.8	528
Amortiguador del gel	1632	421	1967.8	991
Glicerol	660	-	796.1	-
H ₂ O bidestilada	991	1038	1195	2442.3
Persulfato de amonio	16.5	14	19.9	33
TEMED	1.65	1.4	1.99	3.3
Cantidad Total	4933.15	1700	5948.59	4000

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

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

- SDS 0.1%
- Sin ajustar el pH.
- d) Amortiguador del ánodo:
Tris 0.2 M
Ajustar pH a 8.9-9.0 con HCl
- e) Amortiguador de digestión:
SDS 10%
Tris 100 mM, pH 6.8
Azul de bromofenol 0.6%
- β -mercaptoetanol 4%
- f) Solución de marcadores de peso molecular Benchmark™ Prestained protein Ladder(10748-010) compuesto por las siguientes proteínas (Tabla VIII).
- g) Buffer de Lavado: Sorbitol 350 mM, Hepes/Mes 2 mM pH 7.6, KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasa Complete, Roche, 1.6 mg/mL

6.2.5.1. Tinción por Coomassie:

Se remueve el gel cuidadosamente de las placas de vidrio, utilizando guantes. Se coloca en un recipiente con solución fijadora (ácido acético al 20%) durante toda la noche. Al día siguiente se remueve la fijación fijadora y se agrega Azul de Coomassie, dejándolo en contacto con el gel durante 30-40 min, con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se remueve la solución teñidora y se sustituye por la solución desteñidora (ácido acético al 20%), puede utilizarse la misma solución fijadora. La solución se deja en contacto con el gel hasta observar las bandas lo suficientemente nítidas.

6.2.5.2. Tinción por plata, método de Vórum (Mortz et al., 2001)

Este procedimiento consiste en una serie de 8 pasos en los cuales el gel se pone en contacto con diferentes soluciones, en agitación suave y a temperatura ambiente según se indica a continuación (en todo momento se deben usar guantes y pinzas para manipular el gel):

1. Fijación. Se preparó una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.05% (sólo puede ser el de Sigma, No. cat. 200-001-8). Se dejó el gel en esta solución durante dos h con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
2. Lavador. Se quitaron los geles de la solución fijadora y se hicieron tres lavados de 20 min cada uno con *etanol al 35%*, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente. Entre cada lavado hay que decantar con cuidado sin tocar el gel.
3. Sensibilización. Se mantuvo el gel durante 5 min en una solución de tiosulfato de sodio 0.02%, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.

4. Lavado. Se llevó a cabo con agua bidestilada, tres veces durante 5 min cada uno, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente. Este lavado es crítico, pues de excederse el tiempo, el gel no se tiñe y se tiene que volver a empezar en el paso 1.

5. Adición de la solución de plata. Se colocó el gel ya enjuagado, en una solución de AgNO_3 0.2%, formaldehído 0.076%; durante 20 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.

6. Lavado. Se llevó a cabo con agua bidestilada, dos veces, cada uno durante 1 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.

7. Revelado. Después de enjuagar, se puso el gel en una *solución de Na_2CO_3 6%, formaldehído 0.05%, tiosulfato de sodio 0.0004%*, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente, hasta que aparecieron las bandas. Se decantó la solución reveladora una vez que se obtuvo la intensidad deseada.

8. Terminación del revelado. Se añadió la *solución Stop consistente en metanol 50% y ácido acético 12%*, manteniendo por 5 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.

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

6.2.6. Detección de proteínas por réplica en Western

La réplica en Western comienza con la separación de proteínas en el gel de poliacrilamida. Una vez que se obtiene el gel, éste se trata con buffer de transferencia por 15 min. Posteriormente se ensambla el cassette colocando una de esponja saturada en buffer de transferencia y papel filtro empapado de buffer; encima del papel se coloca el gel sobre del cual se coloca la membrana PVDF cortada del mismo tamaño que el gel, incluidas marcas de referencia. Antes de colocar la membrana se sumerge ésta en metanol absoluto y posteriormente en amortiguador de transferencia. Sobre la membrana se acomoda otro papel filtro del mismo tamaño y se hace rodar un tubo de ensaye para liberar las burbujas atrapadas entre la membrana y el gel y posteriormente se superpone otra esponja empapada con buffer de transferencia. Sobre todo lo anterior se cierra la rejilla del cassette.

El cassette se coloca en la cámara de electrotransferencia que está llena con buffer de transferencia, orientándola de tal manera que el gel esté de cara al cátodo y la membrana de cara al ánodo.

Tabla 6. 7 Condiciones de réplicas en Western para los diferentes anticuerpos utilizados. ANTI-ATPasa de H⁺ de MP, ANTI-Oxidasa Alterna mitocondrial, ANTI-Psb-A de cloroplasto y ANTI-V-ATPasa de H⁺ de tonoplasto.

Anticuerpo	Bloqueo	Condiciones de ab primario	2º Anticuerpo y Procedimiento de revelado	
			con fosfatasa alcalina	con quimioluminiscencia
ANTI-ATPasa de H ⁺ (Membrana plasmática)	2% sol. bloqueadora (Millipore) en TTBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:10 000 en sol. TTBS en agitación suave a t. amb. por 1 h	Dil. 1:1000 en 2% sol. Bloqueadora (Millipore) en TTBS con agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:50 000 en 2% sol. bloqueadora (Millipore) en TTBS con agitación suave a T. amb. por 1 h
ANTI-OXIDASA ALTERNA (AOX) (Membrana mitocondrial interna)	5% sol. bloqueadora (Millipore) en buffer TBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:1,000 en sol. bloqueadora (Millipore) al 2% en buffer TBS. Incubar sin agitación a 4 °C por toda la noche	Dil. 1:1000 en 2% sol. Bloqueadora (Millipore) en TTBS con agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:20 000 en sol. bloqueadora (Millipore) al 2% o leche descremada al 2% en buffer TTBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h
ANTI-Psb-A (Membrana tilacoidal)	5% sol. bloqueadora (Millipore) en buffer TTBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:10,000 en sol. bloqueadora (Millipore) al 2% en buffer TTBS. Incubar sin agitación a 4 °C por toda la noche	Dil. 1:1000 en 2% sol. Bloqueadora (Millipore) en TTBS con agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:20,000 en sol. bloqueadora (Millipore) al 2% en buffer TTBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h
ANTI-V-ATPasa (Membrana de la vacuola (tonoplasto))	5% sol. bloqueadora (Millipore) en buffer TTBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:2,000 en sol. bloqueadora (Millipore) al 2% en buffer TBS. Incubar sin agitación a 4 °C por toda la noche	Dil. 1:1000 en 2% sol. Bloqueadora (Millipore) en TTBS con agitación suave a T. amb. por 1 h	Dil. 1:20,000 en sol. bloqueadora (Millipore) al 2% en buffer TTBS. Incubar en agitación suave a T. amb. por 1 h

Para geles de 1 mm se utilizan 25 volts por 2 h 15 min. Para geles de 1.5 mm la transferencia dura 3 h a 25 volts. Concluido el tiempo de transferencia, se separa la membrana para colocarla en un recipiente con TTBS, colocando hacia arriba la cara que estaba en contacto con el gel. Se lava dos veces con TTBS y una vez con TBS, todas durante 5 min cada una y con agitación rotatoria. Después del último lavado, se remueve el TBS y se añade la solución bloqueadora durante 1 h con agitación rotatoria y a temperatura ambiente. Se remueve la solución bloqueadora y vuelven a realizarse los dos lavados de TTBS y uno TBS. Se añade la solución con el primer anticuerpo y se sigue las condiciones dependiendo del anticuerpo (ver Tabla 6.2). Se remueve la solución del primer anticuerpo y se realiza nuevamente los dos lavados con TTBS y uno con TBS. Se añade la solución del segundo anticuerpo siguiendo las condiciones del tipo de anticuerpo. Se realizan los lavados con TTBS y con TBS nuevamente. Terminando el tercer lavado, la membrana es tratada

mediante dos diferentes técnicas de revelado: por quimo-luminiscencia o por fosfatasa alcalina.

6.2.7. Determinación de Actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática

Se realizó la misma metodología empleada por Meza Bernal, 2008. La actividad de varias enzimas marcadoras que hidrolizan ATP se midió por un método colorimétrico (González Romo *et al.* 1992).

Los inhibidores empleados en este ensayo son los siguientes: a) Ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 200 mM, como inhibidor de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. b) Azida de sodio (NaN₃) 2 mM, como inhibidor de la ATPasa de la mitocondria. c) Nitrato de potasio (KNO₃) 50 mM, como inhibidor de la ATPasa del tonoplasto. d) Molibdato de amonio (Na₂MoO₄·2H₂O) 2 mM, como inhibidor de fosfatasas. Para el caso del inhibidor Na₃VO₄, se agrega directamente en cada tubo. Para el resto de los inhibidores, se prepara el medio de hidrólisis total con los inhibidores.

Se prepararon 6 tubos con diferentes concentraciones de Pi (K₂HPO₄ 1 mM), para elaborar la curva estándar (Tabla II) y se midieron las absorbencias después de 20 min de agregar el reactivo E a una longitud de onda de 850 nm. Se elabora el gráfico y se calculó la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta, misma que nos ayudará a calcular la actividad de hidrólisis de ATP en términos de nmoles de Pi liberado del ATP en presencia de los diferentes inhibidores y por lo tanto a determinar la pureza de las diferentes preparaciones membranales obtenidas (Sánchez-Nieto *et al.* 1997).

La reacción comienza con la adición de 5 µg de proteína membranal de las vesículas de membrana plasmática a los tubos con Medio de Hidrólisis y con la presencia o ausencia de inhibidores. La mezcla de reacción de 150 µL presentó la siguiente composición (todo el material utilizado en este ensayo fue lavado con un detergente libre de fosfatos, Extran y tratado con ácido sulfúrico):

Sacarosa 250 mM, PIPES 20 mM ajustado a pH 6 con NaOH, ATP 10 mM ajustado a pH 6 con PIPES, MgCl₂ 10 mM, Brij 58 al 0.1 % y Carbonilcianida-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) 7 µM, partiéndose de las siguientes soluciones concentradas: PIPES 500 mM ajustado a pH 6 con NaOH, ATP 300 mM ajustado a pH 6 con PIPES, MgCl₂ 300 mM, Brij 58 al 15% y CCCP 1 mM en Etanol.

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

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

Tabla 6. 8 Determinación de Pi liberado a partir de la hidrólisis de ATP (González-Romo et al. 1992) Composición de las soluciones empleadas.

Curva patrón								
Tubo	Pi nmol (uL)	H ₂ O (uL)	Muestra VMP (uL)	Medio de Hidrólisis (uL)	VO ₄ (uL)	SDS 24% (uL)	Reactivo BC (uL)	Reactivo E (uL)
1	0	150	-	-	-	150	300	450
2	10	140	-	-	-			
3	20	130	-	-	-			
4	40	110	-	-	-			
5	60	90	-	-	-			
Ensayo con muestra								
1	-	-	5	150	-	-	300	450
2	-	-	5	150	-	-		
3	-	-	5	150	-	-		
4	-	-	5	144	6	-		
5	-	-	5	144	6	-		
6	-	-	5	144	6	-		
7	-	-	-	150	-	150		
8	-	-	-	150	-	150		
9	-	-	-	150	-	150		

6.2.8. Actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática bajo diferentes periodos de incubación a 29°C.

Previo a la determinación colorimétrica de la hidrólisis de ATP de preparaciones de VMP, se incuba la muestra a 29°C durante diferentes tiempos. Debido a que se busca determinar exclusivamente la influencia de la actividad hidrolítica de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, el medio de hidrólisis contendrá azida, molibdato y nitrato (N₃/MoO₄/NO₃) que inhiben el resto de las enzimas que hidrolizan el ATP que pueden estar presentes en las preparaciones de VMP, tales como la ATPasa de H⁺ mitocondrial, ATPasa de H⁺ del tonoplasto y fosfatasas.

El total de la preparación de VMP que se utiliza (5 ug X cada tubo) se diluye en buffer de lavado en un tubo de ensayo, llegando a una concentración de 0.25 mg/ml de proteína, de tal manera que se agreguen 5 ug en 20 ul por cada tubo. Una vez diluida la muestra se mantiene en hielo. En otro tubo de ensayo se prepara la cantidad necesaria de medio de hidrólisis (150 ul x cada tubo) y se reparte en los tubos los cuales deben mantenerse en hielo.

La incubación inicia al colocar el tubo con la preparación diluida, en un baño a 29°C. Cada tiempo experimental determinado se toman 20 ul de la preparación y se agregan a un tubo con los 150 ul de medio de hidrólisis y se vuelve a colocar en el baño a 29°C. Después de

20.5 min de hidrólisis, la reacción se detiene con SDS al 24% m/v. Una vez concluidos todos los tiempos de incubación y de hidrólisis, se realiza la reacción colorimétrica para la detección de Pi liberado.

Tabla 6. 9 Ensayo de Hidrólisis de ATP con pre-incubación de VMP a 29°C por diferentes tiempos.

TUBO	Incubación (min)	Tiempo de Hidrólisis, 20'30'' (inicio-fin)	Medio de Hidrólisis (ul)	Cantidad de proteína, 5ug (ul)
1	0	0'→20'30''	150	20
2	10	10'→30'30''		
3	20	20'→40'30''		
4	40	40'→60'30''		
5	60	60'→80'30''		
6	90	90'→110'30''		

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de la pureza de VMPs de Col-0, *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* por Réplica en Western.

A. Estandarización de condiciones para la detección por réplica en Western de diferentes proteínas marcadoras de membranas.

En la primera etapa del proyecto se realizaron diferentes pruebas para estandarizar las condiciones ideales de detección de las proteínas marcadoras de diferentes membranas celulares a partir de su reconocimiento con anticuerpos específicos. Dentro de las condiciones que se estandarizaron estuvieron el tipo de solución bloqueadora (Figura 7.1), la concentración de diferentes anticuerpos (Figura 7.2), el tiempo de exposición al segundo anticuerpo y la forma de revelado, entre otras. La estandarización se realizó con fracciones microsomales de frijol con el fin de no hacer aún uso en estas pruebas de las muestras de las líneas experimentales de *A. thaliana*.

En la Figura 7.1 podemos observar una réplica en Western contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, la cual tiene una masa molecular de 100 kDa aproximadamente. El fin de este experimento era determinar cual agente bloqueador daba mejores resultados en la etapa de enmascaramiento de sitios de unión inespecífica para el primer anticuerpo: si una solución de leche desgrasada comercial o la solución Bloqueadora Millipore. En ambas membranas de PVDF, se observó más de una banda, sin embargo, la banda de interés es la correspondiente a la de masa molecular de 100 kDa, la cual corresponde a la unión específica del anticuerpo contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Se aprecia que tanto para la membrana utilizando con leche desgrasada (Figura 7.1b) como para la membrana utilizando Bloqueador Millipore (Figura 7.1c), la intensidad de la banda correspondiente a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (marcada con una flecha) fue definida, y se aprecia una banda más intensa para la membrana con leche desgrasada en comparación con la membrana con Bloqueador Millipore. Por otro lado, observamos que la membrana en la que se utilizó la solución Bloqueadora Millipore presentó una mayor cantidad de bandas inespecíficas y con mayor intensidad que la membrana utilizando leche desgrasada. Otra diferencia entre las membranas presentadas en la Figura 7.1., es la diferencia de contraste entre las bandas de respuesta al anticuerpo y el fondo, donde la membrana utilizando leche desgrasada presentó un mayor contraste que la membrana utilizando solución Bloqueadora Millipore, ayudando a una mejor observación de los resultados.

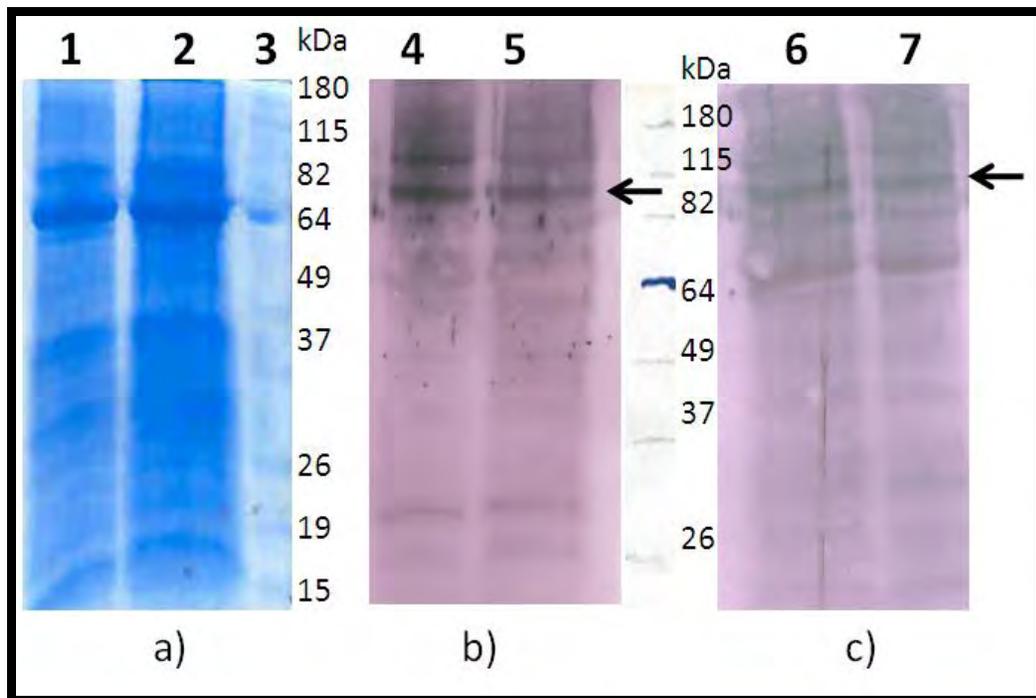


Figura 7. 1. Réplica en Western de la fracción microsomal (FM) de hojas de frijol. Una vez que las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a las membranas de PVDF, se siguió el procedimiento de réplica en Western. Se utilizó un anticuerpo contra la ATPasa de H^+ como primer anticuerpo (1:4000, v:v) (masa molecular de aprox. 100 kDa). El revelado se llevó a cabo por la reacción de la fosfatasa alcalina conjugada al segundo anticuerpo (1:1000, v:v). a) Gel control de cargado, gel de de acrilamida-SDS teñido por Azul de Coomassie, carril 1: 20 ug de FM, carril 2: 40 ug de FM, carriles 3 y 6: estándares de peso molecular. b) Membrana utilizando leche desgrasada como solución bloqueadora, carril 4: 20 ug de FM, carril 5: 40 ug de FM. c) Membrana utilizando solución Bloqueadora Millipore, carril 6: 20ug de FM, carril 7: 40 ug de FM. En la Figura b y c se señalan con flechas la banda correspondiente a la respuesta específica del anticuerpo utilizado (100 kDa).

Otros factores investigados fueron la concentración del anticuerpo y el tipo de revelado. Los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo contra la Oxidasa Alterna de membrana interna mitocondrial y un anticuerpo contra la Subunidad E de ATPasa de H^+ de la membrana de la vacuola (tonoplasto) (Figura 7.2). Las réplicas fueron reveladas con fosfatasa alcalina. Como se puede observar en las Figuras 7.2b y 7.2c, los anticuerpos contra la Oxidasa Alterna y la Subunidad-E de la ATPasa de H^+ de vacuola, presentaron varias bandas de diferentes masas moleculares, sin embargo, la banda más intensa debería ser la que reconoce específicamente el anticuerpo. En los casos de la Oxidasa Alterna y la Subunidad-E, la banda más intensa correspondió justamente a las de las masas moleculares respectivas: la de la Oxidasa Alterna es de 35 kDa y la de la Subunidad-E de 29 kDa. En ambos casos, las bandas se señalan con una flecha. La membrana tratada con el anticuerpo contra la Oxidasa alterna (Figura 7.2b), presentó una gran cantidad de bandas inespecíficas a lo largo de la

membrana en comparación de la membrana tratada con el anticuerpo contra la Subunidad E (Figura 7.2c), la cual presenta únicamente de 5 a 7 bandas inespecíficas. Ambas membranas presentaron un bajo contraste entre las bandas de respuesta al anticuerpo y el fondo, especialmente la membrana tratado contra la Oxidasa Alterna. Debido a lo anterior, las réplicas en Western posteriores tuvieron un tiempo de exposición al segundo anticuerpo menor, mejorando el contraste.

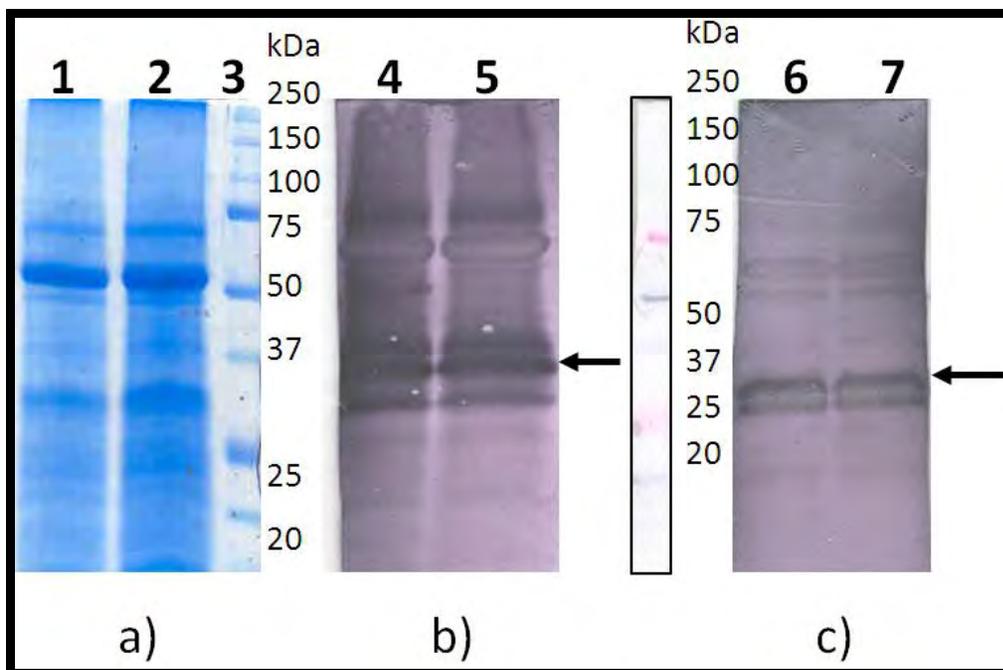


Figura 7. 2. Réplica en Western de la fracción microsomal (FM) de hojas de frijol utilizando anticuerpos contra la Oxidasa Alterna y la V-ATPasa Sub-E. Una vez que las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a las membranas de PVDF, se siguió el procedimiento de Western, utilizando un revelado por fosfatasa alcalina (1:1000, v:v). a) Gel control de cargado, teñido por Azul de Coomassie, carril 20 ug de FM; carril 3, 40 ug de FM, carril 3 estándares de peso molecular. b) Membrana tratada con el anticuerpo contra Oxidasa Alterna (35 kDa) como primer anticuerpo (1:1000, v:v), carril 4: 20 ug de FM, carril 5: 40 ug de FM. c) Membrana tratada con el anticuerpo contra la V-ATPasa Sub-E (29kDa) como primer anticuerpo, carril 6: 20 ug de FM, carril 7: 40 ug de FM. Las flechas señalan la banda correspondiente a la respuesta específica del anticuerpo: 35 kDa para la Oxidasa Alterna y 29 kDa para la Sub-E.

Una vez estandarizadas las condiciones para la separación electroforética de las proteínas y para su transferencia en Western a partir de las fracciones membranales de hojas de frijol, se prosiguió con las muestras experimentales, que consistieron en tres preparaciones subcelulares de dos diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*, una silvestre y una mutante (*Atsbh1-1*). Las tres preparaciones subcelulares fueron: homogenado (HOM), fracciones

microsomales (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP). Con el fin de utilizar menos muestra se utilizó la técnica de tinción de plata para teñir los geles control.

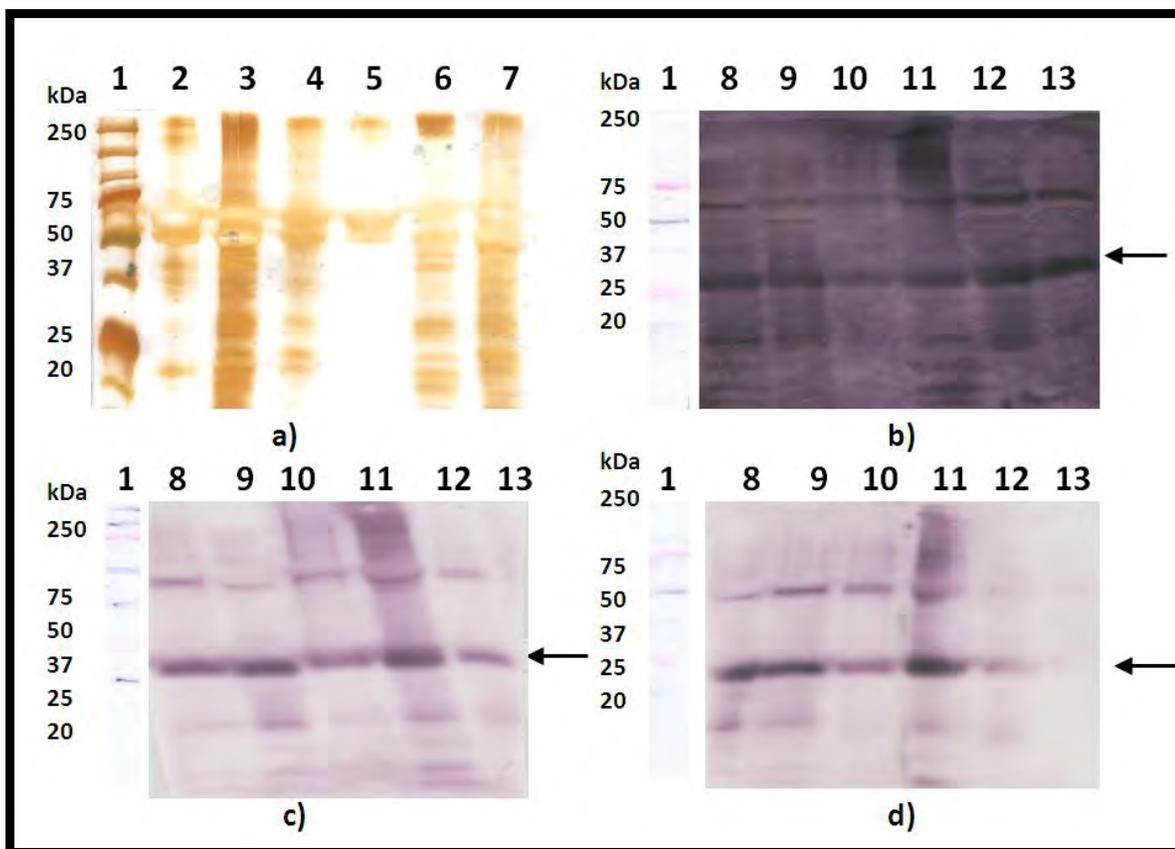


Figura 7. 3. Detección de Psb-A, proteína marcadora de la membrana tilacoidal por réplica en Western en preparaciones subcelulares de líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1* de *Arabidopsis thaliana*. Se hizo un fraccionamiento subcelular de hojas de plantas de las líneas silvestre y *Atsbh1-1*, obteniéndose las fracciones de homogenado (HOM), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP) y separándose electroforéticamente en geles desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a tres membranas de PVDF que fueron tratadas con tres diferentes diluciones del primer anticuerpo contra Psb-A. Se usó un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina (1:1000, v:v) como segundo anticuerpo para el revelado. a) Gel control de cargado teñido por tinción de plata, carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: 5 ug de HOM línea silvestre, carril 3: 5 ug de FM línea silvestres, carril 4: 5 ug de VM línea silvestre, carril 5: 5 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 6: 5 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 7: 5 ug VMP *Atsbh1-1*, VMP (5 ug). b) Dilución Anti-Psb-A 1:1000, v:v, c) Dilución Anti-Psb-A 1:5000, v:v, d) Dilución Anti-Psb-A 1:10000, v:v. Para las réplicas b), c), d), la aplicación de las muestras fue como sigue: carril 8: 20 ug de HOM línea silvestre, carril 9: 20 ug de FM línea silvestre, carril 10: 20 ug de VMP línea silvestre, carril 11: 20 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 12: 20 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 13: 20 ug de VMP *Atsbh1-1*. Las flechas indican la banda correspondiente a la respuesta del anticuerpo contra la Psb-A (28 kDa).

Una de las condiciones que se estandarizaron para detectar las proteínas marcadoras de membranas en las muestras de *A. thaliana*, fue la concentración del 1er anticuerpo en el proceso de Western. En la Figura 7.3 observamos el ensayo de réplicas en Western con su

gel control, en el cual se muestran las tres diferentes concentraciones del anticuerpo anti Psb-A de tilacoide, y que es una enzima marcadora de cloroplasto, por encontrarse abundante y exclusivamente en este organelo.

Según los resultados arrojados en este ensayo (Figura 7.3), el anticuerpo utilizado presentó más de una banda de reconocimiento con las tres concentraciones del anticuerpo utilizado, sin embargo la banda más intensa se presentó a una masa molecular de aproximadamente 28 kDa correspondiente a la masa molecular de la Psb-A, la cual se encuentra señalada por una flecha.

En las membranas con diferentes diluciones utilizadas para el primer anticuerpo (Figura 7.3b-d) se presentó el mismo patrón de bandeo de respuesta antigénica al anticuerpo para las diferentes fracciones subcelulares utilizadas. Para la membrana con una dilución de 1:1000, v:v (Figura 7.3b) se presentó una membrana muy oscura en comparación a las membranas con una dilución del anticuerpo de 1:5000, v:v y de 1:10000, v:v. La intensidad de la banda de interés, a la distancia de 28 kDa aproximadamente, fue nítida y con un buen contraste en el fondo en la membrana con la solución del anticuerpo más diluida (Figura 7.3d), en comparación con las membranas con la solución más concentrada del anticuerpo (Figura 7.3b y c). Por otro lado, se presentaron diferencias entre las muestras de la línea silvestre en comparación con la línea mutante, por ejemplo, se observa en las tres membranas (Figura 7.3b-d) que el carril correspondiente a la fracción de homogenado de *Atsbh1-1*, la banda de Psb-A presentó una mayor intensidad que el carril de homogenado de la línea silvestre; así mismo, en la Figura 7.3d, se observa una intensidad baja para la banda de Psb-A en los carriles correspondientes a fracción microsomal y VMP de *Atsbh1-1* en comparación con las fracciones correspondientes en la línea silvestre.

Tanto para la línea silvestre como para la línea mutante, se presentaron diferencias en la intensidad de la banda de Psb-A entre los carriles de homogenado, fracción microsomal y VMP (Figura 7.3c y d). Para la línea silvestre se presentó una mayor intensidad en la banda de Psb-A para el carril correspondiente a la fracción microsomal en comparación al carril de homogenado y VMP; la menor intensidad de la banda se presentó para el carril de VMP, en comparación al resto de las fracciones subcelulares. En el caso de la línea mutante, la banda con mayor intensidad correspondió al homogenado, mientras que el carril de VMP, al igual que en la línea silvestre, presentó la menor intensidad de banda de reconocimiento de Psb-A

B. Determinación de la pureza de las muestras de VMP de plantas silvestres y mutantes Atsbh1-1.

Una vez estandarizadas las condiciones del procedimiento en Western, se realizaron inmunorrélicas con el fin de determinar la pureza de las vesículas de membrana plasmática (VMP) de las líneas silvestre y mutante. Este procedimiento se basa en la detección específica de enzimas marcadoras de diferentes membranas celulares que pueden estar contaminando la fracción purificada de VMP. Estas enzimas fueron reconocidas por anticuerpos específicos de la manera siguiente: la Oxidasa Alterna es una enzima marcadora de membrana mitocondrial, la Sub-E de la ATPasa de H⁺ de tonoplasto es una enzima marcadora de la membrana de la vacuola, la Psb-A es una enzima marcadora de la membrana tilacoidal del cloroplasto, y finalmente, la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es una enzima marcadora de esa membrana. La pureza de las VMP se determinó por la presencia relativa de la enzima marcadora de la membrana plasmática con respecto a la del resto de las enzimas marcadoras en las preparaciones. Se esperaba que en las fracciones de homogenado y las microsomales, las enzimas marcadoras de endomembranas presentaran mayor intensidad con respecto a la fracción de VMP. Los resultados se muestran en las Figuras 7.4-7.6.

En la Figura 7.4 se muestran las réplicas realizadas con los anticuerpos contra la proteína Psb-A y contra la Oxidasa Alterna. En el gel control (Figura 7.4a) se observa que las preparaciones de homogenado para las líneas silvestre y mutante, presentaron un patrón de bandeo similares entre sí, indicando una aplicación equivalente de proteína total en todos los carriles que se compararon. Lo mismo ocurrió con las fracciones microsomales y las vesículas de membrana plasmática.

Al realizar la réplica en Western contra la proteína marcadora de cloroplasto Psb-A (Figura 7.4b), con peso aproximado de 28-30 kDa y que se indica con una flecha en la imagen, se observó que el anticuerpo contra la Psb-A reaccionó con más de una proteína en la membrana de PVDF, presentado tres grupos de bandas intensas: a la distancia de 55 kDa, a la distancia de 30 kDa y a la distancia de 20 kDa. Las bandas más intensas son las de la proteína con una masa aproximada de 30 kDa, la cual corresponde a la Psb-A.

La intensidad de la banda correspondiente a esta proteína marcadora cambió según la fracción subcelular: en el caso de los carriles de la fracción de homogenado, tanto en la línea silvestre como en la mutante se presentó una mayor intensidad que las de las fracciones microsomales y las VMP. Las bandas de reconocimiento de los carriles de VMP tanto mutantes como silvestres presentaron una baja intensidad, en comparación con la fracción microsomal y de homogenado. La fracción de homogenado de la línea mutante presentó una mayor intensidad, que la fracción análoga de la línea silvestre.

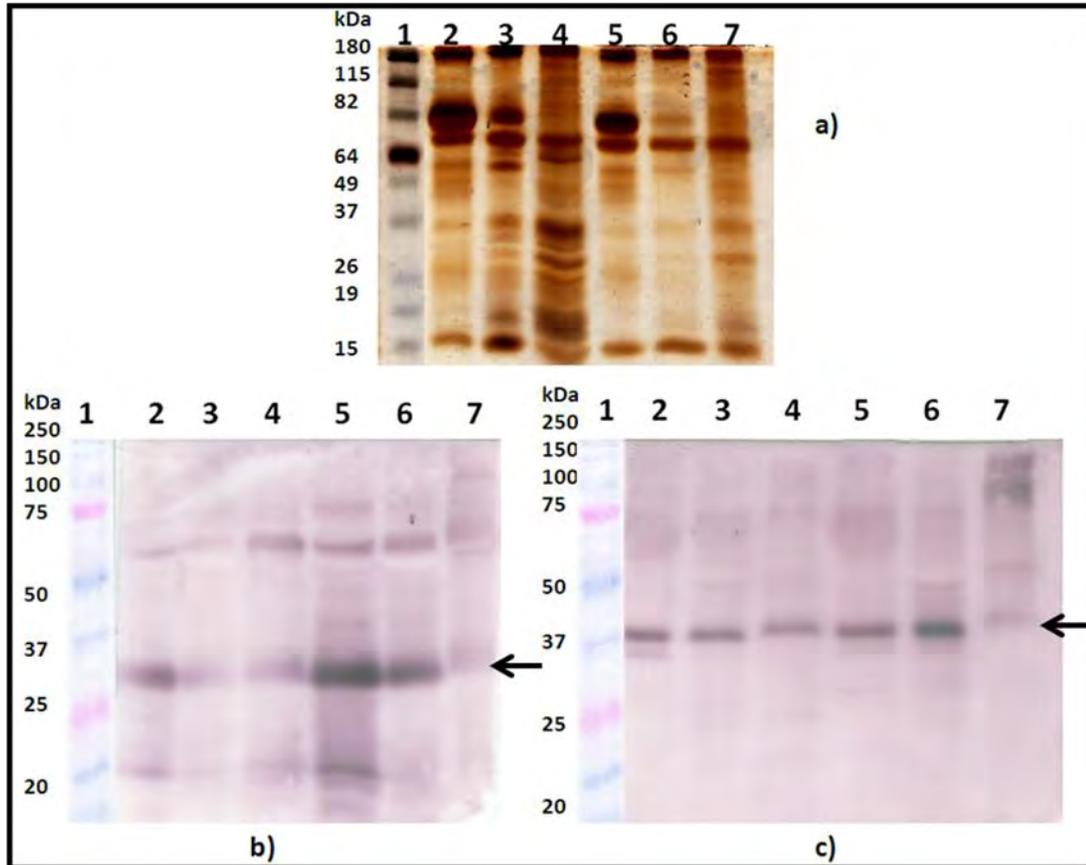


Figura 7. 4 Detección de Psb-A, proteína marcadora de la membrana tilacoidal y Oxidasa Alterna, proteína marcadora de la membrana interna mitocondrial, por réplica en Western en preparaciones subcelulares de líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1* de *Arabidopsis thaliana*. Se hizo un fraccionamiento subcelular de hojas de plantas de las líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1*, obteniéndose las fracciones de homogenado (HOM), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP) y separándose electroforéticamente en geles desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que fue tratada con dos diferentes primeros anticuerpos Anti-Psb-A (b) y Anti-Oxidasa Alterna (c). Se usó un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina (1:1000, v:v) como segundo anticuerpo para el revelado. a) Gel control de cargado teñido por tinción de plata, carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: 5 ug de HOM línea silvestre, carril 3: 5 ug de FM línea silvestre, carril 4: 5 ug de VM línea silvestre, carril 5: 5 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 6: 5 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 7: 5 ug VMP *Atsbh1-1*. b) Anti-Psb-A 1:1000, v:v. c) Anti-Oxidasa Alterna 1:1000, v:v, carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: 20 ug de HOM línea silvestre, carril 3: 20 ug de FM línea silvestre, carril 4: 20 ug de VMP línea silvestre, carril 5: 20 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 6: 20 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 7: 20 ug de VMP *Atsbh1-1*. Las flechas indican la banda correspondiente a la respuesta del anticuerpo contra la Psb-A (28 kDa) en b y contra la Oxidasa Alterna (35 kDa) en c.

La réplica en Western contra la proteína marcadora de membrana interna mitocondrial Oxidasa Alterna se muestra en la Figura 7.4c. El anticuerpo utilizado anti-Oxidasa Alterna presentó una alta especificidad al presentar una banda intensa de reconocimiento a la distancia de 35 kDa, correspondiente a la masa molecular de la Oxidasa Alterna y que se

señala con una flecha, sin embargo el anticuerpo también presentó reactividad, aunque muy baja, contra un grupo de proteínas en la región de los 75 kDa. La intensidad de la banda correspondiente a la Oxidasa Alterna, cambió con respecto a la fracción subcelular; la banda más intensa para ambas líneas de *A. thaliana* correspondió a los carriles de fracción microsomal, mientras que la banda menos intensa para ambas líneas correspondió a los carriles de VMP. Por otro lado, también se presentaron diferencias entre la línea silvestre y la línea mutante: la baja intensidad del carril con VMP con respecto a la fracción microsomal y homogenado fue más notoria en la línea mutante que en la línea silvestre, y la mayor intensidad de la fracción microsomal fue también más notoria en la línea mutante.

En la Figura 7.5 se observan réplicas en Western aplicadas contra la proteína marcadora de vacuola, la Subunidad-E de la ATPasa de H^+ del tonoplasto, y contra la proteína marcadora de cloroplasto Psb-A. El gel control presentó intensidades similares en el patrón de bandeo de las diferentes fracciones subcelulares de las líneas silvestre y *Atsbh1-1*, sin embargo, observamos una mayor intensidad en el carril las proteínas de las VMP de las plantas silvestres al compararlo contra el de VMP de *Atsbh1-1*. Si bien la intensidad de las proteínas en los carriles de la misma línea es similar (Figura 7.5). En la Figura 7.5b se presenta la réplica en Western contra la Subunidad-E, en la que se utilizó una concentración de 1:2000, v:v del anticuerpo y fue revelado por quimioluminiscencia. Se puede observar, que a la distancia de migración correspondiente a una proteína con una masa molecular de 29 kDa aproximadamente, se presentó una banda reactiva al anticuerpo en todos los carriles y correspondiente a la masa molecular de la Subunidad-E. Los carriles 9 y 12, conteniendo las proteínas de la fracción microsomal de cada línea, presentaron una mayor intensidad que el resto de las fracciones subcelulares. La banda de reconocimiento a la Sub-E en la fracción del homogenado de ambas líneas fue menos intensa en comparación con la fracción microsomal y las VMP. La intensidad de la banda en el carril VMP de la línea mutante fue un poco menor que la de la silvestre, lo cual podría atribuirse a las intensidades observadas en el gel con las proteínas separadas y que es un gel paralelo que refleja la misma distribución y cantidad de proteínas cargadas en cada carril.

En la Figura 7.5c se presenta una inmunorréplica contra Psb-A, pero revelada por un ensayo que produce quimioluminiscencia, en donde la banda de interés reactiva al anticuerpo se indica con una flecha correspondiente a una distancia en la que migra el estándar de peso molecular de 30 kDa aproximadamente. La intensidad y tamaño de la banda de reconocimiento a la Psb-A para la fracción de homogenado de ambas líneas fue muy notoria, si bien la banda en la fracción microsomal para la línea mutante fue más intensa que la correspondiente a la línea silvestre. Las bandas de reconocimiento a la Psb-A en los carriles de VMP de ambas líneas no presentaron diferencia de intensidad entre sí. Se

observó que en los carriles de las VMP de ambas líneas de *A. thaliana*, la intensidad de la banda fue menor con respecto al resto de las fracciones subcelulares; por otro lado, para la línea silvestre se presentó una mayor intensidad para la fracción de homogenado con respecto a la fracción microsomal, mientras que en la línea mutante la mayor intensidad la presentó la fracción microsomal con respecto al homogenado.

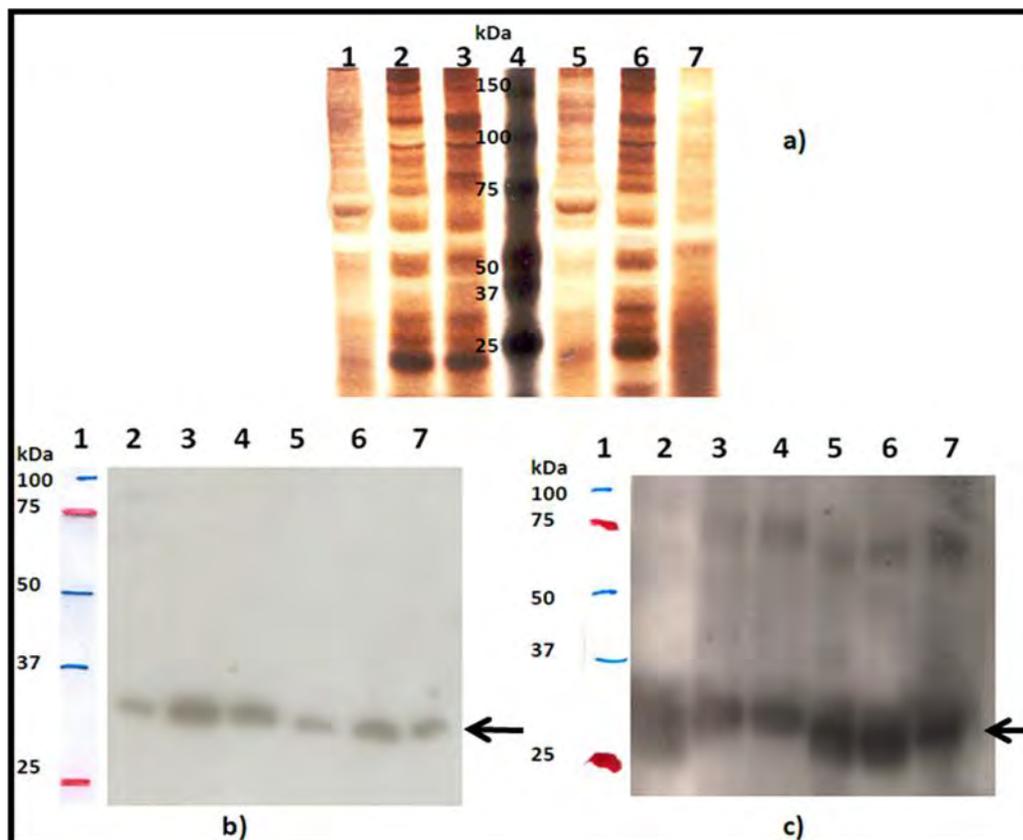


Figura 7. 5. Detección de la Sub-E de la ATPasa de H^+ de tonoplasto, proteína marcadora de vacuola, y detección de la Psb-A, proteína marcadora de la membrana tilacoidal, por réplica en Western en preparaciones subcelulares de líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1* de *Arabidopsis thaliana*. Se hizo un fraccionamiento subcelular de hojas de plantas de las líneas silvestre y *Atsbh1-1*, obteniéndose las fracciones de homogenado (HOM), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP) y separándose electroforéticamente en geles desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que fue tratada con dos diferentes primeros anticuerpos Anti-Subunidad E (b) y Anti-Psb-A(c). Se usó un anticuerpo conjugado a peroxidasa (1:1000, v:v) como segundo anticuerpo para el revelado por quimioluminiscencia. a) Gel control de cargado teñido por tinción de plata, carril 4: estándar de peso molecular, carril 1: 5 ug de HOM línea silvestre, carril 2: 5 ug de FM línea silvestre, carril 3: 5 ug de VM línea silvestre, carril 5: 5 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 6: 5 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 7: 5 ug VMP *Atsbh1-1*, VMP (5 ug). b) Anti-Sub-E 1:2000, v:v, c) Anti-Psb-A 1:1000, v:v. carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: 20 ug de HOM línea silvestre, carril 3: 20 ug de FM línea silvestre, carril 4: 20 ug de VMP línea silvestre, carril 5: 20 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 6: 20 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 7: 20 ug de VMP *Atsbh1-1*. Las flechas indican la banda correspondiente a la respuesta del anticuerpo contra la Sub-E (29 kDa) en b y contra la Psb-A (28 kDa) en c.

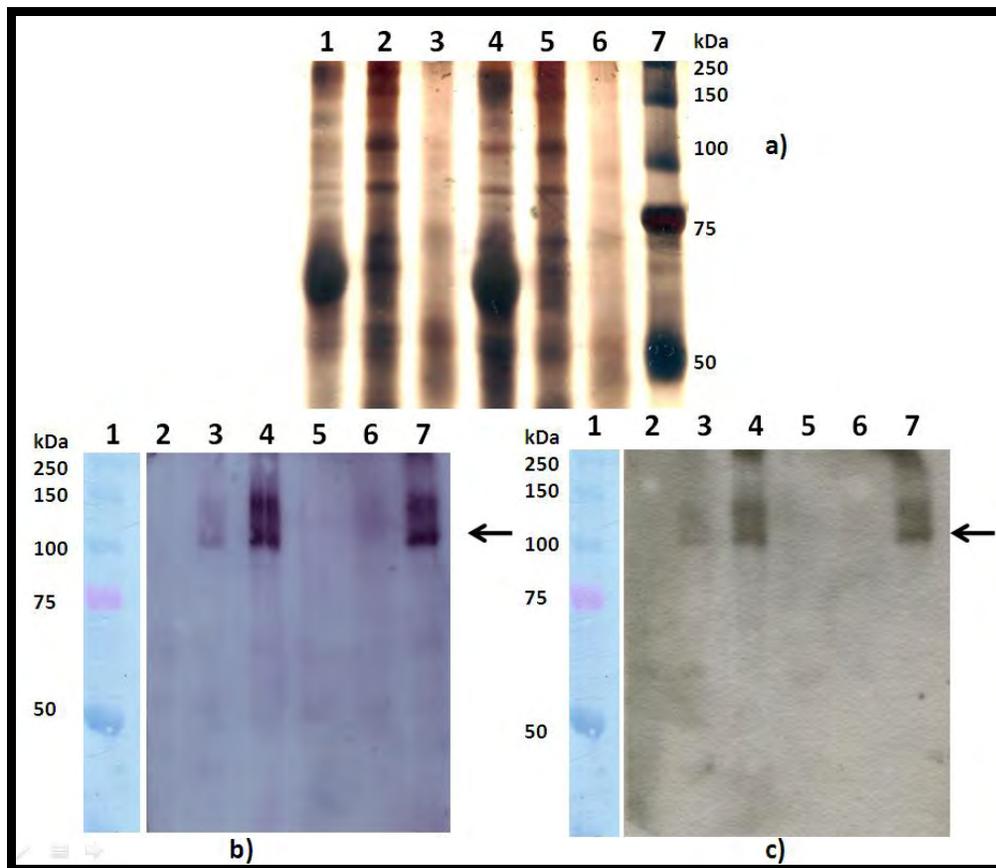


Figura 7. 6. Detección de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, proteína marcadora de membrana plasmática, por réplica en Western en preparaciones subcelulares de líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1* de *Arabidopsis thaliana*. Se hizo un fraccionamiento subcelular de hojas de plantas de las líneas silvestre y *Atsbh1-1* obteniéndose las fracciones de homogenado (HOM), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP) y separándose electroforéticamente en geles desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que fue tratada con el primer anticuerpo Anti-ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Se usó un anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (1:1000, v:v) como segundo anticuerpo (b) y peroxidasa (1:1000, v:v) como segundo anticuerpo (c) para el revelado por quimioluminiscencia. a) Gel control de cargado teñido por tinción de plata, carril 7: estándar de peso molecular, carril 1: 5 ug de HOM línea silvestre, carril 2: 5 ug de FM línea silvestre, carril 3: 5 ug de VMP línea silvestre, carril 4: 5 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 5: 5 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 6: 5 ug VMP *Atsbh1-1*. b) Anti-ATPasa de H^+ 1:10000, v:v, revelado por fosfatasa alcalina, c) Anti-ATPasa de H^+ 1:10000, v:v, revelado por quimioluminiscencia, carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: 10 ug de HOM línea silvestre, carril 3: 10 ug de FM línea silvestre, carril 4: 10 ug de VMP línea silvestre, carril 5: 10 ug de HOM *Atsbh1-1*, carril 6: 10 ug de FM *Atsbh1-1*, carril 7: 10 ug de VMP *Atsbh1-1*. Las flechas indican la banda correspondiente a la respuesta del anticuerpo contra la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (100 kDa).

En la Figura 7.6 observamos la réplica en Western para la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. El gel control de cargado presentó una intensidad de tinción similar para todos los carriles y patrones de bandeado similares para cada tipo de fracción subcelular. Las Figuras 7.6b y 7.6c presentan la misma membrana de PVDF, sin embargo, la de la 7.6b fue revelada por la reacción con fosfatasa alcalina, y la de la 7.6c fue revelada por quimioluminiscencia.

Tanto en la Figura 7.6b como en la 7.6c, observamos una banda a la distancia de 100 kDa, señalada por una flecha correspondiente a la masa molecular de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Sin embargo, se presentaron bandas reactivas al anticuerpo con pesos mayores y cercanos a esta masa molecular. En los carriles correspondientes a las preparaciones de fracciones de homogenado de ambas líneas (carriles 8 y 11), no se presentó ninguna banda; para los carriles 9 y 12, de fracciones microsomales, se alcanzaron a teñir bandas a la distancia del estándar de masa molecular de 100 kDa, pero con una intensidad mucho menor a las presentes en los carriles 10 y 13. En los carriles 10 y 13, correspondientes a las VMP silvestres y *Atsbh1-1*, respectivamente, se observó una banda intensa a la distancia de la referencia de 100 kDa.

Agrupando todas las bandas reactivas a los diferentes anticuerpos (Figura 7.7), observamos que las réplicas realizadas contra las enzimas marcadoras de las membranas mitocondrial (Oxidasa Alternativa), del cloroplasto (Psb-A) y de la vacuola (Sub-E), presentaron una menor intensidad en los carriles correspondientes a las VMP de cada línea con respecto a los carriles de las fracciones de homogenado y las fracciones microsomales. Por otro lado en las membranas que se expusieron a la reacción del anticuerpo contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, fueron precisamente los carriles de VMP los que presentaron mayor intensidad en la banda en comparación con las fracciones microsomales y homogenado para ambas líneas.

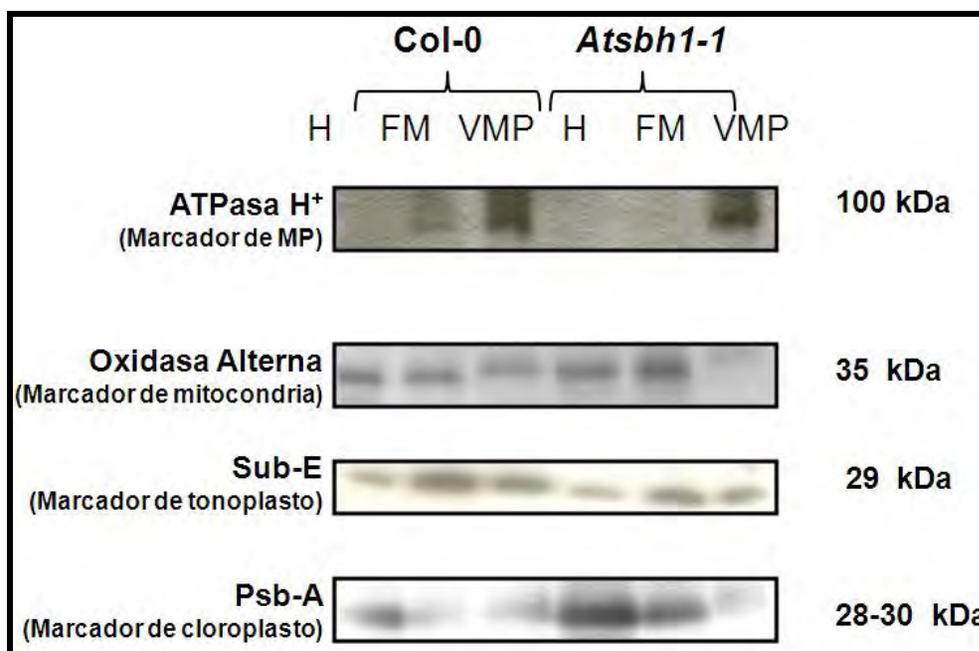


Figura 7. 7 Réplicas en Western con anticuerpos contra diferentes proteínas marcadoras. ATPasa de H⁺, Oxidasa Alternativa, Sub-E, Psb-A. Se presentan las bandas señaladas de la Figura 7.6 (ATPasa de H⁺), Figura 7.5 (Sub-E) y Figura 7.4 (Oxidasa Alternativa y Psb-A).

7.2. Determinación de la hidrólisis de ATP de VMP de plantas del genotipo silvestre, y de las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*.

Se realizaron varios ensayos de hidrólisis de ATP con preparaciones de VMP tanto obtenidas por Meza Bernal (2008) en el año 2008 y mantenidas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, como en preparaciones frescas obtenidas en mayo de 2010 y agosto de 2010. Estas preparaciones fueron tanto de plantas con el genotipo silvestre como de la línea mutante *Atsbh1-1*. Por primera vez, se obtuvieron también preparaciones membranales de la línea *Atsbh1-2*.

A. Resultados con las preparaciones obtenidas por Meza Bernal en 2008.

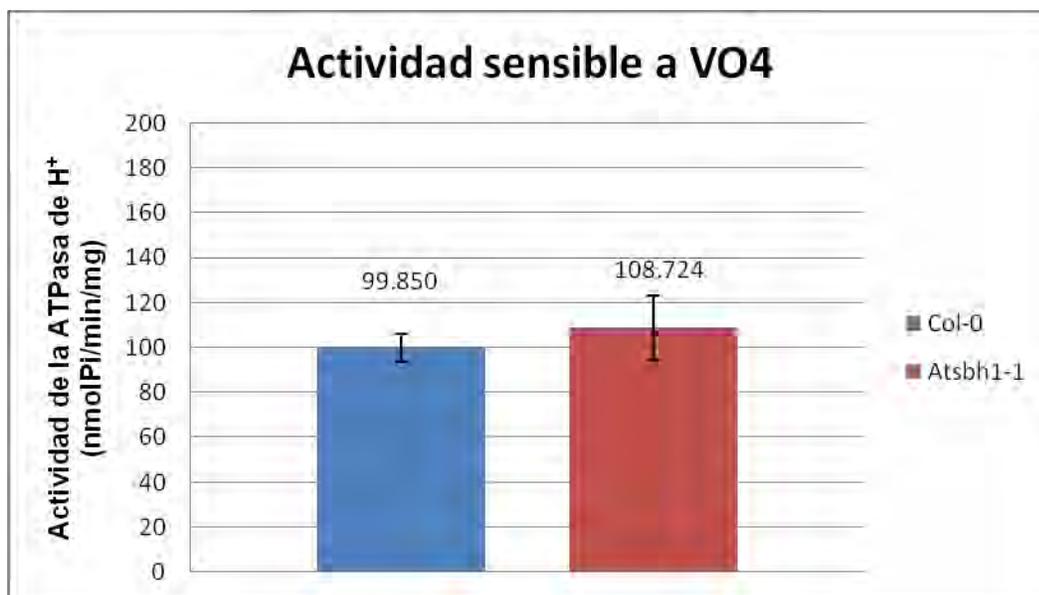
En un inicio se determinó la actividad de ATPasa de H^+ en preparaciones obtenidas por Meza Bernal en el año 2008 y mantenidas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabla 7.1). El porcentaje de inhibición por VO_4 para ambas líneas resultó mayor al 50%, lo cual representa que más de la mitad de la hidrólisis de ATP total encontrada estaba siendo ejecutada por la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

Tabla 7. 1 Hidrólisis de ATP de VMP de hojas de línea silvestre y mutante *Atsbh1-1* en presencia y ausencia de VO_4 . La actividad de ATPasa se llevó a cabo con 5 μg de proteína membranal. Se determinó la liberación de Pi mediante un método colorimétrico. Se presentan los valores promedio \pm DE de dos réplicas provenientes de una preparación membranal independiente para la línea silvestre y dos réplicas provenientes de dos preparaciones membranales independientes para la línea mutante.

Muestra	Hidrólisis Total (nmol Pi/mg/min)	Hidrólisis con VO_4 (nmol Pi/mg/min)	% Inhibición VO_4	Actividad Sensible a VO_4 (nmol Pi/mg/min)
Col-0	177.32	72.99	58.83	104.32
	148.02	52.64	64.44	95.38
Promedio	162.67	62.82	61.64\pm 3.96	99.85\pm 6.32
<i>Atsbh1-1</i>	189.12	70.88	62.52	118.25
	204.20	99.90	51.08	104.30
	181.13	90.46	50.06	90.67
	217.87	96.19	55.85	121.69
Promedio \pm DS	198.08 \pm 16.30	89.36 \pm 12.91	54.88\pm5.69	108.72\pm14.19

Según los resultados de Meza Bernal obtenidos con las preparaciones frescas, la actividad sensible a vanadato de la línea *Atsbh1-1* era 75 % menor con respecto a la de la línea silvestre. Cuando se determinó la hidrólisis de ATP en las mismas preparaciones membranales después de haber estado congeladas un largo tiempo, se obtuvieron en el presente trabajo los resultados de la Tabla 7.1 y Gráfica 7.1. Como se puede observar, no se

encontraron diferencias significativas entre de la actividad de hidrólisis de ATP sensible a VO_4 de la línea silvestre y la de la mutante *Atsbh1-1*.



Gráfica 7. 1 Actividad hidrolítica de ATP sensible a vanadato de las VMP de la línea silvestre (Col-0) y de la mutante (*Atsbh1-1*). Se utilizaron las muestras obtenidas por Meza Bernal en 2008. La gráfica muestra los valores de la actividad sensible a vanadato indicados en la Tabla 7.1.

B. Resultados obtenidos con preparaciones recientes de A. thaliana líneas silvestre y mutantes Atsbh1-1 y Atsbh1-2.

En vista de los resultados anteriores, se pensó que estas preparaciones estaban ya deterioradas, y dado que se había conseguido cosechar suficientes plantas tanto silvestres como de las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*, a partir de ellas se obtuvieron nuevas preparaciones de VMP.

Con el fin de tener un número de muestras representativas, se obtuvieron de dos a tres preparaciones independientes para cada línea de *A. thaliana* y en cada una de ellas se midió la hidrólisis de ATP de 4 a 7 réplicas. Los resultados se muestran en las Tablas 7.2-7.4.

Para la línea Col-0 se presentó una actividad total de 108.5 nmolPi/min/mg, la actividad sensible a VO_4 , promedio fue de 48.15 nmolPi/mg/min en las dos preparaciones. Por otro lado, el porcentaje de inhibición por VO_4 para las dos nuevas preparaciones de VMP de la línea silvestre fue en promedio de 48.75% (Tabla 7.2).

Para las nuevas preparaciones de la línea *Atsbh1-1*, se obtuvo una actividad total de 175.26 nmolPi/min/mg, una actividad sensible a VO_4 de 110.14 nmolPi/mg/min y un porcentaje de inhibición de 61.90 (Tabla 7.3). Con las preparaciones de la línea *Atsbh1-2*, se obtuvo una

actividad total de 250.53 nmolPi/min/mg, una actividad sensible a VO₄ de 170.37 nmolPi/mg/min y un porcentaje de inhibición de 69.46 (Tabla 7.4).

Tabla 7. 2 Hidrólisis de ATP de VMP de hojas de línea silvestre (Col-0) en presencia y ausencia de VO₄. La actividad de ATPasa se llevó a cabo con 5 ug de proteína membranal. Se determinó la liberación de Pi mediante un método colorimétrico. Se presentan los valores obtenidos en cada experimento junto con el promedio y el valor del error estándar (EE) de siete réplicas obtenidas a partir de tres preparaciones membranales independientes.

Col-0	Actividad Total (nmolPi/min/mg)	Actividad Sensible a VO₄ (nmolPi/min/mg)	% Inhibición por VO₄
Actividad Específica	81.84	48.60	59.39
	71.22	36.22	50.86
	69.48	41.03	59.06
	129.46	54.95	42.45
	133.71	54.40	40.68
	180.21	56.46	31.33
	66.88	45.42	68.13
Promedio ± EE	108.49 ± 17.62	48.15 ± 2.91	48.75 ± 5.06

Tabla 7. 3 Hidrólisis de ATP de VMP de hojas de línea *Atsbh1-1* en presencia y ausencia de VO₄. La actividad de ATPasa se llevó a cabo con 5 ug de proteína membranal. Se determinó la liberación de Pi mediante un método colorimétrico. Se presentan los valores obtenidos en cada experimento junto con el promedio y el valor del error estándar (EE) de las seis replicas obtenidas a partir de tres preparaciones membranales independientes.

<i>Atsbh1-1</i>	Actividad Total (nmolPi/min/mg)	Actividad Sensible a VO₄ (nmolPi/min/mg)	% Inhibición por VO₄
Actividad Específica	201.60	114.27	56.68
	181.77	105.30	57.93
	153.46	109.62	71.43
	151.97	109.09	71.79
	189.12	118.26	62.52
	173.66	104.30	51.08
Promedio ± EE	175.26 ± 8.06	110.14 ± 2.17	61.90 ± 3.41

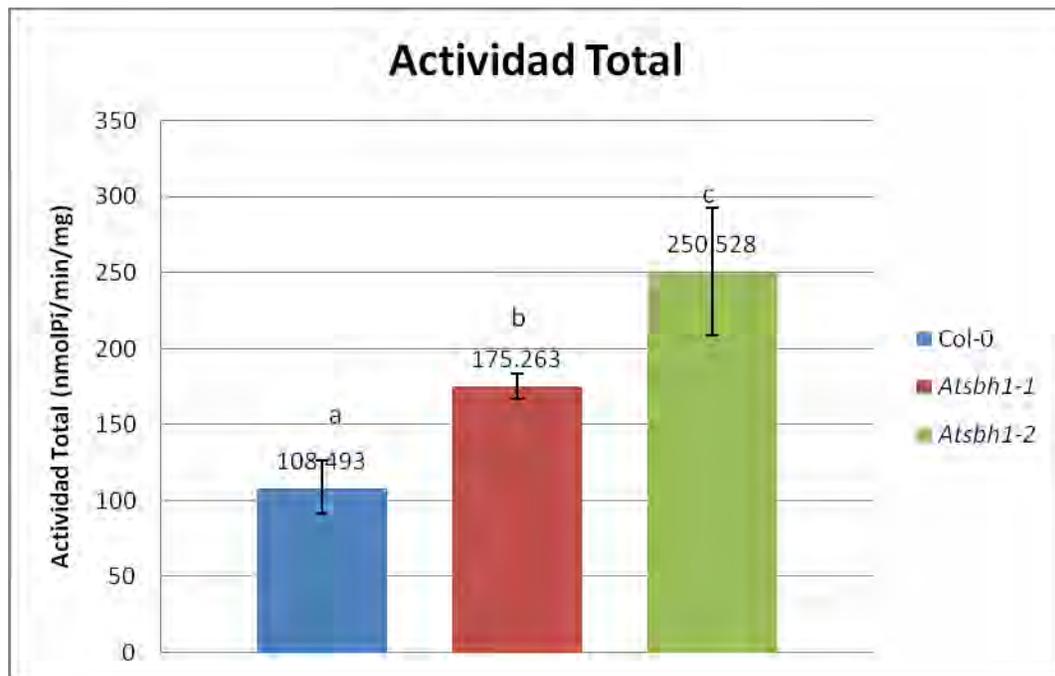
Tabla 7. 4 Hidrólisis de ATP de VMP de hojas de línea *Atsbh1-2* en presencia y ausencia de VO₄. La actividad de ATPasa se llevó a cabo con 5 ug de proteína membranal. Se determinó la liberación de Pi mediante un método colorimétrico. Se presentan los valores obtenidos en cada experimento junto con el promedio y el valor del error estándar (EE) de cuatro réplicas de dos preparaciones membranales independientes.

<i>Atsbh1-2</i>	Actividad Total (nmol Pi/min/mg)	Actividad Sensible a VO₄ (nmol Pi/min/mg)	% Inhibición por VO₄
Actividad Específica	239.38	146.70	61.28
	162.94	123.38	75.72
	364.94	226.14	61.97
	234.86	185.24	78.87
Promedio ± EE	250.53 ± 41.96	170.37 ± 22.55	69.46 ± 4.57

Tabla 7. 5 Resumen de los valores de Hidrólisis de ATP de las VMP de hojas de las líneas Col-0, *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* obtenidas recientemente. Se presentan los valores promedio \pm EE de los datos en tablas 7.2-7.4.

Línea de <i>A. thaliana</i>	Actividad Total (nmol Pi/min/mg)	Actividad Sensible a VO ₄ (nmol Pi/min/mg)	% Inhibición por VO ₄
Silvestre	108.49 \pm 17.62	48.15 \pm 2.91	48.75 \pm 5.06
<i>Atsbh1-1</i>	175.26 \pm 8.06	110.14 \pm 2.17	61.904 \pm 3.41
<i>Atsbh1-2</i>	250.53 \pm 41.96	170.37 \pm 22.55	69.46 \pm 4.57

Con el fin de facilitar la comparación de los valores de la hidrólisis de ATP en las diferentes preparaciones de VMP obtenidas recientemente se construyó la Tabla 7.5 a partir de los datos presentados en las Tablas 7.2-7.4. Estos mismos valores se presentan en las Gráficas 7.2-7.4.

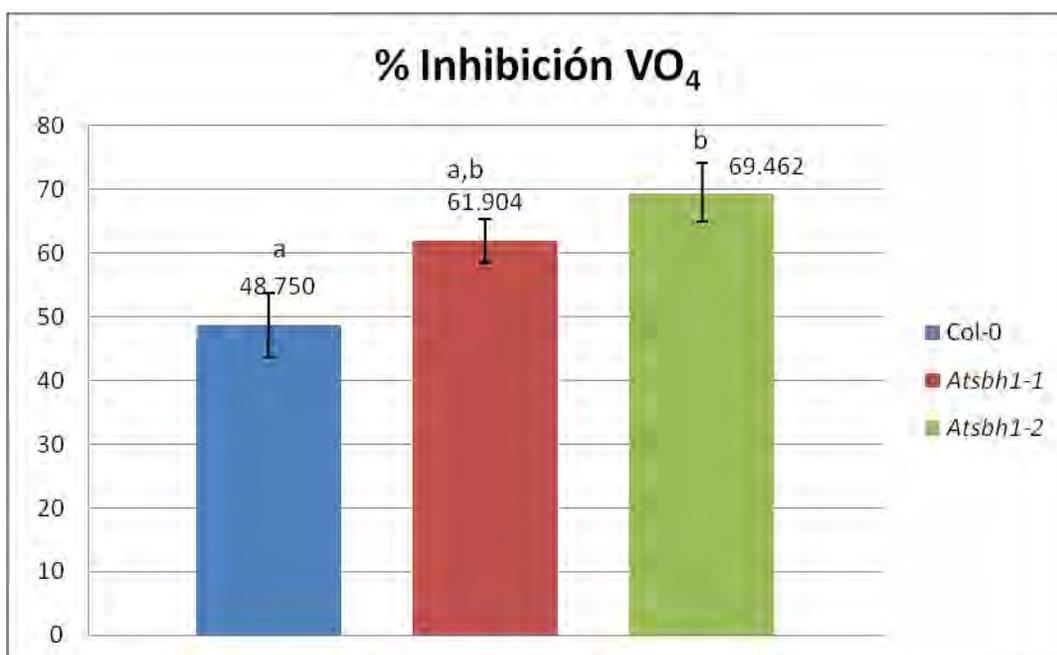


Gráfica 7. 2 Actividad Total de las VMP de *A. thaliana*, silvestre y de las mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*. Se obtuvieron preparaciones de VMP de plantas recientemente cosechadas. Se determinó la hidrólisis de ATP para cada una de ellas midiendo el Pi liberado de la reacción. Se presentan los datos de la actividad sensible a VO₄ referidos en las Tablas 7.2-7.4. Las diferencias significativas se indican por las letras a, b y c, según el análisis de varianza por el método de Bonferroni $\alpha=0.05$.

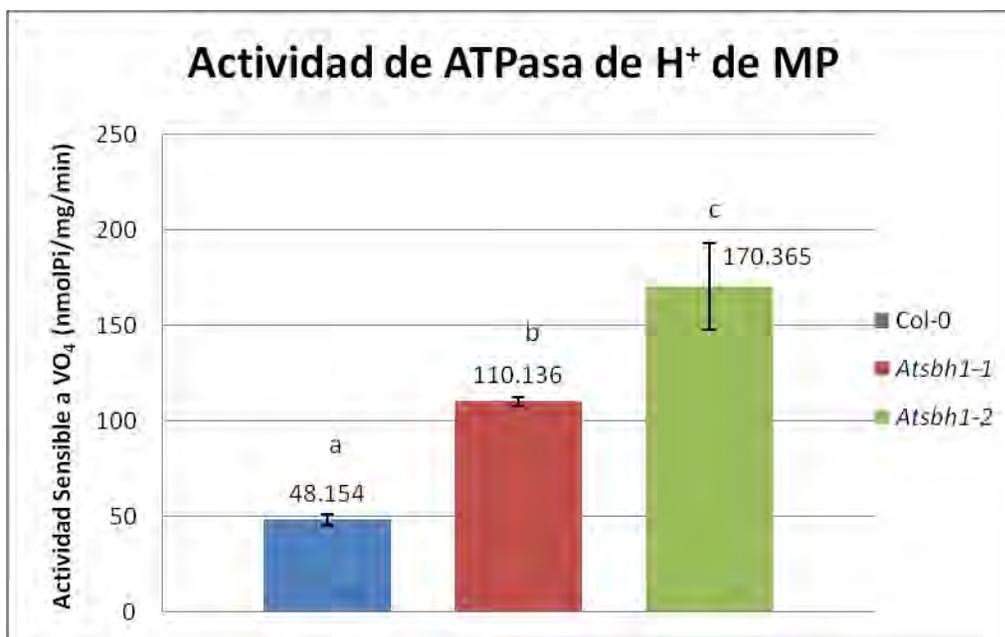
En la Gráfica 7.2 se comparan las actividades totales de las tres preparaciones frescas de VMP de las líneas de *A. thaliana* (Tablas 7.2-7.4). Se observa que la línea silvestre presentó un valor menor de Actividad Total que las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*, mientras que la mutante *Atsbh1-2* tiene una Actividad Total mayor que la mutante *Atsbh1-1*. Al realizar un análisis de varianza por el método estadístico de Bonferroni, se determinaron

diferencias significativas de actividad total entre todas las líneas de *A. thaliana*, la línea silvestre y ambas mutantes (*Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*).

En la Gráfica 7.3 observamos la comparación del % de Inhibición de la hidrólisis de ATP producida por la adición de VO_4 para las tres preparaciones de *A. thaliana*, en las cuales se observa que la línea silvestre Col-0 presenta un % de Inhibición menor (48.7%) a las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* (61.9% y 69.5%, respectivamente). Según el análisis de varianza realizado, el porcentaje de inhibición de la hidrólisis de ATP por vanadato en la línea silvestre y en la mutante *Atsbh1-1*, no presentó diferencias significativas, mientras que el de la línea silvestre y la línea mutante *Atsbh1-2* si presentó una diferencia significativa, y entre ambas líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* el porcentaje de inhibición de la hidrólisis de ATP por vanadato no presentó diferencias significativas entre sí.



Gráfica 7. 3 Porcentaje de inhibición por presencia de VO_4 . Se determinó la hidrólisis de ATP para cada una de ellas midiendo el Pi liberado de la reacción. El porcentaje corresponde a la cantidad de nmol Pi/mg/min inhibidos por VO_4 con respecto a la Actividad Total. Se presentan los datos de la actividad sensible a VO_4 referidos en las Tablas 7.2-7.4. Las diferencias significativas se indican por las letras a y b, según el análisis de varianza por el método de Bonferroni $\alpha=0.05$.



Gráfica 7. 4 Actividad Sensible a VO₄ de las VMP de *A. thaliana*, silvestre y de las mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*. Se obtuvieron preparaciones de VMP de plantas recientemente cosechadas. Se determinó la hidrólisis de ATP para cada una de ellas midiendo el Pi liberado de la reacción. Se presentan los datos de la actividad sensible a VO₄ referidos en las Tablas 7.2-7.4. Las diferencias significativas se indican por las letras a, b y c, según el análisis de varianza por el método de Bonferroni $\alpha=0.05$.

En la Gráfica 7.4 se comparan las actividades sensibles a vanadato de las nuevas preparaciones de las tres líneas de *A. thaliana* utilizadas (Tablas 7.2-7.4). Se observa que la actividad de la línea silvestre fue menor en comparación a la de las líneas mutante (*Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*), dentro de las cuales la línea *Atsbh1-2* presentó una actividad sensible a VO₄ mayor que la línea *Atsbh1-1*. Al realizar un análisis de varianza por el método estadístico de Bonferroni, se determinaron diferencias significativas entre todas las líneas de *A. thaliana*.

7.3. Determinación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de las VMP de *A. thaliana* de las líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1* expuestas a diferentes tiempos de incubación.

Con el fin de determinar si existía algún efecto del grado de hidroxilación de los esfingolípidos complejos y la estabilidad a altas temperaturas por parte de la enzima ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, se realizaron ensayos de hidrólisis de ATP con diferentes tiempos de pre-incubación a 29°C con preparaciones de VMP de la línea silvestre Col-0 y la línea mutante *Atsbh1-1*.

En la Tabla 7.6 y la Gráfica 7.5, se presentan las actividades insensibles a N₃/MoO₄/NO₃ (nmolPi/mg/min) obtenidas tras diferentes tiempos de incubación para la línea Col-0 y la línea

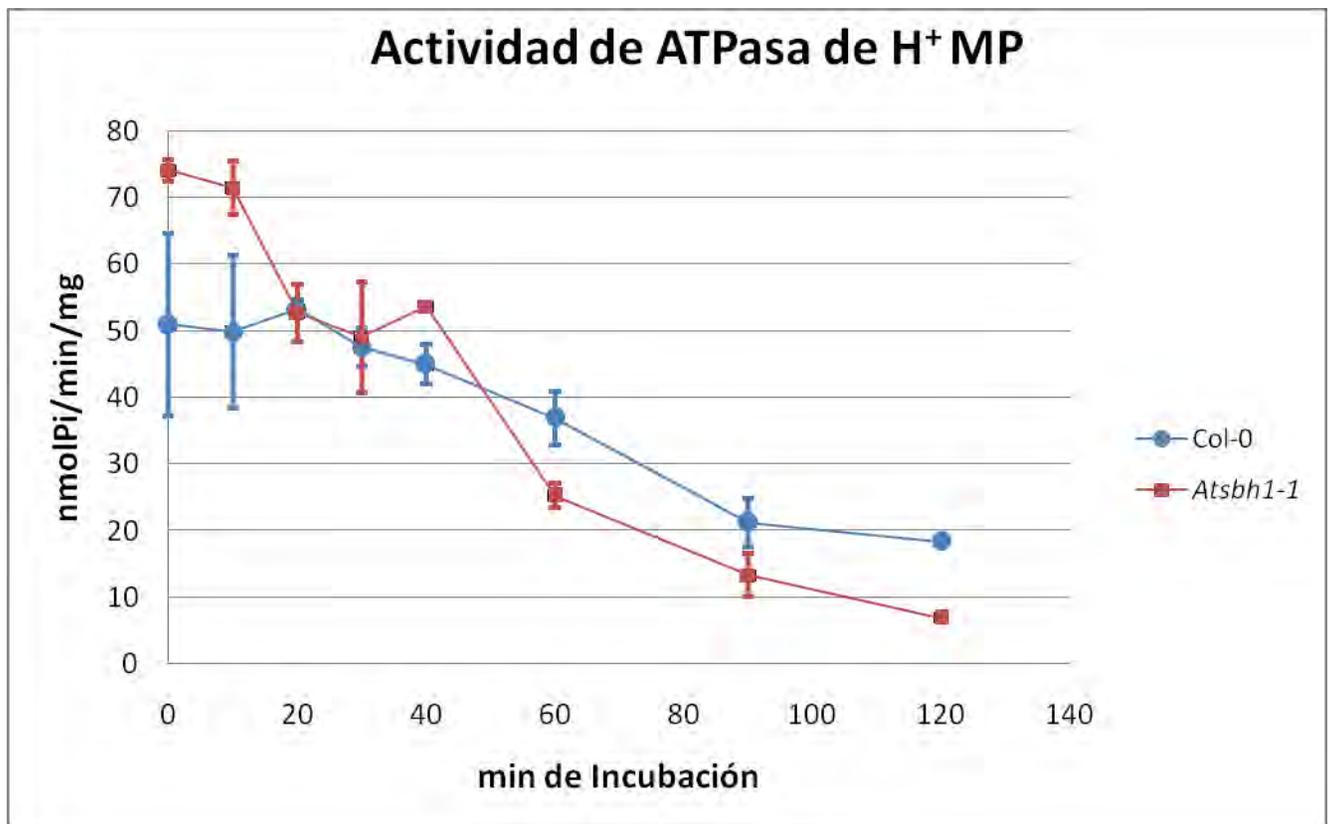
Atsbh1-1. Dicha actividad es representativa de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, ya que los inhibidores presentes inhiben el resto de las posibles enzimas y contaminantes que hidrolizan el ATP (ATPasa de H⁺ mitocondrial, V-ATPasa de H⁺ de tonoplasto y fosfatasas).

Tabla 7. 6 Hidrólisis de ATP de VMP de hojas de Col-0 y *Atsbh1-1* en presencia de N₃/MoO₄/NO₃ (nmolPi/mg/min) (Actividad insensible a de N₃/MoO₄/NO₃). Se presentan los valores promedio con DS de tres repeticiones de una preparación independiente para cada una de las líneas silvestre Col-0 y mutante *Atsbh1-1*. Para el tiempo de incubación de 120 min se realizó una sola determinación, por lo que no se presenta DS.

Pre-incubación (min)	Col-0 (nmol Pi/min/mg)	<i>Atsbh1-1</i> (nmol Pi/min/mg)
0	50.910 ± 13.745	74.085 ± 1.613
10	49.829 ± 11.522	71.429 ± 4.019
20	53.240 ± 1.340	52.646 ± 4.323
30	47.556 ± 2.947	49.072 ± 8.306
40	44.903 ± 2.947	53.619 ± 0.268
60	36.946 ± 4.019	25.249 ± 1.804
90	21.257 ± 3.621	13.288 ± 3.278
120	18.369	6.897

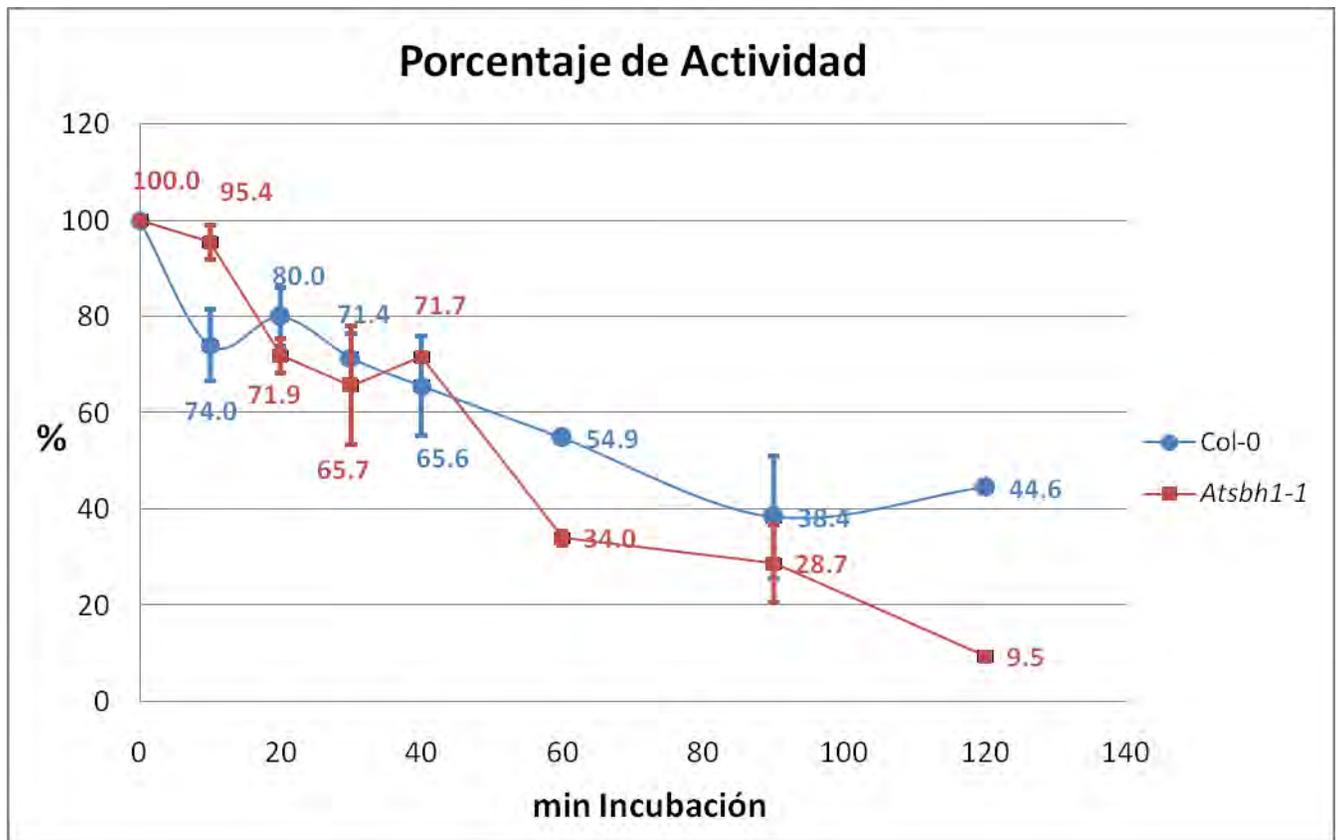
En la Gráfica 7.5 se presenta una curva de actividad de ATPasa de H⁺ de MP con respecto al tiempo de incubación a 29°C, en la cual observamos que la línea silvestre presentó valores constantes hasta los 40 min de incubación (alrededor de 50 nmolPi/min/mg), después de los 60 min presentó una disminución de la actividad (36 nmolPi/min/mg), la cual volvió a disminuir tras 90 min y se mantuvo aparentemente constante hasta los 120 min de incubación (alrededor de 20 nmolPi/min/mg). Sin embargo, los valores de los dos primeros tiempos de incubación presentaron altos valores de desviación estándar, por lo que no podemos afirmar si la actividad presenta cambios durante los primeros minutos de incubación.

En cuanto a la línea mutante *Atsbh1-1*, al igual que la línea silvestre, volvió a presentar una tendencia de disminución de la actividad con respecto al tiempo; observamos que presenta una primera disminución tras los 20 min de incubación, la cual se mantuvo de los 20 min a los 40 min en valores cercanos a 50 nmolPi/min/mg. Tras los 60 min de incubación la actividad volvió a disminuir hasta llegar a su punto más bajo (6.9 nmolPi/min/mg) después de los 120 min.



Gráfica 7. 5 Actividad de ATPasa de H⁺ de MP de las VMP de *A. thaliana* silvestre y mutante *Atsbh1-1*. Se determinó la hidrólisis de ATP en presencia de N₃/MoO₄/NO₃ con datos referidos a la Tabla 7.6. Para los valores correspondientes a 120 min de Incubación se realizó una sola determinación, por lo que no presenta DS.

También se realizó una gráfica de porcentaje de actividad tomando el tiempo de 0 min de incubación como el 100% de la actividad para cada experimento, de tal manera que podríamos observar la tendencia de la actividad en cada línea de *A. thaliana* tras la pre-incubación, pero tomando en cuenta su propio nivel inicial de actividad. Estos resultados se presentan en la Gráfica 7.6, en la cual podemos observar que sólo a los 10, 60 y 120 min de pre-incubación se presentó una ligera disminución de la actividad en la línea mutante con respecto a la control, sin embargo, el resultado de 120 min no presenta DS ya que se realizó en un solo ensayo. En general, podemos decir que las líneas de *A. thaliana* presentan diferencias pequeñas y únicamente a 10 min y 60 min de pre-incubación. El resto de los puntos de las curvas de las dos líneas no presenta diferencias



Gráfica 7. 6 Porcentaje de disminución de la Actividad de la ATPasa de H⁺ de MP con respecto al tiempo de pre-incubación a 29°C de las VMP de *A. thaliana* silvestre y mutante *Atsbh1-1*. Se calcularon los porcentajes tomando como el 100% el valor al tiempo 0 min.

8. DISCUSIÓN

8.1. Estandarización de condiciones para la inmunodetección de enzimas marcadoras

En este trabajo, se llevó a cabo la determinación de las preparaciones membranales de las dos líneas con mutaciones independientes en el gene de la hidroxilasa SBH1 (líneas *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*). Los geles control que se tiñeron con Azul de Coomassie o con nitrato de plata se introdujeron con el fin de asegurar una aplicación equivalente de proteína total en todos los carriles con muestras diferentes y que las diferencias en la intensidad de las bandas inmunodetectadas específicamente reflejaran una mayor o menor abundancia de la proteína debido a la condición experimental y no a la cantidad de proteína total aplicada al carril, ya que esta técnica de inmunodetección no es cuantitativa y se basa en la comparación relativa entre muestras con igual cantidad de proteína total (Protein Blotting Guide, BIO-RAD). Fue difícil equiparar el cargado entre los diferentes tipos de fracciones subcelulares, ya que cada una presentaba un patrón electroforético diferente inherente a la composición proteica específica de cada fracción. No obstante, se procuró ajustar la cantidad de proteína por línea lo más posible. La estandarización del cargado de la fracciones subcelulares fue eficiente tanto con Azul de Coomassie como con nitrato de plata, no obstante, la tinción con nitrato de plata permitió utilizar menor cantidad de muestra debido a su mayor sensibilidad.

Con objeto de seleccionar una solución bloqueadora, se compararon una solución de leche desgrasada comercial y la solución Bloqueadora Millipore. Las soluciones bloqueadoras comúnmente utilizadas para membranas de PVDF son bloqueadores estandarizados de alta calidad, conformados principalmente por proteínas de leche desgrasada pero suelen ser de mucho mayor costo que leche desgrasada comercial. El fin de la solución bloqueadora es unirse a los sitios desocupados de las membranas de PVDF y a aquellos sitios de proteínas que resultan o bien muy abundantes o bien con porciones antigénicas muy inespecíficas, de esta manera, la solución bloqueadora consiste de proteínas o compuestos que reaccionan con estos sitios, evitando la unión del anticuerpo a dichos sitios. Por ello, la solución bloqueadora contiene una mezcla de proteínas con una mayor afinidad a la membrana de PVDF que los anticuerpos utilizados, evitando que estos mismos se unan a la membrana presentando falsos positivos en la réplica de Western (Inmunodetection, Application and Product Guide, MILLIPORE; Protein Blotting Guide, BIO-RAD). Según los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 7.1), se seleccionó a la leche desgrasada comercial como bloqueador en las inmunorrélicas como sustituto de la solución Bloqueadora Millipore, ya que no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la dimensión e intensidades las bandas de respuesta a los anticuerpos utilizados y

se mostró un mayor contraste con el fondo, además que el uso de la solución con leche resulta de mucho más bajo costo.

Se probaron las condiciones de eficacia del reconocimiento de los anticuerpos por los correspondientes antígenos membranales además del tipo de revelado adecuado para cada uno. Las diferentes diluciones a las cuales se preparan los anticuerpos dependen de la afinidad y especificidad del anticuerpo utilizado a la proteína que se pretende detectar; mientras mayor sea la concentración del anticuerpo es más probable que ocurran uniones inespecíficas a la membrana de PVDF. Por lo mismo, se ensayan diluciones para encontrar la mínima concentración a la cual sea detectable, clara y definida la respuesta del anticuerpo hacia el antígeno. En cuanto al anticuerpo anti-Oxidasa Alterna se obtuvo un buen resultado al utilizar el primer anticuerpo a la dilución 1:1000, v:v y utilizando como segundo anticuerpo la fosfatasa alcalina 1:1000, v:v. Por otra parte el anticuerpo contra la Sub-E (Sub-E de ATPasa de H⁺ de tonoplasto) fue utilizado a una dilución 1:2000, v:v obteniéndose buenos resultados, y el revelado por reacción con la fosfatasa alcalina o con quimioluminiscencia que arrojó también resultados adecuados. Para el anticuerpo contra Psb-A, se utilizó a una concentración 1:10000, v:v y se realizaron revelados por quimioluminiscencia y por fosfatasa alcalina con buenos resultados. El anticuerpo anti-ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática fue utilizado con una concentración de 1:10000, v:v, y fue revelado por fosfatasa alcalina y por quimioluminiscencia; ambos revelados fueron de buena calidad.

Las diferentes técnicas de revelado utilizadas, fosfatasa alcalina y quimioluminiscencia, permitieron observar las respuestas del primer anticuerpo con una buena sensibilidad, al utilizar una reacción acoplada a un segundo anticuerpo. En realidad, la selección del método de revelado depende mucho de los niveles de la proteína antigénica para ser detectada en las muestras de interés. Según diferentes manuales de inmunodetección (Immunodetection, Application and Product Guide, MILLIPORE; Protein Blotting Guide, BIO-RAD), la quimioluminiscencia, utilizando como segundo anticuerpo a la peroxidasa, suele ser más sensible que la técnica colorimétrica utilizando fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. La elección del tipo de revelado depende de la especificidad del primer anticuerpo; por ejemplo, en nuestro caso, la réplica en Western contra la Psb-A, presentó muchas bandas alternas a la correspondiente a la banda de la Psb-A, por lo que una técnica menos sensible (fosfatasa alcalina), permite detectar más selectivamente a la principal banda de reacción, que es la más específica. Por otro lado, al utilizar diluciones con baja concentración, como es el caso de la réplica en Western contra ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (1:10000, v:v), suele ser mejor utilizar técnicas más sensibles para su revelado (quimioluminiscencia). En suma, para lograr un buen blot, se requiere considerar muchos factores: asegurar un buen cargado del gel

a partir de un buen gel control, una solución bloqueadora eficiente y de bajo costo, concentraciones adecuadas de los anticuerpos a utilizar y una buena técnica de revelado. Después de haber efectuado diferentes réplicas en Western modificando dichos factores, se lograron obtener blots con una respuesta clara y definida para las diferentes inmunorrélicas realizadas.

8.2. Determinación de la pureza de las muestras de VMP de Col-0 y *Atsbh1-1*.

Se encontró que las bandas de reconocimiento de los anticuerpos contra proteínas marcadoras de mitocondria, cloroplasto y vacuola (Oxidasa Alterna, Psb-A y Sub-E, respectivamente), presentaron una menor intensidad en los carriles de VMP con respecto a las fracciones microsomales y de homogenado, para la línea mutante y la línea silvestre. Por otra parte, la banda de reconocimiento a la proteína marcadora de membrana plasmática, la ATPasa de H⁺, presentó una mayor intensidad en los carriles correspondientes a las VMP con respecto a las fracciones microsomales y de homogenado, para ambas líneas.

De acuerdo a su calidad de enzimas marcadoras de membranas celulares, se esperaba que la intensidad de las bandas de las proteínas marcadoras con localización en membranas de organelos, como la Oxidasa Alterna, Psb-A y Sub-E (mitocondria, cloroplasto y vacuola, respectivamente) tuvieran una mayor intensidad en la fracción microsomal al encontrarse más concentradas que en el homogenado, y una menor intensidad de la fracción de VMP, al ser eliminadas en el proceso de purificación de la membrana plasmática. Esto se aprecia claramente para el reconocimiento de Oxidasa Alterna en los carriles de la mutante *Atsbh1-1* (Figura 7.7), donde la mayor intensidad de las bandas se presentó para la fracción microsomal; sin embargo esta misma tendencia no fue tan clara en la línea silvestre; probablemente porque las concentraciones de la enzima en la fracción microsomal y homogenada no son tan diferentes para ser apreciadas por una réplica en Western, al no ser un método cuantitativo (Protein Blotting Guide, BIO-RAD). Para el reconocimiento de la Sub-E del tonoplasto, se muestra una diferencia de intensidad entre la fracción microsomal y el homogenado tanto para la mutante *Atsbh1-1* como para la línea silvestre. Para el reconocimiento de la proteína Psb-A, marcadora de cloroplasto, se encontró una intensidad mayor para los carriles correspondientes al homogenado en comparación con la fracción microsomal y las VMP, tanto para la línea mutante *Atsbh1-1* como para la línea silvestre. Esto podría deberse a una posible pérdida del cloroplasto en la obtención de la fracción nuclear, disminuyendo la cantidad de la proteína marcadora, ya que al ser muy pesados, los cloroplastos pudieron haberse perdido en la centrifugación inicial.

Estos resultados indican que la purificación de membranas plasmáticas (VMP) fue buena, ya que por un lado, la ATPasa de H⁺ se presentó enriquecida en las VMP con respecto a las fracciones microsomales y las de homogenado, y por otro lado, las proteínas marcadoras de otro tipo de membranas (Oxidasa Alterna, Psb-A y Sub-E, de membrana mitocondrial y del tilacoide de cloroplasto, respectivamente) se encontraron más enriquecidas en la fracción microsomal y en el homogenado que en las VMP. Esto fue particularmente claro en las bandas de reconocimiento contra la Oxidasa Alterna, indicando que hay poca cantidad de membrana mitocondrial en las VMP, con respecto a la fracción microsomal y al homogenado.

Lo ideal en estos ensayos, sería que las enzimas marcadoras de mitocondria, cloroplasto y vacuola, no presentaran bandas de reconocimiento del anticuerpo en los carriles correspondientes a las VMP, o bien, que la intensidad fuera aun más baja que lo que se obtuvo. Esto indica que la purificación de las membranas plasmáticas, aunque muy aceptable, puede mejorarse, probablemente modificando el proceso de obtención de las membranas.

8.3. Determinación de la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Con las preparaciones que se tenían del 2008 de Meza Bernal de vesículas de membrana plasmáticas de plantas silvestres y mutantes *Atsbh1-1*, se obtuvieron resultados inesperados, ya que las actividades de la ATPasa de H⁺ de las líneas silvestre y mutante no presentaron diferencias significativas entre sí, y según lo reportado por Meza Bernal, la actividad de la mutante debía ser menor con respecto a la línea silvestre. Es probable que esta diferencia de resultados ocurriera, ya que aunque las muestras habían estado almacenadas a -70°C habían sido congeladas y descongeladas en repetidas ocasiones, lo que pudo ocasionar cambios en las vesículas de membrana plasmática, afectando la actividad de las mutantes. La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es uno de los principales sitios afectados bajo estrés abiótico, como congelación-descongelación, salinidad, entre otros. La recuperación de tejidos en plantas después de este tipo de estrés abiótico involucra a la recuperación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, lo cual sugiere que dicha enzima es sensible a ciclos de congelación-descongelación (Arora y Palta 1990). Los cambios de actividad de la ATPasa de la membrana plasmática bajo estrés de congelación-descongelación, son ocasionados por diferentes factores, tales como una disminución de moléculas de la ATPasa de H⁺ en la membrana, un cambio en la conformación de la enzima o bien, a la alteración del microambiente lipídico (Isvari y Palta, 1989). Por otro lado, Palmgren y colaboradores (1989), reportaron una forma de purificar las vesículas de membrana plasmática a partir de ciclos de congelación-descongelación, en donde las vesículas se rompían y volvían a sellarse de dos

diferentes maneras: el lado apoplástico por fuera y el lado citoplásmico por fuera y viceversa. Al aumentar la cantidad de ciclos de congelación-descongelación, la proporción de vesículas con el lado citoplásmico por fuera aumentaba. Teniendo vesículas con el lado citoplásmico por fuera, el sitio catalítico de la ATPasa de H^+ estaba expuesto al medio de hidrólisis, lo cual podría verse como un aumento en la actividad de la enzima, aunque también conllevaba a una mayor susceptibilidad a la inactivación. Considerando lo anterior, la recuperación de la actividad observada en la línea mutante *Atsbh1-1*, que era en la única en la cual se había estudiado la actividad de la ATPasa de H^+ previamente (Meza Bernal, 2008) y que en las determinaciones recientes alcanzó los niveles de actividad de la línea silvestre, podría explicarse por una sensibilidad a los ciclos de congelación-descongelación tanto de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, como de las mismas preparaciones de VMP. Sin embargo, ya que la actividad fue determinada en presencia de detergente, la posibilidad de que el sitio catalítico estuviera oculto en vesículas de polaridad invertida queda excluida.

Al realizar ensayos de hidrólisis con las muestras frescas de las líneas silvestre y mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*, observamos que el comportamiento de las actividades no correspondió a lo reportado por Meza Bernal, ni en sus preparaciones frescas (Meza Bernal, 2008) ni en las mismas pero medidas recientemente. De hecho, se encontró que para la línea silvestre, la actividad sensible a vanadato, que es la que corresponde a la actividad hidrolítica de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, presentó valores aproximadamente 2 veces menores a la mutante *Atsbh1-1* y aproximadamente 4 veces menores a la mutante *Atsbh1-2*. Comparativamente, Meza Bernal había encontrado que la línea mutante *Atsbh1-1* presentaba una actividad sensible a VO_4 aproximadamente 4 veces menor que la actividad de la línea silvestre, lo cual se esperaba encontrar también en la línea *Atsbh1-2*.

Según lo reportado por Haruta *et al.* (2010), la expresión de las diferentes isoformas de la ATPasa de H^+ en *A. thaliana*, cambia durante los diferentes estados del ciclo de vida de la planta. En especial, en la etapa de inicio de florecencia, la expresión de las ATPasas de H^+ más abundantes en la planta, AHA1 y AHA2 (Arabidopsis H⁺-ATPase 1 y 2), tiene una gran disminución en comparación con otras fases del ciclo de vida de la planta. Considerando lo anterior, los resultados obtenidos con las nuevas muestras podrían deberse a que las preparaciones tenían una expresión menor de la ATPasa de H^+ , pues la gran mayoría de las plantas cosechadas estaban en la fase de floración, por lo que es probable que la expresión de las isoformas AHA1 y AHA2 haya sido diferente que en las de las muestras de Meza Bernal frescas, afectando los valores de actividad. En relación a lo anterior, las muestras utilizadas por Meza Bernal, tenían aproximadamente 2 meses y medio de haber sido sembradas, mientras que las muestras frescas fueron sembradas en Diciembre del 2009 y cosechadas hasta Mayo

del 2010, con aproximadamente el doble de edad que las de Meza Bernal, pudiendo presentar diferencias en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, así como su expresión y contenido, ya que estos pueden verse alterados dependiendo del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Santoni *et al.*, 1991; Haruta *et al.*, 2010).

Por otro lado, observamos que la purificación de las membranas frescas analizada por los % de Inhibición por VO₄ (Gráfica 7.3) presentó valores menores a los esperados al utilizar la misma metodología que Meza Bernal. La línea silvestre presentó 48.8% de inhibición, en contra de un 69.7% reportado por Meza Bernal, mientras que la línea mutante *Atsbh1-1* presentó un 61.9% contra 84.32% de Meza Bernal. Ahora bien, según lo reportado por Meza Bernal, cuando aumentaba la purificación (% de inhibición por VO₄) de las VMP para la línea silvestre, aumentaba la Actividad Sensible a VO₄, mientras que para la línea mutante *Atsbh1-1*, al aumentar la purificación de las VMP, disminuía la actividad Sensible a VO₄. En los resultados ahora encontrados se observó que las actividades sensibles a VO₄ de las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* presentaron valores mayores que la línea silvestre, lo cual probablemente corresponde a una mayor purificación de las VMP en las líneas mutantes. Asimismo, Meza Bernal reportó valores menores de actividad sensible a VO₄ para la línea silvestre al tener un % de Inhibición por VO₄ cercano a 56%, los cuales son comparables con los resultados presentados en este trabajo.

La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, disminuye su actividad dependiendo del envejecimiento de las semillas (Sveinsdóttir *et al.*, 2008). Dicha disminución, puede deberse a una baja cantidad de la enzima en las VMP, o bien a una baja estabilidad. Esto pudo haber ocurrido con las semillas utilizadas, ya que en este trabajo se utilizaron semillas del mismo lote que utilizó Meza Bernal año y medio después.

8.4. Estabilidad de las VMP de *A. thaliana* de las líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1*.

Los esfingolípidos son componentes importantes en la estructura de la membrana plasmática, por lo que alteraciones en la composición de los mismos, afecta las propiedades físicas de las membranas e incluso la organización de las balsas lipídicas, las cuales han sido asociadas a funciones celulares involucrando diferentes enzimas, por ejemplo la ATPasa de H⁺ (Chen *et al.*, 2008; Borner *et al.*, 2005). La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es regulada desde niveles transcripcionales y post-transcripcionales, y por factores ambientales de la membrana, tales como los lípidos membranales. Esta dependencia lipídica sugiere una posible regulación de la ATPasa de H⁺ a través de una modificación de los lípidos que la rodean (Kasamo, 2003). Por otro lado, los esfingolípidos presentes en las membranas

plasmáticas de plantas han sido asociados a la estabilidad de la membrana ante diferentes tipos de estrés abiótico, por ejemplo, las bajas temperaturas (Werneke y Heinz, 2003; Pata *et al.*, 2009). Tomando lo anterior en cuenta, exploramos la posible influencia de las VMP de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre Col-0 y la mutante *Atsbh1-1* (con una disminución en las BCL trihidroxiladas y aumento en las BCL dihidroxiladas, con respecto a la silvestre (Chen *et al.*, 2008)) en cuanto a la actividad de la enzima ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Al incubar las VMP en un baño de 29°C durante diferentes periodos, encontramos una clara tendencia de disminución en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, tanto para la línea silvestre como para la línea mutante *Atsbh1-1*. A partir de los 10 min de incubación, las VMP de la línea silvestre disminuyeron a un 70% de su actividad y se mantuvieron estables hasta los 60 min. Esto ocurre de manera similar para la línea mutante *Atsbh1-1*, sin embargo, tras los primeros 10 min de incubación, se observa una menor disminución de la actividad en comparación con la línea silvestre (a 95% y 74%, respectivamente). Después de los 20 min, la línea mutante llega a los mismos valores que la línea silvestre (~70%). Después de 60 min de incubación, la línea mutante *Atsbh1-1* presentó una actividad menor que la línea silvestre. Durante el proceso de acondicionamiento a las temperaturas ocurren muchos cambios en la membrana plasmática, como alteraciones en la composición de lípidos y polipéptidos, la fluidez y la ultra estructura (Lindberg *et al.*, 2005). En nuestro caso, al tener únicamente las membranas plasmáticas aisladas (las VMP), podría ocurrir principalmente un cambio en la fluidez y en la ultraestructura de la membrana, ya que toda la maquinaria interna de la célula encargada de la síntesis y organización de nuevos lípidos y proteínas no está presente.

La actividad de algunas enzimas suelen ser dependientes de los efectos térmicos, por ejemplo, se ha encontrado que durante el acondicionamiento al frío los procesos de transporte activo membranal cambian, probablemente debido a alguna alteración en las propiedades de la ATPasa de H⁺, sin embargo los mecanismos de este cambio han sido investigados parcialmente postulando cambios en la conformación de la proteína, a la interacción lípido-proteína, a la pérdida de acoplamiento entre la hidrólisis del ATP y el transporte de H⁺, o a la pérdida del ATP disponible (Iswari y Palta, 1989; Arora y Palta, 1991; Kasamo, 2003; Lindberg *et al.*, 2005).

La línea mutante presentó una actividad mayor a la línea silvestre al inicio de la incubación, y después de los 60 min, comenzó a mostrar valores por debajo de la actividad de la línea silvestre. Esto podría hablar de una ligera menor estabilidad de la membrana plasmática de la línea mutante *Atsbh1-1* en comparación a la línea silvestre, afectando la actividad de la

ATPasa de H⁺. Los esfingolípidos afectan la fluidez de las monocapas de la membrana plasmática al formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, provocando una temperatura de transición menor. En particular, son las hidroxilaciones de las BCL de los esfingolípidos las que participan en la formación de los puentes de hidrógeno (Wright *et al.*, 2003; Pata *et al.*, 2010). Asimismo, un aumento en el nivel de hidroxilaciones de los esfingolípidos ha sido asociado a un aumento en la estabilidad de las membranas (Lynch y Dunn, 2003). La mutante *Atsbh1-1*, presenta una disminución de trihidroxilaciones, lo cual afectaría la cantidad y estructura de los enlaces en las VMP modificando la fluidez y por lo mismo, la estabilidad de la membrana al ser expuestas a altas temperaturas.

8.5. Resumen

- La proteína marcadora de membrana plasmática (ATPasa de H⁺) utilizada para la comprobación de la pureza presentó un enriquecimiento en las VMP, mientras que las proteínas marcadoras de otro tipo de membrana celular (vacuola, cloroplasto y mitocondria), presentaron un mayor enriquecimiento en las fracciones microsomales o en el homogenado. Lo anterior indica que la que las VMP se obtuvieron con una pureza adecuada.
- No se encontró una influencia entre el grado de hidroxilación de las bases de cadena larga de los esfingolípidos y la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Sin embargo, las VMP utilizadas presentaron una pureza menor a la esperada pudiendo perturbar los resultados. Los resultados obtenidos pueden deberse a una alteración de la enzima debida al estado fisiológico y metabólico de la planta, o bien a el probable envejecimiento de las semillas utilizadas.
- Tanto las VMP de la línea silvestre Col-0 como de las de la mutante *Atsbh1-1* presentaron la misma tendencia negativa en la Actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática con respecto al tiempo de incubación a 29°C, demostrando que la actividad de dicha enzima se ve afectada por la temperatura, probablemente correspondiente a un cambio en la fluidez de la membrana o a la alteración en las interacciones lípido-proteína.
- La línea mutante *Atsbh1-1* presentó una actividad menor que la línea silvestre después de 60 min de incubación, lo cual podría significar que existe una influencia entre el grado de hidroxilaciones de las BCL de los esfingolípidos y la estabilidad de la membrana, afectando de esta manera la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

9. CONCLUSIONES

- Las VMP presentaron un enriquecimiento del marcador de membrana plasmática, indicando una pureza adecuada.
- Las preparaciones recientes de nuevas plantas de las líneas silvestre y mutantes presentaron una pureza menor a la de las reportadas en el trabajo de Meza-Bernal. En las actuales no se observó un efecto del grado de hidroxilación de las bases de cadena larga de los esfingolípidos y la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.
- Los resultados obtenidos pueden deberse a una alteración de la enzima debida al estado fisiológico y metabólico de la planta, o bien al probable envejecimiento de las semillas utilizadas.
- La actividad de la ATPasa de H^+ en un medio carente del sustrato se redujo tanto en la línea silvestre como en la mutante. Sin embargo, en la última, la disminución fue mayor, sugiriendo un ligero efecto de los esfingolípidos trihidroxilados en la actividad de la enzima.

10. PERSPECTIVAS

Determinar la causa de la diferencia de actividades de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática entre los resultados obtenidos por Meza Bernal (2008) y los presentados en este trabajo con el fin de concretar el efecto del nivel de hidroxilaciones de las bases esfingoideas de los esfingolípidos complejos. Para ello, sería conveniente volver a cosechar plantas de las líneas silvestre y mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*, para volver a obtener nuevas muestras frescas de VMP. Utilizar la metodología descrita por Palmgren *et al* (1989) para obtener preparaciones de VMP más puras y con el lado citoplásmico por fuera, de manera que se puede evidenciar con mayor claridad el comportamiento de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática para la línea silvestre y las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2*. De igual manera, sería interesante determinar diferencias en la actividad de la ATPasa de H⁺ mediante ensayos de hidrólisis de ATP en presencia de inhibidores a partir de fracciones microsomales de las tres líneas de *A. thaliana*.

Realizar nuevas determinaciones de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática con pre-incubaciones a diferentes temperaturas (25-50 °C) para conocer si las VMP de las líneas silvestre y mutante *Atsbh1-1* presentan diferencias mayores de actividad de la ATPasa de H⁺ a diferentes temperaturas de incubación. Incluir a la mutante *Atsbh1-2* en las determinaciones con el fin de determinar la dependencia del grado de hidroxilación sobre la estabilidad de la membrana.

Conocer si otras proteínas membranales muestran cambios en su actividad en VMP de las líneas mutantes *Atsbh1-1* y *Atsbh1-2* con respecto a la línea silvestre, con el fin de demostrar la importancia de los esfingolípidos en la actividad de proteínas membranales así como de la funcionalidad general como parte de la membrana plasmática.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alsterfjord M, Shehnke P, Arkell A, Larsson H, Svannelid F, Rosenquist M, Ferl R, Sommarin M, Larsson C** (2004) Plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves: Evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase interaction, *Plant Cell Physiology*, 45: 1202-1210.
2. **Arora E, Palta J** (1990), A loss in the plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and post thaw recovery in onion bulb scale tissue, *Plant Physiology*, 95: 846-852.
3. **Bath R, Panstruga R** (2005) Lipid rafts in plants, *Planta*, 223: 5-19.
4. **Borner G HH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, MacAskill A, Napier J, Beale M, Lilley K, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts, *Plant Physiology*, 137: 104-116.
5. **Briskin D.P, Leonard R.T, Hodges T. K** (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods of Enzymology*. 148: 542-568.
6. **Bromely PE, Li YO, Murphy SM, Summer CM, Lynch DV**, (2003) Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417: 219-226.
7. **Buchanan B, Gruissem W, Jones R** (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Biologist, Rockville.
8. **Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM y Cahoon EB** (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *The Plant Cell* 18: 3576-3593.
9. **Chen M, Markham J, Dietrich C, Jaworsky J, Cahoon EB** (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 20: 1862-1878.
10. **Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J, and Gavilanes-Ruiz M**,

(2008) Plant sphingolipids: structure, synthesis, and function. in: lipids in Photosynthesis: essential and regulatory functions. (H. Wada and N. Murata eds.). Advances in Photosynthesis and Respiration. Vol. 30. Series editor, Govindjee. Springer. New York. 77-116.

11. Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assman SM, Spiegel S (2005)

Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture, *Plant Physiology*, 137: 724-737.

12. Duby G, Poreba W, Piotrowiak D, Bobik K, Derua R, Waelkens E, Boutry M (2009)

Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H⁺-ATPase C-terminal region, *Journal of Biological Chemistry*, 284: 4213-4221.

13. Duby G, Boutry M (2009)

The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles, *European Journal of Physiology*, 457: 645-655.

14. Gaidd B, Timischl B, Corbino L, Schneiter R (2005)

Synthesis of Sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast, *Journal of Biology Chemistry*, 280: 22515-22522.

15. Gaxiola R, Palmgren M, Schumacher K, (2007)

Plant proton pumps, *FEBS Letters*, 581: 2204–2214.

16. Haruta M, Burch H, Nelson R, Barrett-Wilt G, Kline K, Moshin S, Young J, Otegui M, Sussman M, (2010),

Molecular characterization of mutant Arabidopsis plants with reduced plasma membrane proton pump activity, *Journal of Biology Chemistry*, 285: 17918-17929.

17. Immunodetection Application and Product Guide, MILLIPORE.

18. Iswari S, Palta JP (1989)

Plasma membrane ATPase activity following reversible and irreversible freezing injury, *Plant Physiology*, 90: 1088-1095.

19. Kasamo K (2003)

Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase by the membrane environment, *Journal of Plant Research*, 116: 517-523.

20. **Liang H, Yao N, Tae Song J, Luo S, Lu H, Greenberg JT** (2003) Ceramides modulated programmed cell death in plants, *Genes & Development*, 17: 2636-2641.
21. **Lindberg S, Banas A, Stymne S** (2005) Effects of different cultivation temperatures on plasma membrane ATPase activity and lipid composition of sugar beet roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 261-268.
22. **Lynch DV, Dunn TM** (2004) An Introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and functions, *New Phytologist*, 161: 677-702.
23. **Lynch DV, Chen M, Cahoon EB** (2009) Lipid signaling in Arabidopsis: no sphingosine? No problem!, *Trends in Plant Science*, 14: 463-466.
24. **Markham J, Li J, Cahoon E, Jaworski J** (2006), Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves, *Journal of Biological Chemistry*, 281: 22684-22694.
25. **Meza-Bernal L** (2008) Aislamiento de membranas plasmáticas de una línea de *Arabidopsis thaliana* defectuosa en la hidroxilación de bases de cadena larga. Tesis experimental de Licenciatura. Carrera de Química en Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
26. **Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule J, Blein J, Simon-Plas F** (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes, *Molecular & Cellular Proteomics* 58: 1396-1411.
27. **Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Görg A** (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*. 1: 1359-1363.
28. **Nelson D, Cox M** (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ra Ed., Worth Publishers, Nueva York.
29. **Ng CK-Y, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-599.
30. **Palmgren M, Askerlund P, Fredrikson K, Widell S, Sommarin M, Larsson C** (1989),

Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles, *Plant Physiology*, 92: 871-880.

31. **Palmgren M** (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake, *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 817-845.
32. **Pata M, Hannun Y, Ng C** (2009) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx, *New Phytologist*, 185: 611-630.
33. **Pedersen B, Buch-Pedersen M, Morth JP, Palmgren M, Nissen P** (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump, *Nature*, 450: 1111-1115.
34. **Peterson GL** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable, *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356.
35. **Protein Blotting Guide, A Guide to Transfer and Detection**, 3^a Edición, BIO-RAD.
36. **Resenberg I** (1996), *Protein analysis and purification*, Benchtop Techniques, Birkhäuser Boston, Los Ángeles.
37. **Sánchez-Nieto S, García-Rubio O, Pacheco-Moisés F, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes-Ruiz M** (1997) Purification of plasma membrane from dry maize embryos, *Plant Physiology*, 101: 157-164.
38. **Santoni V, Vansuyt G, Rossingol M** (1991) The changing sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase: Relationship between plant development and ATPase content of membranes, *Planta*, 185: 227-232.
39. **Sondergaard T, Schulz A, Palmgren, M** (2004) Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase, *Plant Physiology*, 136: 2475-2482.
40. **Sperling P, Heinz E** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1632:1-15.
41. **Speth C, Jaspert N, Marcon C, Oecking C** (2010) Regulation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by its C-terminal domain: what do we know for sure?, *European Journal of Cell Biology*, 89: 145-151.
42. **Sveinsdóttir H, Yan F, Zhu Y, Peiter-Volk T, Schubert S** (2008) Seed ageing-

induced inhibition of germination and post-germination root growth is related to lower activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots, *Journal of Plant Physiology*, 10.1016

- 43. Wernecke D, Heinz E** (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi, *Cellular and Molecular Life Science*, 60:919-941.
- 44. Worrall D, Ng CK-Y, Hetherington AM** (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling, *Trends in Plant Science*, 8,7:317-320
- 45. Wrigth B, Snow J, O'Brien T, Lynch DV** (2003) Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Biochim-Biophys* 415:184-192.