



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CONTRIBUCIÓN DEL NIVEL DE PROTEÍNA Y DE
GLICEROLÍPIDOS A LA ACTIVACIÓN DE LA ATPasa DE
H⁺ DE LA LÍNEA *Atlcb2b hp/Atlcb2a* DE *Arabidopsis
thaliana*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A
MA. FERNANDA CORNEJO GRANADOS



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora Marina Gavilanes Ruiz

VOCAL: Profesor J. Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Profesora Sobeida Sánchez Nieto

1er. SUPLENTE: Profesora Ma. Elena Ibarra Rubio

2° SUPLENTE: Profesora Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Depto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ
ASESOR DEL TEMA

MA. FERNANDA CORNEJO GRANADOS
SUSTENTANTE

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis se realizó bajo la asesoría de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Depto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Ma. Fernanda Cornejo Granados realizó esta tesis de licenciatura en un proyecto financiado por DGAPA, UNAM (PAPIIT No. IN211409) y por CONACYT (101521) y con el apoyo de una beca del programa PAPIIT No. IN211409 (DGAPA, UNAM).

Se agradece también el apoyo del Dr. Edgar B. Cahoon del Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry en la Universidad de Nebraska-Lincoln, por proporcionarnos las mutantes de *A. thaliana* utilizadas para este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Fue un largo proceso para llegar a este momento. Fue necesario renunciar a varias cosas y tomar muchas decisiones...

Gracias a la Dra. Marina que me enseñó a no dar menos de lo que soy capaz y que todo el esfuerzo invertido al final se recompensa. Gracias a Chelo por toda su paciencia y ayuda en el laboratorio.

Muchas gracias a todos mis amigos de la Facultad, Ady, Diana, Sylvia, Mau, Rafa, Pao, Chigo, José, Nadia, Carlos, Jorge, Yessi. A algunos los conozco más que a otros, pero a todos los siento muy cercanos. A mis amigos del laboratorio, Dora, Cynthia, Francisco, Ari, Arturo, Doris, en este Congreso en Veracruz confirmé que son un muy buen equipo.

Gracias a todas las personas que me ayudaron a descubrir las cosas que quiero y no quiero en mi vida.

Fer

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Estructura lipídica de la membrana plasmática de las plantas	2
2. Características de las proteínas membranales	7
3. Importancia de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática en las plantas	8
4. Características de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática en las plantas	9
5. Interacción de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática con los lípidos membranales	13
III. ANTECEDENTES	16
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS	18
VI. RESULTADOS	34
1. Contenido membranal total de raíces en cada línea de <i>A. thaliana</i> . Rendimiento de proteína membranal	34
2. Contenido membranal total de las hojas en cada línea de <i>A. thaliana</i> . Rendimiento de proteína membranal	35
3. Determinación de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática en las fracciones microsomales de las hojas en cada línea de <i>A. thaliana</i> . Determinación de la hidrólisis total de ATP	37
4. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores N ₃ ⁻ NO ₃ ⁻ y MoO ₄ ²⁻	38
5. Determinación del nivel de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática en las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de <i>A thaliana</i>	40
6. Reconstitución membranal de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> con glicerolípidos y esfingolípidos comerciales después de 7 días de inducción con metoxifenoza y determinación de la hidrólisis total de ATP	43
7. Reconstitución membranal de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> con glicerolípidos y esfingolípidos comerciales después de 7 días de inducción con metoxifenoza y	

determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-}	45
8. Reconstitución membranal de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> después de 7 días de inducción con metoxifenoazida con un extracto de esfingolípidos y determinación de la actividad total de hidrólisis de ATP	47
9. Reconstitución membranal con extracto de esfingolípidos de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> después de 7 días de inducción con metoxifenoazida y determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-}	51
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
1. Contenido total membranal en las fracciones microsomales de plántulas de <i>A. thaliana</i> después de la exposición al inductor.....	57
2. Efectos de la disminución en el nivel de esfingolípidos endógenos por el silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la SPT en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática	58
3. Determinación del nivel de ATPasa de H^+ de membrana plasmática en las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de <i>A. thaliana</i>	59
4. Reconstitución membranal de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> . Efectos en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática	60
a) Reconstitución membranal utilizando preparaciones comerciales de esfingolípidos y glicerolípidos	61
b) Reconstitución membranal utilizando un extracto de esfingolípidos.....	64
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. PERSPECTIVAS	68
X. APÉNDICE	69
1. Resultados individuales del contenido membranal total de hojas en cada línea de <i>A. thaliana</i>	69
2. Reactivos y soluciones	70
XI. REFERENCIAS	79

I. RESUMEN

La ATPasa de H^+ cataliza la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ desde el citosol hasta el espacio apoplástico, estableciendo un gradiente electroquímico de H^+ necesario para múltiples actividades celulares. Como proteína transmembranal, la ATPasa de H^+ desempeña su función óptima en su ambiente lipídico nativo. En el laboratorio se ha estudiado la influencia de los esfingolípidos en la actividad de esta enzima en preparaciones membranales de *A. thaliana* tanto del genotipo silvestre como de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2*, la cual, por manipulación genética de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), cuenta con 38% menos de esfingolípidos que las plantas silvestres. Se ha encontrado que esto provoca un aumento de cerca del 100% en la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H^+ en comparación con la línea silvestre.

Este proyecto pretende establecer si el aumento de la actividad de la enzima en las plántulas de la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* corresponde a un aumento en la cantidad de proteína en la membrana y si los glicerolípidos remanentes en las fracciones enriquecidas en esfingolípidos contribuyen o no a este aumento de actividad. También se explorará si esfingolípidos exógenos restituyen la baja actividad de la enzima.

Se observó que la disminución de esfingolípidos aumenta la actividad de ATPasa en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2* alrededor de un 70% con respecto a las líneas control. Así mismo, la inmunodetección reveló que no existe una diferencia significativa entre los niveles de proteína de las diferentes líneas y que por lo tanto la diferencia en la actividad no es por una disminución de la enzima. Por último después de la reconstitución membranal con diferentes lípidos exógenos, se observó que su presencia en la membrana en proporciones específicas parece ser un mecanismo por el cual se regula la enzima.

II. INTRODUCCIÓN

1. Estructura lipídica de la membrana plasmática de las plantas.

La principal función de la membrana plasmática es permitir la separación de espacios celulares internos y de los medios intra y extracelulares, manteniendo así, las propiedades de cada uno de ellos (Callen, 2000). Así, en las células vegetales, la membrana plasmática tiene como función delimitar a la célula y funcionar como una barrera permeable entre ésta y el exterior.

Los principales componentes membranales son las proteínas, carbohidratos y diferentes tipos de lípidos, entre los cuales están los glicerolípidos, esfingolípidos, esteroides y terpenos. Estos lípidos integran la matriz membranal formando las dos monocapas de una bicapa, la cual se ha establecido como la base de la estructura de todas las membranas celulares. Además, los lípidos proporcionan la matriz estructural y el medio anfipático de soporte para la estructura, también anfifílica, de las proteínas membranales (Luckey, 2008). Estas moléculas proteicas se mantienen unidas a la matriz lipídica mediante interacciones no covalentes, confiriendo estabilidad, continuidad estructural y permeabilidad selectiva a la membrana. Asimismo, las membranas constituyen una fuente de segundos mensajeros para la señalización intracelular de fenómenos que son percibidos en la parte externa de la célula (Gouaux y White, 2001). Los diferentes componentes membranales, lípidos, proteínas y carbohidratos, le dan características de asimetría, fluidez y carga de superficie a la membrana celular.

La asimetría está dada por la presencia de carbohidratos localizados en la cara no citosólica de la bicapa y por las diferentes proporciones de lípidos específicos en las monocapas externa e interna así como por la asimetría misma de las moléculas proteicas tanto integrales como periféricas (Figura 1).

La fluidez de la membrana se designa como la capacidad de sus diversos constituyentes para moverse sobre su sitio o desplazarse, en ocasiones, a distancias relativamente grandes; a esta fluidez contribuyen los movimientos

individuales de flexión y rotación de los lípidos, pero sobre todo, su movilidad lateral (Alberts *et al.*, 2002; Callen, 2000).

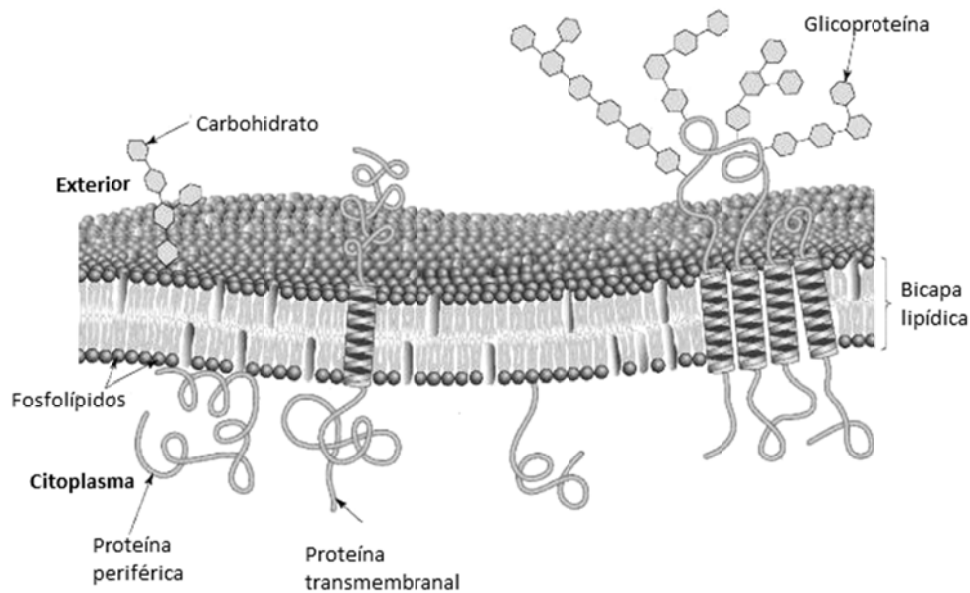


Figura 1. Componentes membranales. Las diferentes moléculas, lípidos, proteínas y carbohidratos dan a la membrana las características de permeabilidad, carga, fluidez y asimetría (Nelson y Cox, 2006).

Los cuatro tipos de lípidos membranales más importantes son:

- a) Los terpenos o terpenoides que forman la clase de lípidos menos abundante en la membrana. En su mayoría son considerados productos secundarios que participan en la defensa contra insectos o herbívoros (Srivastava, 2002). Otros tienen funciones durante el proceso de crecimiento, desarrollo celular, procesos de señalización y actúan como fuente de compuestos para la producción de hormonas. También son importantes al proporcionar estabilidad a la membrana. Algunos de estos compuestos, los llamados carotenoides, actúan como pigmentos complementarios en la fotosíntesis y protegen a los tejidos fotosintéticos de la fotooxidación (Taiz y Zeiger, 2006). Se caracterizan porque la base de su estructura es una unidad de cinco carbonos llamada isopreno. La unión de dos o más de estas unidades son el punto de partida para la formación de moléculas como el geranyl difosfato,

farnesil difosfato y geranil-geranil difosfato. El farnesil difosfato es importante en procesos de señalización celular y su dimerización lleva a la síntesis de triterpenos como los esteroides (Taiz y Zeiger, 2006). Estas cadenas, también participan dentro de la estructura de la membrana plasmática sirviendo como punto de anclaje hidrofóbico para las proteínas.

- b) La segunda clase de lípidos que sigue en abundancia son los esteroides, los más comunes en las membranas de plantas son el campesterol (C28), el sitosterol (C29) y el stigmasterol (C29), éste último siendo el más abundante, pues representa del 50% al 80% de los esteroides totales de algunas plantas (Buchanan *et al.*, 2000).

El colesterol es el esteroide libre más abundante de las células animales y es el menor componente en la mayoría de las especies de plantas analizadas hasta el momento con excepción de la avena. Los ésteres de esteroide, los glucósidos de esteroide y los glucósidos de esteroide acilados son más abundantes en plantas que en animales. Todos los esteroides de las plantas se sintetizan a partir del cicloartenol y presentan una alquilación característica en el C24 con sustituyentes en el C1 o el C2 (Buchanan *et al.*, 2000).

- c) Los fosfolípidos (PL) se consideran moléculas anfipáticas pues los grupos fosfato y los grupos de cabeza son las porciones polares, mientras que las cadenas de ácidos grasos son las partes no polares. En algunos PL que se encuentran en las membranas biológicas, las cadenas de ácidos grasos en el C1 del esqueleto de glicerol están saturadas, conteniendo de 16 a 18 carbonos, mientras que las cadenas que se encuentran en el C2 por lo general son insaturadas. Este tipo de lípidos definen los dominios polares y no polares de la bicapa membranal, lo cual tiene importancia en sus propiedades químicas, biológicas y físicas (Luckey, 2008).

Los glicerofosfolípidos, son un tipo de PL que forman la “columna vertebral” de la membrana plasmática. Estos lípidos tienen la siguiente estructura fundamental: una molécula de glicerol, dos moléculas de ácido graso, un

grupo fosfato y una molécula suplementaria enlazada al grupo fosfato. Esta molécula suplementaria puede ser un alcohol (e.g. glicerol, inositol, colina, o etanolamina) o un aminoácido como serina.

Así mismo, los glicerolípidos son fuente de segundos mensajeros para la señalización a través de la membrana, intensifican la actividad de las enzimas membranales y el transporte de solutos. También, su grado de insaturación contribuye a la fluidez de la membrana influyendo en la inserción de proteínas (Luckey, 2008).

- d) Los esfingolípidos son la clase más abundante de lípidos en las plantas, se encuentran en otros organismos eucariontes y en sólo unos pocos géneros bacterianos. Sólo en *Arabidopsis* se han descrito cerca de 168 clases distintas. Su estructura fundamental comprende una molécula de esfingosina (alcohol aminado de cadena de 18C), una molécula de ácido graso, una molécula de ácido fosfórico (en el caso de los esfingolípidos ácidos) y una molécula suplementaria que es en general de uno o varios carbohidratos enlazada al ácido fosfórico, este carbohidrato, en el caso de los esfingolípidos complejos neutros se encuentra unido directamente al OH del C1 de la esfingosina. Los esfingolípidos además de tener una función estructural tienen la capacidad de servir como ancla para las proteínas de membrana y también forman parte de microdominios membranales ricos en esteroides y esfingolípidos, llamados “balsas lipídicas” (Mongrand *et al.*, 2004).

Los esfingolípidos membranales se clasifican como esfingolípidos complejos (Figura 2), estos incluyen: glicosilinositol fosfoceramidas (GIPCs) y glicosilceramidas. Y sus intermediarios metabólicos, los cuales pueden provenir de las vías de biosíntesis o de degradación de los esfingolípidos complejos, estos comprenden a las ceramidas y a las bases de cadena larga libres (BCL), también llamadas bases esfingoideas.

Las ceramidas como especies libres tienen una menor abundancia y han sido poco descritas. Para su formación, el grupo amino de una BCL es

acilado a un ácido graso de entre 14 y 26 átomos de carbono (Pata *et al.*, 2010). Dicha *N*-acil-BCL es la columna vertebral de los esfingolípidos que se han encontrado en las células y por lo tanto se considera el bloque de construcción básico para la síntesis de esfingolípidos más complejos.

Los esfingolípidos complejos vegetales tienen una estructura muy diversa que se genera a partir de numerosas combinaciones posibles de versiones individuales de ácidos grasos, bases esfingoideas y grupos de cabeza (Markham *et al.*, 2007).

Las glicosilceramidas, a menudo llamadas cerebrósidos o glucocerebrósidos por ser similares a la galactosilceramida presente en el cerebro, tienen una cabeza polar formada por una hexosa (β -glucosa o β -manosa) unida al C1 de la BCL. Además, es frecuente que el ácido graso de las glicosilceramidas en las plantas esté α -hidroxilado en el C16 y al no contar con ácido fosfórico, el azúcar neutro de su cabeza polar le confiere la identidad a la molécula (Callen, 2000; Pata *et al.*, 2010).

A las glicosilceramidas se les han atribuido diversas funciones que incluyen la estabilidad y permeabilidad de la membrana, también se han asociado a la tolerancia al frío y congelación mediante un mecanismo de criostabilidad (Pata *et al.*, 2010). Así mismo se ha reportado su participación en la tolerancia a la sequía, ya que estudios han demostrado que la membrana vacuolar posee altas concentraciones de glicosilceramida cuando la planta se encuentra en un proceso de adaptación a ambientes de poca humedad.

Al contenido total de especies de esfingolípidos dentro de una planta determinada o de sus órganos o tejidos se le denomina “esfingolipidoma” y entre estos, los más abundantes en plantas y hongos, aunque ausentes en células animales son las GIPCs, a las cuales también se les denomina esfingolípidos ácidos o negativos porque cuentan con un grupo fosfato y las glucosilceramidas, también llamados esfingolípidos neutros.

Ensayos de solubilización y separación de este tipo de moléculas en hojas de *A. thaliana* han demostrado que los esfingolípidos de tipo aniónico contienen BCL trihidroxiladas en más del 95% de los casos y que los

esfingolípidos neutros contienen alrededor de 65% de BCL, que además de estar hidroxiladas presentan insaturaciones (Markham *et al.*, 2006). Así mismo, mediante ensayos de HPLC para analizar y caracterizar la fracción de esfingolípidos neutros se encontró que están presentes la ceramida, la 2-hidroxi-ceramida y la monohexosilceramida. Además, mediante espectroscopía de masas y analizando ahora la fracción de los esfingolípidos aniónicos, se determinó que el esfingolípido cargado más abundante en *Arabidopsis* podría ser la hexosa-hexurónico-inositolfosfoceramida (Markham *et al.*, 2006).

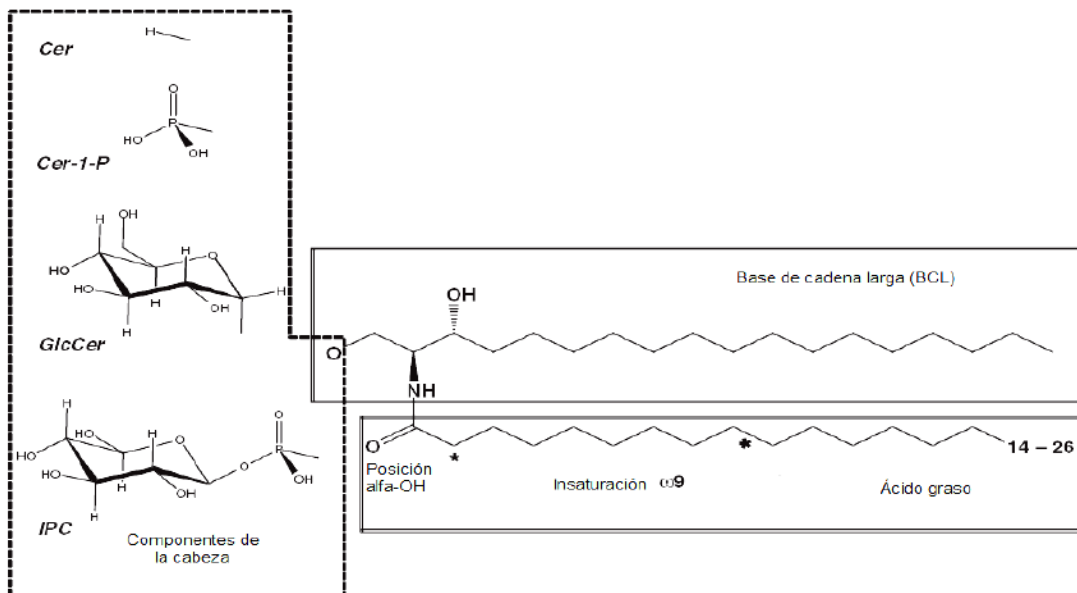


Figura 2. Esfingolípidos complejos de plantas. Formados por una ceramida (un ácido graso acilado a una BCL) que tiene un carácter hidrofóbico y una cabeza polar que puede ser un grupo fosfato (Cer-1-P), un azúcar (glicosilceramida, GlcCer) o un grupo fosfato unido a uno o más residuos de azúcar (inositolfosfoceramida, IPC) (Pata *et al.*, 2010).

2. Características de las proteínas membranales.

El tipo de asociación de las proteínas a la membrana usualmente refleja la función de las mismas (Alberts *et al.*, 2002). Las proteínas integrales forman enlaces fuertes y estables aunque no de tipo covalente con los lípidos. Estas proteínas presentan tanto regiones hidrofóbicas como hidrofílicas. Las regiones hidrofóbicas pasan a través de la membrana (una o varias veces mediante α -hélices u hojas β)

e interactúan con las colas acílicas de los lípidos en el interior de la bicapa; las regiones hidrofílicas están expuestas hacia el medio acuoso en uno y otro lado de la membrana.

Por otro lado, las proteínas periféricas no entran en contacto directo con la porción hidrofóbica de la bicapa, sino que están unidas mediante enlaces débiles con las proteínas integrales o bien con las partes polares de los lípidos. Dentro de las proteínas periféricas hay casos en los que las proteínas extrínsecas se unen a la bicapa por medio de enlaces covalentes con lípidos y en otros casos, a través de oligosacáridos unidos a lípidos. También, dentro de estas proteínas, se distinguen las de tipo interno y externo. Debido a su ubicación, las de tipo externo tienen las propiedades clásicas de proteínas hidrosolubles y sus interacciones con la membrana se rompen fácilmente por modificaciones de fuerza iónica o por el pH del entorno, ya que las interrumpen a nivel de enlaces electrostáticos (Callen, 2000).

3. Importancia de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las plantas.

Dentro de las proteínas de membrana plasmática que se encuentran en esta matriz lipídica de las plantas, está la ATPasa de H⁺, que se localiza tanto en las regiones fluidas de la membrana como en las regiones más ordenadas y menos fluidas como las balsas lipídicas (Mongrand *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2007; Laloï *et al.*, 2007; Kierszniowska *et al.*, 2009; Minami *et al.*, 2009). Esta enzima es una proteína transmembranal de gran importancia para los requerimientos de la célula, por lo que se sintetiza de manera constitutiva y abundante (Michelet y Boutry, 1995).

La ATPasa de H⁺ de membrana plasmática es considerada la bomba primaria más importante para las plantas, ya que es responsable de catalizar dos reacciones simultáneas esenciales para el mantenimiento de las células vegetales. Estas

reacciones son la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ desde el citosol hasta el espacio apoplástico en un movimiento en el que los H^+ se transfieren en contra de su gradiente de concentración (Figura 3). Esta enzima es la responsable de establecer el gradiente electroquímico que promueve el transporte secundario de múltiples solutos hacia el interior de la célula y ha sido clasificada como una enzima clave para la regulación de eventos celulares como la adaptación al frío (Sussman y Surowy, 1987), la elongación celular, la apertura y cierre de estomas, la nutrición celular y su participación en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Kasamo y Sakakibara, 1995). Así mismo, se ha reportado que la acción de hormonas, fitotoxinas, varios anfífilos y factores ambientales como la luz y la temperatura tienen un efecto en la actividad de la ATPasa de H^+ (Kasamo y Sakakibara, 1995).

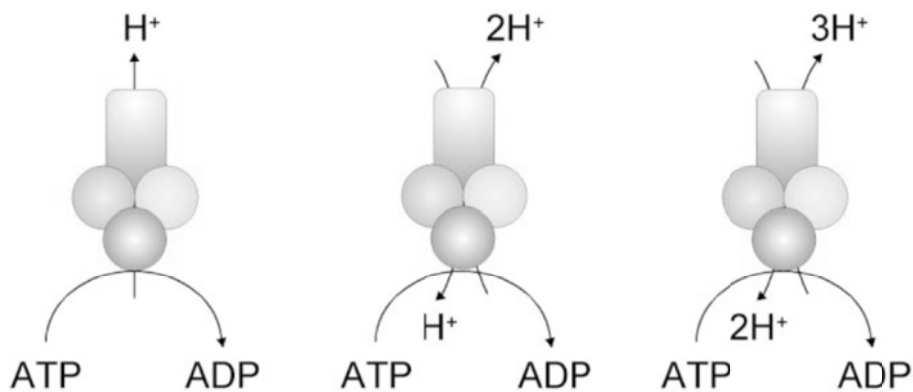


Figura 3. Modelo del mecanismo de bombeo de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática. El bombeo de H^+ y la hidrólisis de ATP ocurre en una relación 1:1 (Palmgren, 2001).

4. Características de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en las plantas.

Las bombas son complejos proteicos que como característica principal utilizan la energía de hidrólisis del ATP para impulsar el paso de iones a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración (Callen, 2000). Son

proteínas que llevan a cabo un transporte activo a una velocidad de 10^0 a 10^3 iones por segundo.

Dentro de estas bombas, está la ATPasa de H^+ de membrana plasmática que es una proteína integral cuyo peso aproximado es de 100 kDa y pertenece a la familia de ATPasas transductoras de energía del tipo P (Pedersen y Carafoli, 1987), al igual que la ATPasa de Ca^{2+} o la ATPasa de $Na^+ - K^+$ (Kasamo y Sakakibara, 1995), ya que al obtener la energía del ATP forman un intermediario fosforilado unido covalentemente en un residuo de ácido aspártico (Briskin y Poole, 1983; Vara y Serrano, 1983, Palmgren, 2001). Todos los miembros de esta clase de ATPasas son inhibidos por vanadato y cuentan con una subunidad catalítica que es fosforilada durante la reacción (Kasamo y Sakakibara 1995). Las ATPasas tipo P pueden presentarse en formas oligoméricas. En el caso de la ATPasa de H^+ , la proteína es funcional con sólo un monómero, sin embargo, está reportado que puede formar desde dímeros hasta hexámeros (Duby y Boutry, 2009).

La estructura primaria de varias ATPasas de H^+ en plantas fue deducida de la correspondiente secuencia de nucleótidos de cDNA. Estas han sido aisladas de *A. thaliana*, *N. plumbaginifolia*, *Z. mays*, etc. Parece ser que todas las ATPasas de plantas están codificadas por una familia multigénica y que las subfamilias tienen diferentes formas de expresión en varios órganos y desempeñan diferentes funciones fisiológicas (Kasamo y Sakakibara, 1995).

Estructuralmente, aproximadamente el 20% de la proteína se encuentra embebida en la membrana, esta región hidrofóbica está distribuida en 10 dominios transmembranales que son α -hélices nombradas de M1-M10 consistentes de entre 10 a 30 aminoácidos cada uno; alrededor del 70% es de carácter hidrofílico y está expuesto a la superficie del citoplasma, de ese lado también se encuentran los extremos amino y carboxilo. Sólo el 5% está expuesto al medio extracelular (Kasamo y Sakakibara, 1995).

La sección hidrofóbica está involucrada en la formación del canal transmembranal por donde son transportados los H^+ del citosol al espacio apoplástico.

El transporte de H^+ ocurre desde el citosol, el cual tiene un pH alrededor de 7.0 hasta el exterior de la célula o espacio apoplástico, con un pH entre 5 y 6. Estos valores indican que la concentración de H^+ libres en el interior de la célula es de aproximadamente 1×10^{-7} M y de 1×10^{-5} M en el exterior, haciendo evidente que el transporte de H^+ se realiza en contra del gradiente de concentración y que por eso necesita de energía para llevarse a cabo. Esta energía la toma de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por ella misma y que se realiza en el sitio activo localizado en el asa hidrofílica más grande, entre los dominios transmembranales M4 y M5. Dicha reacción es muy exergónica, libera entre 60 y 65 kJ/mol dependiendo de la concentración de ATP que hay en la célula (Nelson y Cox, 2006).

Este transporte de H^+ al exterior de la célula, genera un gradiente de concentración ($\Delta\mu_{H^+}$) a ambos lados de la membrana plasmática. El $\Delta\mu_{H^+}$ está compuesto de la diferencia en potencial eléctrico transmembranal ($\Delta\Psi$) y la diferencia de pH transmembranal (ΔpH), que juntos constituyen la fuerza impulsora energética necesaria para facilitar el transporte de solutos (iones, aminoácidos, azúcares, etc.) a través de los llamados transportadores secundarios como acarreadores y canales, siendo muchos de estos últimos sensibles al potencial electroquímico de H^+ .

El ión Mg^{2+} es esencial para esta actividad, ya que el sustrato de la reacción es Mg-ATP. Se ha sugerido que el ión Mg^{2+} se coordina a dos residuos de aspartato que se postula pueden ser el Asp588 y al Asp592, este enlace se propone próximo al Asp329, el cual se fosforila durante la catálisis (Palmgren, 2001).

Recientemente se logró obtener la estructura cristalizada de la forma activa de la ATPasa de H^+ , la cual se estudió con un complejo con adenosina 5'-(β - γ , metileno)-trifosfato (AMPPCP, un análogo no hidrolizable del ATP) y por medio de la difracción de rayos X de los cristales de la enzima pura pudieron identificarse cuatro dominios bien definidos (Figura 4):

1. El dominio transmembranal (M) de diez hélices involucradas en la formación del canal transmembranal por donde los H^+ son transportados desde el citosol hacia el espacio apoplástico.
2. El dominio catalítico (P) donde el aminoácido se fosforila covalentemente durante la catálisis.
3. El dominio que cuenta con el sitio de reconocimiento del nucleótido (N) y el sitio que estimula la desfosforilación de la enzima (A) (Palmgren y Christensen, 1994).

De las imágenes obtenidas se observa que el análogo de ATP está unido a través de la adenosina al dominio N y el grupo trifosfato está orientado hacia el dominio P. El dominio A se mueve lejos del dominio P, permitiendo que el dominio N se acerque lo necesario para que la fosforilación ocurra; el dominio N se inserta dentro del dominio P mediante una articulación o bisagra, así, con el nucleótido unido puede avanzar hacia el dominio P para montar el sitio catalítico en el cual el Asp329 será fosforilado en cada ciclo de bombeo (Pedersen *et al.*, 2007).

Con el uso de anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias de aminoácidos específicos de la proteína, se ha obtenido evidencia de la presencia de un dominio autoinhibitorio denominado R y se ha postulado que está formado por 100 aminoácidos localizados en la región C-terminal (Kasamo, 2003).

Se cree que la ATPasa de H^+ alterna entre al menos dos conformaciones principales, E_1 y E_2 . La forma E_1 tiene gran afinidad por el ATP, así como por el ión Mg^{2+} . La forma E_2 tiene baja afinidad por los ligandos, pero tiene alta afinidad por el inhibidor vanadato. Ésta es la forma que une covalentemente al P_i durante la reacción en el Asp329. El transporte del catión de un lado de la membrana hacia el otro lado está asociado con el cambio conformacional entre E_1 y E_2 ; esta característica sugiere un mecanismo de acoplamiento de la ATPasa de H^+ entre la formación del sitio de fosforilación en los dominios citoplasmáticos y la oclusión de los sitios de unión al H^+ (Palmgren, 2001; Pedersen *et al.*, 2007).

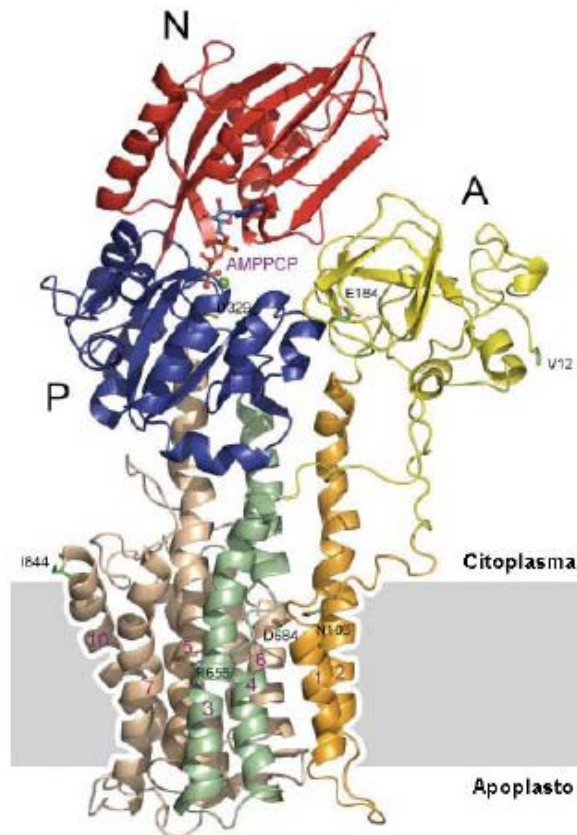


Figura 4. Estructura cristalográfica de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

La estructura presenta la forma activa de la bomba de protones (sin el carboxilo terminal auto-inhibitorio), formando el complejo Mg-AMPPCP. Las 10 α -hélices indicadas en los colores naranja, verde y café; el dominio de unión al nucleótido (N) en rojo, el dominio de fosforilación (P) en azul y el sitio que estimula la defosforilación (A) en amarillo. El Mg-AMPPCP se encuentra en la interfase de los dominios N y P representado en forma de esferas y cilindros. El rectángulo gris muestra la posible localización de la membrana plasmática (modificada de Pedersen *et al.*, 2007).

5. Interacción de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática con los lípidos membranales

Siendo la ATPasa de H^+ una proteína transmembranal, desempeña su función cuando está inmersa en su ambiente lipídico nativo. No se conoce con exactitud cuál es éste, pero sí se sabe que glicerolípidos y esteroides afectan la actividad de la enzima (Gouaux y White, 2001).

Debido a que recientemente se ha descrito la presencia de la proteína en las balsas lipídicas, las cuales están enriquecidas en esfingolípidos, es posible que además los esfingolípidos también tengan un efecto en la actividad de la enzima (Bagnat *et al.*, 2001; Gaigg *et al.*, 2006). Así, la estructura de estos lípidos puede jugar un papel importante en la conformación de la enzima y por lo tanto en su regulación. Se han hecho varias pruebas para determinar los requerimientos lipídicos de la enzima (Coccuci y Marrè, 1984; Brauer y Tu, 1989), en algunas pruebas se ha realizado la supresión de lípidos selectivamente (Sandstrom y Cleland, 1989) modificando así su ambiente lipídico original, para ello primero se realiza la purificación de la enzima y después se reconstruye su ambiente membranal de manera selectiva con lípidos específicos para luego observar el efecto en la actividad (Brauer y Tu, 1989). Otra estrategia ha sido modificar el ambiente anfipático solubilizando a la enzima con varios detergentes y luego reconstituyéndola con lípidos u otros detergentes que restauren su actividad (Briskin y Poole, 1983; Briskin y Niesman-Reynolds, 1989). En la mayoría de los casos, se ha reportado que los fosfoglicerolípidos restauran parcialmente la actividad de la enzima.

Esta regulación por la presencia de los lípidos se ha explicado por dos mecanismos (Figura 5):

1. La composición de los lípidos membranales determina la fluidez de la membrana, lo que provoca un cambio en la conformación de la proteína y por lo tanto, altera su actividad.
2. Los lípidos anulares, que son los que se encuentran en contacto directo con la enzima, permiten una movilidad especial a la proteína afectando así la catálisis (Simmonds *et al.*, 1982).

En cuanto al mecanismo de la fluidez membranal, se ha observado que altas presiones provocan una disminución en la misma y estimulan la actividad de la ATPasa, sin embargo, el colesterol añadido también disminuye la fluidez pero en este caso lleva a una disminución de la actividad de la ATPasa (Yeagle, 1983).

Con estos resultados se propone que la fluidez membranal no es la que afecta a la enzima, sino que pueden ser las características estructurales de los lípidos membranales, lo cual se acerca más a la propuesta de los lípidos anulares.

La hipótesis de los lípidos anulares ha ofrecido una explicación más racional pero compleja de estudiar y de abordar experimentalmente. Se dice que los fosfoglicerolípidos se unen con mayor afinidad a la enzima en los “sitios anulares”, mientras que los esteroides lo hacen débilmente, cosa que no ocurre en los demás sitios de la membrana. Se ha propuesto que las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de los sitios anulares pueden reaccionar con los sitios “no anulares” sólo si son de la longitud adecuada (Gouaux, 2001).

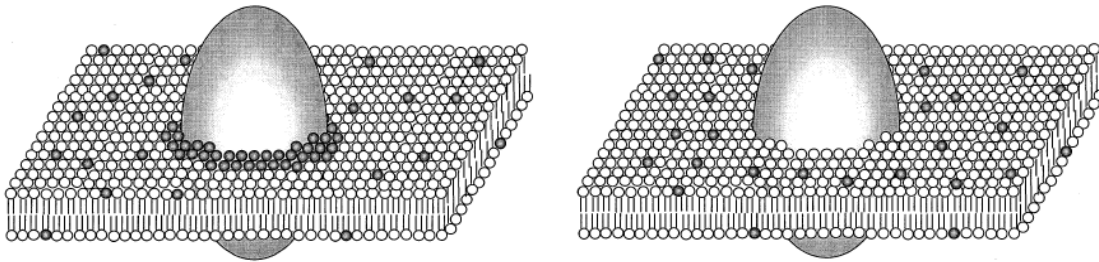


Figura 5. Representación esquemática de la teoría de los lípidos anulares (izquierda) y la composición de lípidos membranales (derecha). Los lípidos anulares se unen alrededor de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática. Ambos mecanismos se han establecido como teorías de la influencia de los lípidos en la actividad de la enzima. (Kasamo, 2003).

III. ANTECEDENTES

En el laboratorio se ha estudiado la influencia de los esfingolípidos en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de las plantas. Para ello, la enzima se ha estudiado en preparaciones membranales de plantas y plántulas de *A. thaliana* tanto del genotipo silvestre como de la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

En cuanto a la construcción genética de las diferentes líneas de *A. thaliana* sobre las que se realizan los ensayos, la línea *Atlcb2a-1* ha sido modificada genéticamente mediante la inserción de un transposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la enzima SPT, haciendo que la enzima sólo sea funcional formando el complejo LCB1/LCB2b y no el LCB1/LCB2a; esta enzima es la responsable de llevar a cabo la primera reacción de la biosíntesis de esfingolípidos complejos. La segunda mutante llamada *Atlcb2b hp/ Atlcb2a* tiene esa misma modificación en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la enzima SPT, pero además está diseñada para que bajo la exposición a un inductor, en este caso metoxifenoza, sea capaz de expresar un iRNA que promueve la destrucción del mRNA que codifica para la subunidad LCB2b, lo cual abate la síntesis de novo de la SPT y con ello se produce una disminución gradual de la biosíntesis de esfingolípidos complejos y por lo tanto, de su presencia en la membrana, logrando una disminución del 38% de bases de cadena larga totales a los siete días posteriores a la inducción (Dietrich *et al.*, 2008).

Esta disminución en la cantidad de esfingolípidos, redundando en un aumento de cerca del 100% en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en comparación con la actividad de las plantas control (González-Reyes, 2010). Adicionalmente, se ha encontrado que el aumento de actividad se puede explicar por un aumento en la V_{max} de la enzima de preparaciones membranales de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Resultados de experimentos preliminares de reconstitución de vesículas membranales con fracciones lipídicas enriquecidas en esfingolípidos y con glicosil ceramida llevaron a una reducción de la actividad de la enzima (González-Reyes, 2010). Todos estos resultados sugieren que los esfingolípidos juegan un papel muy importante en el nivel de actividad de la ATPasa de H^+ .

IV. HIPÓTESIS

El aumento de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática de la línea con menor cantidad de esfingolípidos está relacionado con la cantidad de enzima y/o con la presencia de glicerolípidos membranales endógenos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer si el aumento de la actividad de la enzima en las plántulas de la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* corresponde a un aumento en la cantidad de la proteína en la membrana y si los glicerolípidos remanentes en las fracciones enriquecidas en esfingolípidos pueden contribuir al aumento de la actividad de la enzima observado en la membrana reconstituida de la misma línea mutante.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar membranas microsomales de las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de plántulas expuestas o no a metoxifenoza.
2. Medir la actividad enzimática de la ATPasa de H⁺ en membrana plasmática.
3. Determinar la cantidad de ATPasa de H⁺ en membrana plasmática en las membranas obtenidas.
4. Determinar el efecto de los esfingolípidos y glicerofosfolípidos exógenos en la actividad de la ATPasa de H⁺ en las membranas obtenidas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

- Plántulas de 4 semanas de edad provenientes de semillas de *Arabidopsis thaliana* (*Col-0*) de las líneas: silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. Edgar B. Cahoon del Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E.U.

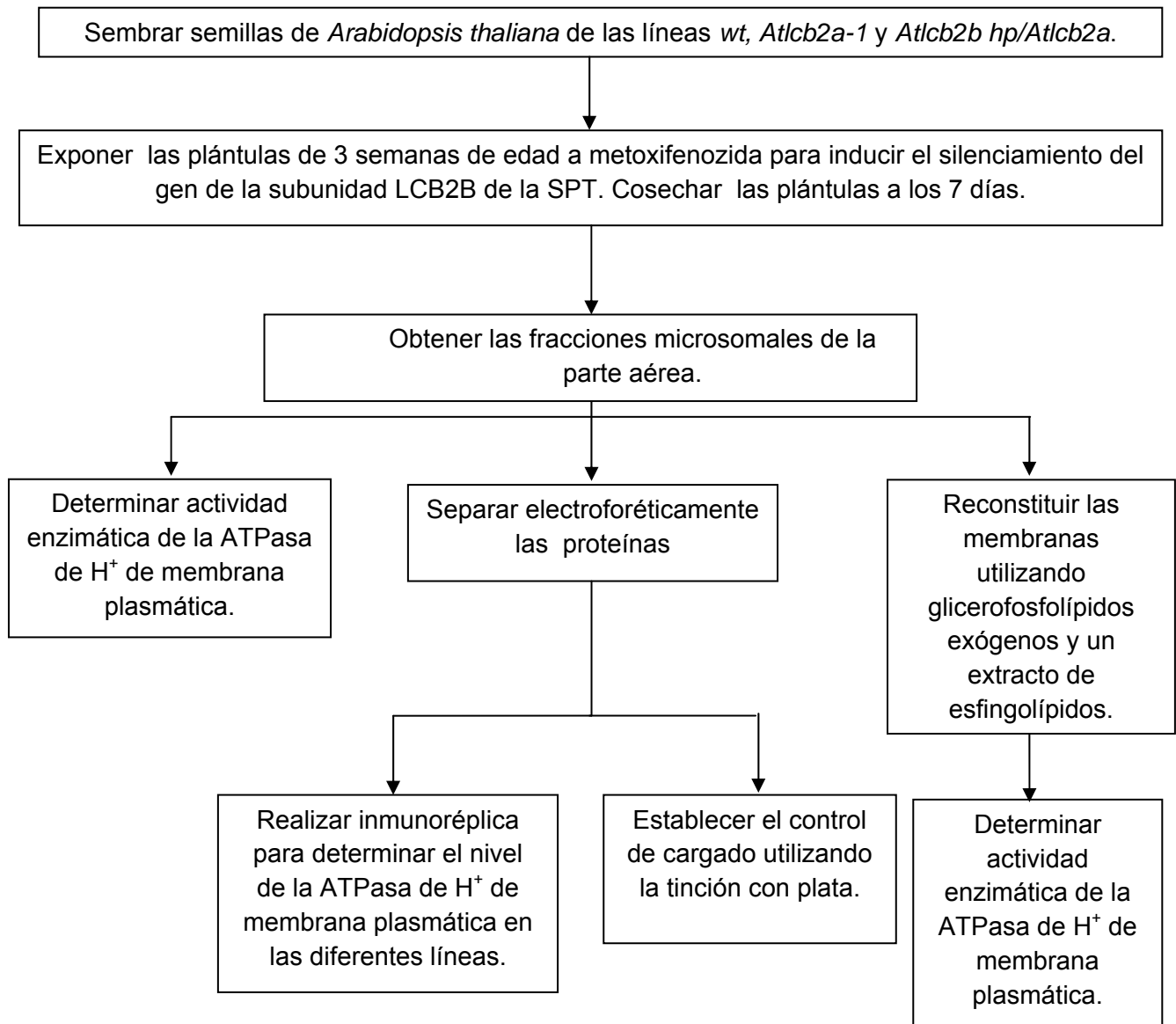


Figura 6. Diagrama del diseño experimental seguido en este trabajo. Los detalles de la metodología se describen en el texto.

Reactivos

- Anticuerpo anti-ATPasa de H⁺ de membrana plasmática (Agrisera AB, Suecia) 200 µg reconstituidos con 200 µL de H₂O estéril.
- Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a Fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology) 200µg/0.5ml.
- Insecticida Intrepid® (Metoxifenoza (N'-tert-butil-N'-(3,5-dimetilbenzoil)-3-metoxi-2-etilbenzohidracida) Dow Agro Science.

La descripción del contenido de las soluciones utilizadas en este trabajo se encuentran en el Apéndice.

A) Siembra de semillas y crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

1. En la campana de flujo laminar, colocar la cantidad necesaria de semillas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas: *wt*, *Atlcb2a-1* o *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL con 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20% (NaClO) y 1µL Tween 20 0.1%. Agitar vigorosamente durante 20 min en un agitador eléctrico.
2. Centrifugar durante 10 segundos y retirar el sobrenadante.
3. Colocar de nuevo 1 mL de solución de NaClO al 20% sin Tween 20 y agitar por 10 min. Centrifugar y retirar el sobrenadante.
4. Realizar 5 lavados consecutivos con 1 mL de agua destilada estéril con períodos de agitación de 30 segundos seguidos de un periodo de centrifugación de 10 segundos entre cada lavado.
5. Resuspender las semillas en agua destilada estéril y sembrar en cajas Petri de 8 cm de diámetro con medio Gamborg B-5 más agar (1%) y sacarosa (1%).
6. Sembrar las semillas colocándolas en una línea de aproximadamente 5.5 cm de largo en un extremo de una caja circular, si es que se van a crecer verticalmente, o bien esparcirlas en toda la superficie del agar si se van a crecer poniendo la caja en posición horizontal.

7. Las cajas sembradas se mantienen a 4° C por 48 h en oscuridad y posteriormente se transfieren a una cámara a 22°C con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad en posición vertical.

B) Silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) en las plántulas de *A. thaliana*. Inducción con metoxifenoza.

La línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* contiene una construcción con una horquilla de RNAi que se une al RNA codificante de la subunidad LCB2b, una de las subunidades de la SPT. La formación de este RNA de doble cadena es destruida por mecanismos celulares, abatiéndose los niveles del RNAm codificante de la subunidad LCB2b. Dicha horquilla sólo se puede generar tras una exposición al insecticida metoxifenoza. Además, ya que en esta línea el gen de la subunidad LCB2a tiene una mutación que evita su expresión de manera constitutiva, no hay síntesis nueva de proteínas LCB2a ni LCB2b para formar a la SPT, por lo que no se forma la cetoesfingina, que es la precursora inicial de los esfingolípidos complejos, originándose así una disminución en la síntesis de novo de éstos, junto con una caída gradual de los previamente sintetizados debido a su degradación natural. El procedimiento que se sigue es:

1. Tras tres semanas de crecimiento, en la campana de flujo laminar y con ayuda de un aspersor manual de vidrio esterilizable, se aplica la solución de metoxifenoza: agua a las plántulas a una dilución 1:5000 (v:v) elaborada a partir del insecticida Intrepid® y H₂O destilada estéril. Se aplican 6 aspersiones (un total de 0.5 mL) por cada caja Petri a una distancia de 5 cm.
2. Las cajas se cierran nuevamente, se sellan y se devuelven a las condiciones de crecimiento (22°C con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad) durante 7 días. Al cabo de este tiempo las plántulas muestran una clorosis generalizada de la parte verde que se coteja contra fotografías de tratamientos anteriores que sirven como referencia. Un resumen de las características genotípicas y los rasgos fenotípicos que se presentan en las diferentes líneas de *A. thaliana* tras la exposición al inductor se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Resumen de las características genotípicas, fenotípicas y de contenido de esfingolípidos que presentan las diferentes líneas de *A. thaliana*. El tratamiento de las plántulas se indica como: expuesta al inductor ([+Mtz]) y sin exposición al inductor ([-Mtz]).

Línea de <i>A. thaliana</i> (Col-0)	Características genotípicas	Tratamiento	Características fenotípicas en plántulas 7dpi	Contenido esfingoideo
Silvestre(<i>wt</i>)	Sin modificaciones en el genoma	± Mtz	Raíces y hojas normales	Contenido normal
<i>Atlcb2a-1</i>	Inserción de un transposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT	±Mtz	Raíces y hojas normales	Contenido normal
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	Tiene: a) La inserción del transposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT. b) Expresión inducible de un iRNA que silencia la subunidad LCB2b de la SPT	a) + Mtz b) - Mtz	a) Raíces y hojas normales b) Hojas cloróticas y disminución del número de pelos radiculares en la raíz.	a) Contenido normal b) Disminución del 36 % en el contenido total de bases de cadena larga

C) Cosecha de raíces y hojas de las plántulas

1. Tras el período de inducción se separan las raíces de la parte aérea de la plántula mediante un corte horizontal con ayuda de una espátula de punta plana y limpia.
2. Ya separadas ambas porciones, se retira el agar remanente con ayuda de unas pinzas y espátula limpias. Ninguno de los tejidos recolectados se enjuaga.
3. Los tejidos recolectados, inducidos y no inducidos, se pesan rápidamente habiéndose envasado en tubos Eppendorf individuales, los cuales han sido previamente pesados y rotulados con marcador indeleble. De cada tubo se registra su peso vacío y el que contiene el tejido.
4. Se congelan inmediatamente con N₂ líquido y se mantienen a -70°C para su uso posterior.
5. Por diferencia de pesos se obtiene la cantidad de tejido recolectado en gramos.

D) Obtención de las fracciones microsomales.

1. Preparar la cantidad suficiente de buffer de homogenización (aproximadamente 5 mL para 0.84 g de tejido) y mantenerlo en un matraz sumergido en hielo durante todo el proceso.
2. El tejido congelado de raíz u hoja (alrededor de 0.84 g) se muele en mortero hasta conseguir un polvo fino agregando N₂ periódicamente para evitar que se descongele. Con este peso húmedo de tejido se obtiene aproximadamente una preparación de microsomas en una cantidad de proteína total de entre 0.3 a 0.7 mg de proteína/g peso húmedo para el caso de las raíces y de entre 0.6 a 0.9 mg de proteína /g peso húmedo para tallos y hojas.
3. El tejido pulverizado se pasa a un vaso de precipitado frío y pequeño (aprox. 10 mL).
4. Se enjuaga el mortero en donde se pulverizó el tejido usando aproximadamente 4 mL de buffer de homogenización por cada 0.84 g de muestra.
5. Ya con todo el volumen en el vaso de precipitado, se homogeniza en dos periodos de 10 segundos con un intermedio de 20 segundos utilizando un homogenizador eléctrico a una velocidad de 3.0, manteniendo el vaso sumergido en baño de hielo.
6. Se filtra el homogenado a través de 3 capas de gasa previamente humedecida con agua desionizada, recibiendo el filtrado en un segundo vaso de precipitado frío, se exprime la gasa presionando ligeramente para recuperar el líquido.
7. Se lava el residuo de la gasa con 1 mL más de buffer de homogenización por cada 0.84 g de tejido y se exprime nuevamente para recuperar lo que quede de muestra.
8. El filtrado final se coloca en tubos de centrifuga de policarbonato pequeños sin tapa. Se centrifuga a 15,000 rpm (10,000 x g) a 4°C por 15 min en una microfuga refrigerada TL-100 (Beckman) usando el rotor TLA 100.4.
9. Se descarta el sedimento (fracción nuclear) y se recupera el sobrenadante por decantación. El sobrenadante se coloca en un nuevo tubo limpio de policarbonato y se centrifuga ahora a 43,000 rpm (100,000 x g) a 4°C por 120 min. Finalizada esta segunda centrifugación, se decanta el sobrenadante y se descarta.
10. El botón obtenido que es la fracción microsomal, se resuspende en 50 µL de amortiguador de ajuste de peso con ayuda de un pincel fino y limpio. Una vez

disuelto el botón, se lava el pincel con 50 μL más de amortiguador de ajuste de peso añadiéndolo también al volumen de la muestra.

11. Alicuotar el volumen total en tubos Eppendorf etiquetados. Si se obtiene más de un botón, estos se resuspenden, se mezclan y de este pool general se distribuye a los tubos Eppendorf.
12. Por último se determina la cantidad de proteína por el método de Lowry, tomando 2 μL de muestra y 2 μL de amortiguador de ajuste de peso como blanco, cada uno por triplicado. La concentración obtenida se agrega a la etiqueta.

E) Determinación de proteína por el método de Lowry sin precipitación con TCA. Por el método de *Peterson, 1977* modificado.

Se destinan 6 ó más tubos de ensayo para la elaboración de la curva estándar, 3 tubos para el amortiguador de ajuste de peso utilizado en la obtención de las muestras y 3 tubos para cada muestra a analizar.

1. Los tubos de la curva estándar se tratan añadiendo agua y cantidades crecientes de BSA 1 mg/mL; a los demás tubos se les agregan las cantidades de muestra o amortiguador según corresponda y a todos los tubos del ensayo se les agregan: 100 μL de desoxicolato de sodio 0.15% (m/v), 1 mL de reactivo A el cual contiene a partes iguales: CTC (carbonato de sodio 10% (m/v), tartrato sodio-potasio 0.2% (m/v) y sulfato de cobre 0.1% (m/v)), NaOH 0.8 N, SDS 10 % (m/v), y H_2O .
2. Agregar 500 μL de reactivo B (reactivo de Follin-Ciocalteu, diluido 1:5 (v:v) con agua desionizada). Los tubos se dejan reposar 30 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 750 nm.

F) Determinación de fosfato inorgánico (Pi) por el método de Chifflet modificado. Curva estándar (González-Romo *et al.*, 1992).

Con este ensayo colorimétrico se determina la cantidad de fosfato inorgánico que proviene de la hidrólisis de ATP y que está presente en el medio.

1. Construir la curva estándar a partir de un stock de K_2HPO_4 1 mM utilizando tubos previamente tratados con H_2SO_4 . Se colocan cantidades crecientes de K_2HPO_4 y el volumen necesario de agua para tener un volumen final de 150 μL .

2. Adicionar 150 μL de SDS 24%, 300 μL de solución B/C y después de 3 a 7 min, añadir 450 μL de reactivo E.
3. Dejar reposar los tubos durante 20 min para el desarrollo y estabilización del color.
4. Medir la absorbancia a 850 nm.

G) Ensayo de hidrólisis de ATP

El ensayo y la preparación del medio se realizan en tubos tratados con H_2SO_4 . Los tubos, los reactivos ya descongelados y el medio de hidrólisis preparado se mantienen en baño con hielo durante el procedimiento.

1. Preparar el medio de hidrólisis necesario para el ensayo calculando 150 μL de medio por tubo y tomando en cuenta un exceso. El medio consta de los siguientes componentes en las concentraciones finales indicadas: 250 mM de sacarosa ajustada con 20 mM de PIPES a pH 6.5, 7 μM CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona), 0.015% Brij 58 (v/v), 10 mM ATP* y 10 mM MgCl_2 .

*El ATP se descongela en hielo y se agrega al último para prevenir su hidrólisis antes del ensayo.

2. Descongelar la muestra membranal en hielo y preparar una dilución 1:10 v:v en una solución de 20 mM Sacarosa/20 mM PIPES, pH 6.5
3. Cada condición se realiza por triplicado. Para iniciar el ensayo, los tubos se encuentran en baño de hielo y contienen:

Tubos para Hidrólisis Química (To): 150 μL de SDS 24% (m/v)

Tubos para Hidrólisis Total: 150 μL de medio de hidrólisis.

Tubos para Hidrólisis con VO_4^{3-} : el Na_3VO_4 a una concentración final de 200 μM y medio de hidrólisis para un volumen final de 150 μL

Tubos para Hidrólisis con N_3^- , NO_3^- , MoO_4^{2-} : la mezcla de NaN_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y KNO_3 a las concentraciones finales de 2 mM, 2 mM y 50 mM respectivamente.

Medio de hidrólisis para un volumen final de 150 μL .

Inicio de la hidrólisis

4. Añadir el volumen de muestra correspondiente a 5 μg de proteína al primer tubo, agitar brevemente y colocarlo en baño de agua a 29 $^\circ\text{C}$ por 20 min cronometrados.

Se continúa con este procedimiento con los tubos restantes excepto con los que corresponden al T_0 , a los cuales se les añaden 150 μL de SDS 24% antes de incubarlos.

5. Detener la reacción con 150 μL de SDS 24% una vez que hayan transcurrido los 20 min de reacción para cada tubo, agitar brevemente y regresar al baño de hielo; los tubos T_0 sólo se sacan del baño de agua, se agitan y se pasan al hielo.
6. Continuar el ensayo con la determinación de Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP según el método de Glez. Romo *et al*, 1992.

Determinación de Pi (Glez. Romo *et al.*, 1992):

- a) Añadir 300 μL de solución B/C (Apéndice) y pasados de 3 a 7 min, añadir 450 μL de reactivo E.
- b) Dejar reposar 20 min y medir la absorbancia a 850nm.

A la par del ensayo de hidrólisis de ATP se realiza una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico (Pi). Tanto los tubos del ensayo como la curva estándar se realizan con los mismos reactivos de determinación de Pi y se leen al mismo tiempo.

H) Separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE). Electroforesis.

Los geles de SDS utilizados para la separación de proteínas son del tipo descrito por Shagger y Von Jagow (1987).

Los geles preparados son de 1.0 mm de grosor. Todo el procedimiento se realiza con guantes.

1. Limpiar las placas de vidrio con un poco de SDS 10% o con una solución de metanol:cloroformo (v:v).
2. Montar las placas en el soporte con los cojines y colocar un poco de agua destilada dentro de los vidrios para comprobar la ausencia de fugas. Se puede colocar un poco de vaselina en las orillas para mejorar el sellado.
3. Mezclar en un vaso de precipitados los reactivos necesarios para el gel separador en el orden indicado en la Tabla II.

4. Retirar el agua de los vidrios y colocar la mezcla entre los vidrios con la ayuda de una pipeta Pasteur.
5. Una vez llenos los vidrios, colocar un poco de SDS 0.3% sobre el gel para lograr un borde parejo y dejar polimerizar aproximadamente 30 min.

Tabla II. Cantidades utilizadas para preparar un gel de 1.00 mm de grosor.

Reactivos	Gel separador (μL)	Gel concentrador (μL)
Acrilamida-Bis Acrilamida (10-0.3 %)	1631.9	264.25
Amortiguador del gel (pH 8.9)	1631.9	495.5
Glicerol	660.16	---
Agua	990.98	1221.15
Persulfato de amonio 10 %	16.5	16.5
TEMED	1.65	1.65
Vol. final	4933.09	1999.05

6. Una vez polimerizado, desechar el SDS, enjuagar con un poco de agua destilada y secar el exceso.
7. Mezclar en un segundo vaso de precipitados los componentes del gel concentrador en el orden que aparecen en la Tabla II.
8. Vaciar la mezcla entre los vidrios sobre el gel separador y colocar un peine de teflón (10 ó 15 pozos) cuidando que no se formen burbujas.
9. Dejar polimerizar aproximadamente durante 1 h.
10. Una vez polimerizado, retirar el peine y enjuagar con un poco de agua destilada.
11. Secar el exceso de agua entre los pozos.
12. Retirar los vidrios de los cojines y colocarlos en el soporte para electroforesis. También se puede colocar un poco de vaselina en las orillas de este soporte para evitar las fugas.
13. Armar la cámara de electroforesis y colocar el buffer del cátodo en el interior de los soportes.
14. Cargar las muestras en los carriles del gel y añadir el buffer del ánodo dentro de la cámara.

15. Colocar la tapa de la cámara haciendo coincidir los extremos del ánodo y el cátodo.
16. Conectar a la fuente de poder e iniciar la corrida. (60 volts-30 min y después 100 volts hasta la salida del frente de corrida o 20 volts durante toda la noche, aprox 15 h).
17. Finalizada la corrida, apagar la fuente de poder y retirar la tapa. Sacar los vidrios y retirarlos del soporte.
18. Con ayuda de una espátula, separar los vidrios para poder extraer el gel y colocarlo en el recipiente donde se va a realizar la tinción.

Preparación de las muestras:

1. Realizar los cálculos necesarios para obtener los μg de proteína deseados. (para una tinción con plata se cargan 5 μg aprox. por carril y para una tinción con Coomassie o para una transferencia a PVDF, 10-20 μg).
2. Agregar a los tubos Eppendorf fríos la cantidad de muestra correspondiente, más el doble de buffer de carga.
3. Ajustar todas las muestras aproximadamente al mismo volumen utilizando buffer de ajuste de peso. El estándar se coloca directo, no es necesario adicionar ningún otro buffer.
4. Utilizando las puntas largas, tomar cada muestra y colocarla en el pozo correspondiente con cuidado de no introducir burbujas.

I) Tinción con Plata. Método de Vorum (Mortz *et al.*, 2001).

Gracias a su sensibilidad, esta técnica es de utilidad cuando se desean detectar cantidades pequeñas de proteína. Es importante señalar que todos los pasos deben realizarse en los tiempos indicados utilizando cronómetro.

Las cantidades finales de las soluciones que se agregan al gel dependen del tamaño del gel y del recipiente. Se utiliza un solo recipiente de vidrio limpio y seco por cada gel que se procesa. Ya que la plata es tóxica, durante todo el proceso se deben usar guantes, evitando tocar el gel para impedir la aparición de manchas.

1. Fijación: Apenas terminada la electroforesis, dejar el gel en la solución de fijación durante 2 h con agitación suave y constante a temperatura ambiente.

2. Lavado: Remover la solución fijadora y lavar 3 veces en períodos de 20 min cada uno con la solución de etanol 35% con agitación suave y constante a temperatura ambiente. Entre cada lavado se decanta la solución sin tocar el gel.
3. Sensibilización: Remover la solución de lavado y agregar la solución de sensibilización. Mantener el gel durante 5 min en esta solución con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
4. Lavado: Enjuagar el gel con agua destilada 3 veces durante 5 min cada vez con agitación suave y constante a temperatura ambiente. Este lavado es crítico, pues de excederse el tiempo, el gel no se tiñe y se debe iniciar de nuevo el proceso.
5. Decantar el agua del último lavado y adicionar la solución de AgNO_3 0.2% con formaldehído 0.076% durante 20 min con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
6. Lavado: Enjuagar 2 veces con agua destilada durante 1 min cada vez con agitación suave y constante a temperatura ambiente. (Este paso puede omitirse y pasar al revelado directamente; en ese caso, las bandas aparecen muy rápido y hay que detener la reacción pronto. Esta variación es adecuada cuando hay muy baja cantidad de proteína en el gel).
7. Revelado: Decantar el agua del último lavado y adicionar la solución de revelado con agitación suave y constante a temperatura ambiente hasta que aparezcan las bandas.
8. Decantar la solución reveladora una vez que se obtiene la tinción deseada. En caso de que no aparezcan las bandas este paso puede alargarse varias horas.
9. Terminado el revelado, añadir la solución Stop y mantener durante 5 min con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
10. Almacenar el gel en una solución de ácido acético 1% a 4°C protegido de la luz.

J) Tinción con Azul de Coomasie

1. Colocar el gel recién sacado de la cámara de electroforesis en una solución de Azul Brillante de Coomassie y ácido acético durante 2 h o durante toda la noche si la cantidad de proteína es muy baja.

2. Decantar la solución teñidora y añadir una solución de isopropanol y ácido acético. Mantener en agitación rotatoria constante hasta que aparezcan las bandas.
3. Revisar periódicamente el proceso de desteñido. Almacenar en una solución de glicerol 5%.

K) Inmunoréplica.

Procedimiento de electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDF.

La manipulación del gel y de la membrana de PVDF durante todo el procedimiento es con guantes.

1. Terminada la electroforesis, remover el gel de las placas de vidrio, cortar una esquina como referencia y colocarlo en un recipiente con disolución amortiguadora de transferencia de 15 a 30 min a temperatura ambiente.
2. Ensamblaje del cassette:
 - a) Sobre las rejillas del cassette abiertas colocar una capa de esponja y un cuadro de papel filtro del tamaño del gel para transferir, ambos empapados con solución amortiguadora de transferencia.
 - b) Sobre el papel filtro, colocar el gel o los carriles del gel para transferir.
 - c) Encima del gel colocar una hoja de PVDF del mismo tamaño del gel y con el corte en la esquina, el mismo que el del gel como marca de referencia, previamente humedecida con metanol y disolución amortiguadora de transferencia.
 - d) Sobre la membrana colocar un segundo papel filtro también humedecido con solución amortiguadora de transferencia.
 - e) Rodar un tubo de ensayo limpio sobre la superficie del papel para suprimir las burbujas de aire que quedan atrapadas entre las diferentes capas de gel, membrana y papel
 - f) Añadir la segunda esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia y cerrar las rejillas del cassette.
3. Colocar el cassette en la cámara de electrotransferencia orientándolo de manera que el gel quede de cara al cátodo y la membrana de PVDF de cara al ánodo. La

cámara debe tener suficiente solución amortiguadora de transferencia y un agitador magnético en el fondo.

4. Encender la fuente de poder a 25 volts durante 2 h 15 min. Estas condiciones son para transferir un gel de 1.00 mm de grosor.
5. Al término de la transferencia remover el cassette y separar la membrana de PVDF (la membrana se puede almacenar en TBS hasta por 2 días a 4°C).

Procedimiento de Western

1. Cuidando que la cara que estuvo en contacto con el gel quede hacia arriba, colocar la membrana en un recipiente y realizar dos lavados con solución de TTBS y uno con solución TBS de 5 min cada uno cambiando la solución cada vez y agitando en forma rotatoria a temperatura ambiente.
2. Remover la solución de TBS y colocar la solución bloqueadora. Mantener en agitación rotatoria a temperatura ambiente durante 1 h.
3. Remover la solución bloqueadora y realizar nuevamente dos lavados con solución de TTBS y uno con solución TBS de 5 min agitando en forma rotatoria a temperatura ambiente.
4. Remover la solución de TBS y añadir la disolución con el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante toda la noche.
5. Remover la solución del anticuerpo primario y realizar dos lavados con solución de TTBS y uno con solución TBS de 5 min agitando en forma rotatoria a temperatura ambiente.
6. Remover la solución de TBS y colocar la solución con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 2 h.
7. Remover la solución del anticuerpo secundario y realizar dos lavados con solución de TTBS y uno con solución TBS de 5 min agitando en forma rotatoria a temperatura ambiente.
8. Remover la solución de TBS, añadir la solución para desarrollar color y mantener en agitación suave.
9. Una vez que las bandas tienen la intensidad deseada, detener la reacción con agua desionizada. Almacenar la membrana revelada a 4 °C protegida de la luz.

L) Reconstitución de vesículas de membrana plasmática con lípidos exógenos.Preparación de los lípidos reconstituyentes

1. El ensayo se realiza en tubos tratados con H_2SO_4 , los cuales se mantienen en hielo durante su preparación para evitar la evaporación del disolvente. Si es posible, realizar la dosificación de los lípidos en el cuarto frío.
2. Por cada lípido a ensayar, se preparan 3 tubos correspondientes a la actividad total en presencia de lípidos y 3 para la actividad con la mezcla de inhibidores (NO_3^- , N_3^- , MoO_4^{2-}) en presencia de lípido.
3. A partir de la concentración del stock de cada lípido, realizar el cálculo de la cantidad total necesaria para todos los tubos si se busca que cada uno tenga una cantidad de 48 μg de lípido (tomando en cuenta un pequeño exceso).
4. Colocar los μL equivalentes a la cantidad de μg calculada en un tubo de ensayo etiquetado. Por cada reconstitución con un lípido se prepara un tubo distinto.
5. Llevar a sequedad cada tubo preparado con el total de lípido, evaporando con N_2 gaseoso.
6. Agregar a cada tubo ya seco la cantidad del disolvente correspondiente para llevar cada lípido a una concentración de 0.5 $\mu g/\mu L$. Para los ensayos realizados el solvente utilizado fue una mezcla de CH_3Cl : metanol (4:1 (v:v)).
7. Agregar a cada tubo la cantidad necesaria de BHT 1% para tener una concentración final de 0.002%.
8. Alicuotar 96 μL (equivalentes a 48 μg de lípido) a cada tubo para medir actividad.
9. Llevar cada tubo a sequedad evaporando con N_2 gaseoso. Sellar cada tubo seco con cinta de teflón tratando de dejar una atmósfera de N_2 dentro del tubo. Estos tubos están listos para que se les agregue la proteína para el ensayo de hidrólisis.

Procedimiento de reconstitución de membranas con lípidos exógenos simultáneo al ensayo de hidrólisis de ATP.

1. Colocar los μg necesarios de cada muestra de proteína (alrededor de 10 μg) a cada tubo que contenía 48 μg de lípido e inmediatamente introducirlos en baño de agua a 29 °C. Pre-incubar durante 40 min.

2. Colocar a pre-incubar también junto con la cantidad correspondiente de proteína, los tubos correspondientes a la actividad total y con inhibidores sin lípidos, así como los tiempos cero.
3. Transcurridos los 40 min para cada tubo, agregar 150 μ L del medio de reacción con o sin inhibidores según corresponda. Mantener los tubos en baño de agua durante 20 min más.
4. Transcurridos los 20 min para cada tubo, detener la reacción con 150 μ L de SDS al 24%. Retirar del baño de agua y colocar los tubos en hielo.
5. Continuar el ensayo con la determinación de Pi por el método de González-Romo et al. (1992).

M) Extracción de esfingolípidos de membranas de *A. thaliana*. Método modificado de Markham et al., 2006

Con este procedimiento se extrae una fracción enriquecida en esfingolípidos a partir de una fracción membranal de hojas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la línea silvestre.

Se parte del tejido aéreo obtenido de 4 cajas Petri con plántulas de 4 semanas de crecimiento. Se obtuvo la fracción microsomal de este tejido y se determinó la concentración de proteína. El procedimiento continúa en tubos de ensayo de vidrio previamente tratados con H_2SO_4 y con tapón de rosca con cubierta interna de teflón.

1. Agregar a un tubo el volumen de muestra membranal equivalente a 2 mg de proteína y un volumen de Fase E (Apéndice) en una proporción 1:3 (v/v).
2. Tapar el tubo y agitar en vórtex vigorosamente durante 1 min a temperatura ambiente.
3. Incubar el tubo con la muestra a 60°C durante 15 min con agitación ocasional (de 3 a 4 veces en total).
4. Centrifugar utilizando el rotor de columpio con camisas para los tubos durante 20 min a 8°C a 3000 rpm (antes de introducir los tubos a la centrifuga dejar que se atemperen durante un par de minutos para evitar que el vidrio se rompa).
5. Recolectar el sobrenadante en un nuevo tubo frío y previamente pesado con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, de preferencia nueva.

6. Resuspender nuevamente el botón en Fase E, repetir la agitación en vórtex durante 1 min, la centrifugación y coleccionar el sobrenadante en el mismo tubo dos veces más para realizar un total de 3 extracciones de la fracción membranal.
7. Evaporar todo el sobrenadante recolectado con N₂ gaseoso colocando el tubo a 40°C máximo para acelerar la evaporación.
8. Pesar el tubo con el residuo seco y por diferencia de pesos determinar la cantidad de residuo obtenido. Este residuo seco puede ser almacenado a -70°C para su limpieza posterior.

Limpieza del extracto

1. Resuspender el residuo en un volumen conocido de Fase E y hacerlo pasar por un filtro de Nylon de 0.45 µm cargando en una jeringa de vidrio limpia y recibir el filtrado en un tubo de vidrio pre-pesado. El volumen de Fase E usado para resuspender se diluye para que la concentración de residuo permita el paso por el filtro sin que este se tape.
2. Evaporar el filtrado completo utilizando N₂ gaseoso.
3. Pesar el tubo con el residuo seco y por diferencia de pesos determinar la cantidad de residuo obtenido.
4. Este residuo seco es el extracto de esfingolípidos que se usará para la reconstitución membranal. Puede ser almacenado a -70 °C para su uso posterior.

VI. RESULTADOS

1. Contenido membranal total de raíces en cada línea de *A. thaliana*. Rendimiento de proteína membranal.

En este trabajo se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (*Col-0*) de las líneas silvestre (*wt*) y de las líneas mutantes *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, las cuales crecieron durante 4 semanas y fueron tratadas [+Mtz] o no [-Mtz] con metoxifenoza durante 7 días. Estas condiciones de crecimiento se establecieron en el trabajo de Mejía-Hernández (2010) y mostraron ser adecuadas para obtener la disminución de esfingolípidos endógenos que se manifiesta fenotípicamente en las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] como clorosis de las hojas y disminución de pelos radiculares.

En la Figura 7 se muestran los rendimientos promedio de las fracciones microsomales obtenidas de las raíces de las plántulas de las diferentes líneas y como se observa, los rendimientos promedio para las líneas *wt* [-Mtz] y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [-Mtz] tienen valores similares que están alrededor de 0.3 mg de proteína/g de tejido fresco, mientras que para la línea *Atlcb2a-1* [+Mtz] aumenta ligeramente a 0.4 mg de proteína/g de tejido fresco. Sin embargo, al tomar en cuenta las desviaciones estándar de estas tres líneas, no hay una diferencia significativa entre sus rendimientos.

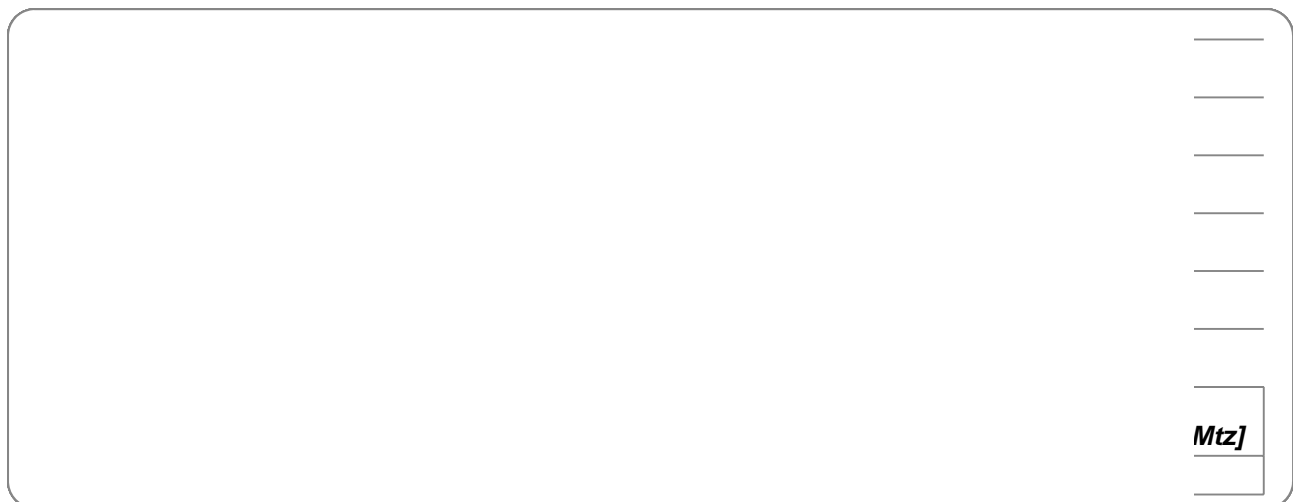


Figura 7. Rendimientos del contenido de proteína total de las fracciones microsomales de las raíces de *A. thaliana* de las líneas silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp /Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza. Después de 3 semanas de crecimiento, las plántulas fueron expuestas o no al

inductor metoxifenoza a una dilución 1:5000 (v:v) por 7 días. Después de cosechar las raíces, se obtuvieron las fracciones microsomales a las cuales, se les determinó la concentración de proteína total. Los rendimientos se muestran en términos de mg de proteína por g de tejido obtenido. Se muestran los promedios \pm DE de las diferentes líneas de estudio indicando si fueron expuestas [+Mtz] o no [-Mtz] al inductor. Los promedios fueron obtenidos de 2 preparaciones independientes con 3 determinaciones de proteína para cada preparación.

En contraste, el rendimiento de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que fue expuesta al inductor tiene un valor promedio de 0.1 mg de proteína por g de tejido fresco. Esta diferencia indica que las raíces de las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que tiene silenciado en gen de la subunidad LCB2b de la SPT presentan un menor contenido de proteína total que la misma línea no expuesta al inductor y que las demás líneas inducidas o no.

2. Contenido membranal total de las hojas en cada línea de *A. thaliana*. Rendimiento de proteína membranal.

De la misma manera que con el rendimiento de las fracciones microsomales de las raíces, en la Figura 8 se muestran los rendimientos promedio para las fracciones microsomales obtenidas de la parte aérea de las plántulas de las diferentes líneas. En primer lugar se observa que el rendimiento obtenido para este tejido es mayor que el que se obtuvo para la raíz. Las líneas *wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que no fueron expuestas al inductor y la línea *Atlcb2a-1* que fue expuesta al inductor presentan rendimientos muy similares entre sí con valores entre 3.4 y 4.6 mg de proteína por g de tejido fresco. Y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que fue expuesta al inductor tuvo un rendimiento menor con un valor de 0.96 mg de proteína por g de tejido fresco. La diferencia encontrada entre el rendimiento de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor y las demás líneas inducidas o no es mayor que los rendimientos obtenidos en las raíces, haciendo más claro en el caso de la parte aérea, el silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la SPT se refleja en un menor contenido de proteína total.

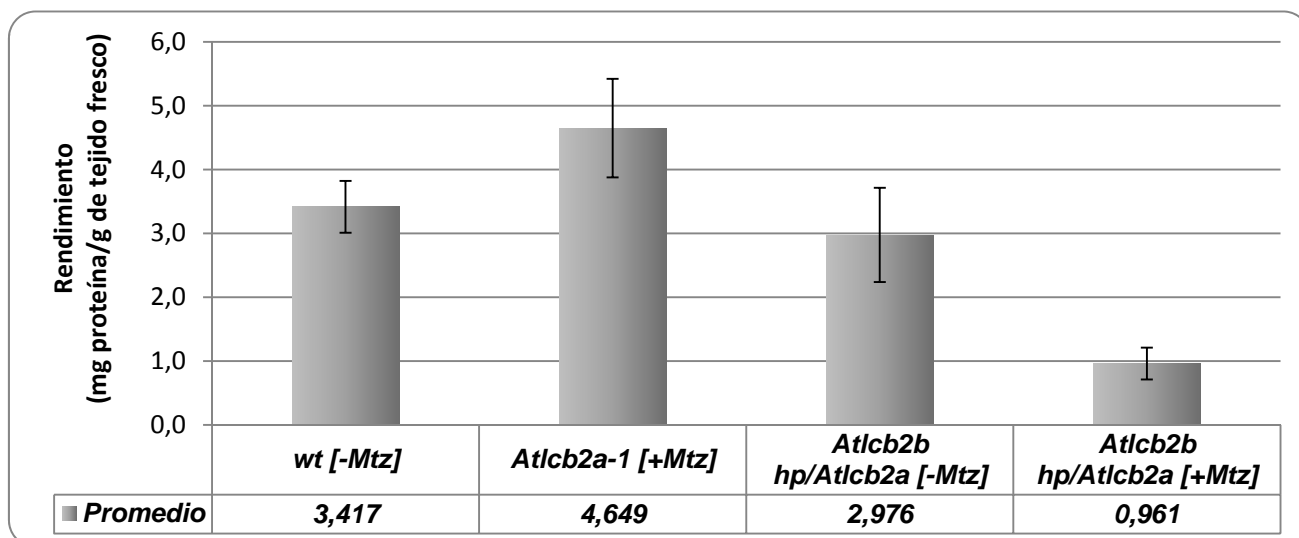
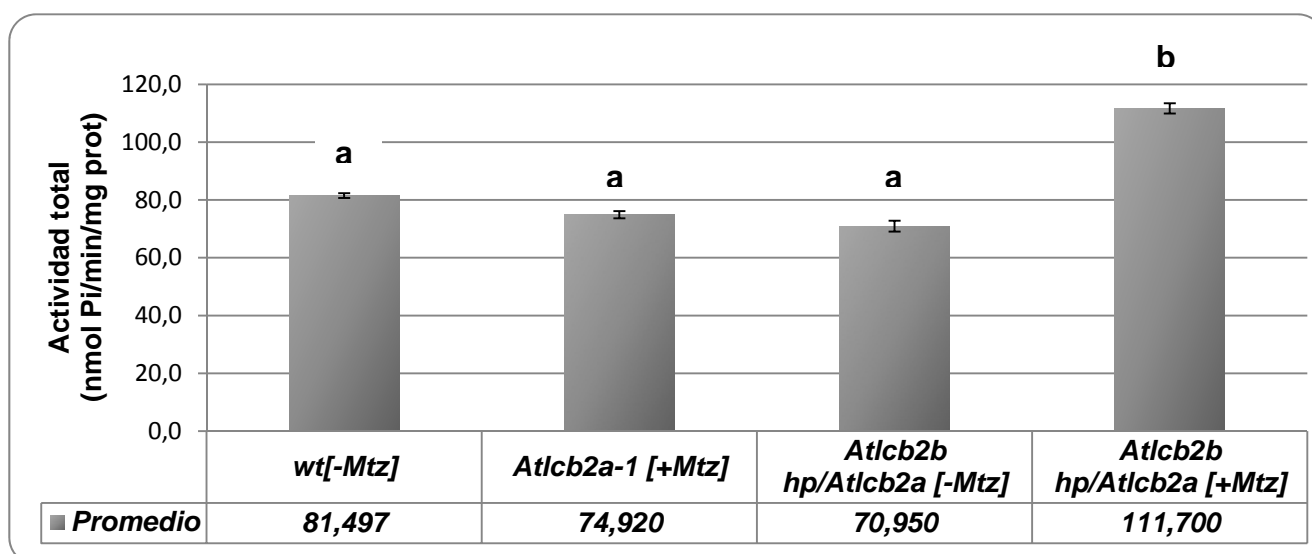


Figura 8. Rendimientos de las fracciones microsomales de las hojas de las líneas silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp /Atlcb2a* de *A. thaliana* tratadas con o sin metoxifenozida. Después de 3 semanas de crecimiento, las plántulas fueron expuestas o no al silenciamiento con el inductor a una dilución 1:5000 (v/v) por 7 días para después cosechar la parte aérea y obtener las fracciones microsomales, a las cuales se les determinó la concentración de proteína total. Los rendimientos se muestran en términos de mg de proteína por g de tejido obtenido. Se muestran las diferentes líneas de estudio indicando si fueron expuestas [+Mtz] o no [-Mtz] al inductor. Se muestran los promedios \pm DE obtenidos de 3 preparaciones independientes para la línea silvestre (*wt*) y 2 para las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp /Atlcb2a* con 3 determinaciones de proteína para cada preparación.

Todos los rendimientos reportados tanto para raíz como para hoja muestran el promedio de fracciones microsomales obtenidas de dos lotes diferentes de plántulas cosechadas en diferentes tiempos. En el Apéndice (Tabla V) se muestran los datos individuales de las fracciones microsomales obtenidas de la parte aérea de las plántulas de las diferentes líneas de *A. thaliana*

3. Determinación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plásmática en las fracciones microsomales de las hojas en cada línea de *A. thaliana*. Determinación de la hidrólisis total de ATP.

Además de las condiciones de crecimiento de las plántulas, en el trabajo de Mejía-Hernández (2010) también se encontró que como resultado de la disminución de esfingolípidos endógenos, la actividad específica de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática aumentó en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] alrededor de un 100% en comparación de las demás líneas. Para comprobar si este mismo aumento de actividad se encontraba en las fracciones microsomales obtenidas para este trabajo, primero se determinó la actividad de hidrólisis de ATP total en cada muestra. Los resultados promedio se muestran en la Figura 9 en términos de nmol Pi/min/mg de proteína para cada una de las líneas expuestas o no al inductor. Como se observa, la actividad promedio obtenida en las líneas *wt* y *Atlcb2a-1* con y sin inducción y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducción son muy similares, con valores alrededor de 75 y 80 nmol Pi/min/mg de proteína. En contraste, la hidrólisis de ATP total obtenida en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor es mayor con valores promedio de 110 nmol Pi/min/mg de proteína. Al realizar el análisis estadístico se corrobora la diferencia significativa entre la actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor y las demás líneas con y sin tratamiento.



Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Wt[-Mtz] vs At1cb2a-1[+Mtz]	5.59	2.30	No	ns	-0.935 to 12.1
Wt[-Mtz] vs At1cb2b hp/At1cb2a[-Mtz]	7.97	2.24	No	ns	-1.61 to 17.6
Wt[-Mtz] vs At1cb2b hp/At1cb2a[+Mtz]	-34.6	15.6	Yes	****	-40.6 to -28.7
At1cb2a-1[+Mtz] vs At1cb2b hp/At1cb2a[-Mtz]	2.38	0.645	No	ns	-7.54 to 12.3
At1cb2a-1[+Mtz] vs At1cb2b hp/At1cb2a[+Mtz]	-40.2	16.7	Yes	****	-46.7 to -33.7
At1cb2b hp/At1cb2a[-Mtz] vs At1cb2b hp/At1cb2a[+Mtz]	-42.6	12.0	Yes	****	-52.1 to -33.0

Figura 9. Determinación de la hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de hojas de las líneas silvestre (wt), *At1cb2a-1* y *At1cb2b hp /At1cb2a* de *A. thaliana* tratadas con o sin metoxifenoza y análisis estadístico. Después de obtener las fracciones microsomales de las diferentes líneas, se determinó la actividad total de hidrólisis de ATP. La gráfica muestra los valores promedio obtenidos para cada línea con [+Mtz] o sin [-Mtz] exposición al inductor expresados como nmol Pi/min/mg proteína ± EE. Se realizaron como mínimo 20 repeticiones de las determinaciones para cada línea usando de 2 a 3 preparaciones independientes. Los datos de actividad total de hidrólisis de ATP fueron procesados en el programa estadístico GraphPad Prism 5 aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni. Las letras sobre las barras son iguales si no existe diferencia entre ellas y cambia cuando la barra es significativamente diferente a las demás. Se utilizó un valor de P<0.05

Esto indica un aumento entre el 40% y 50% en la actividad total de hidrólisis de ATP por las enzimas capaces de hidrolizar ATP presentes en las fracciones microsomales obtenidas después del silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la SPT en la línea *At1cb2b hp /At1cb2a* [+Mtz].

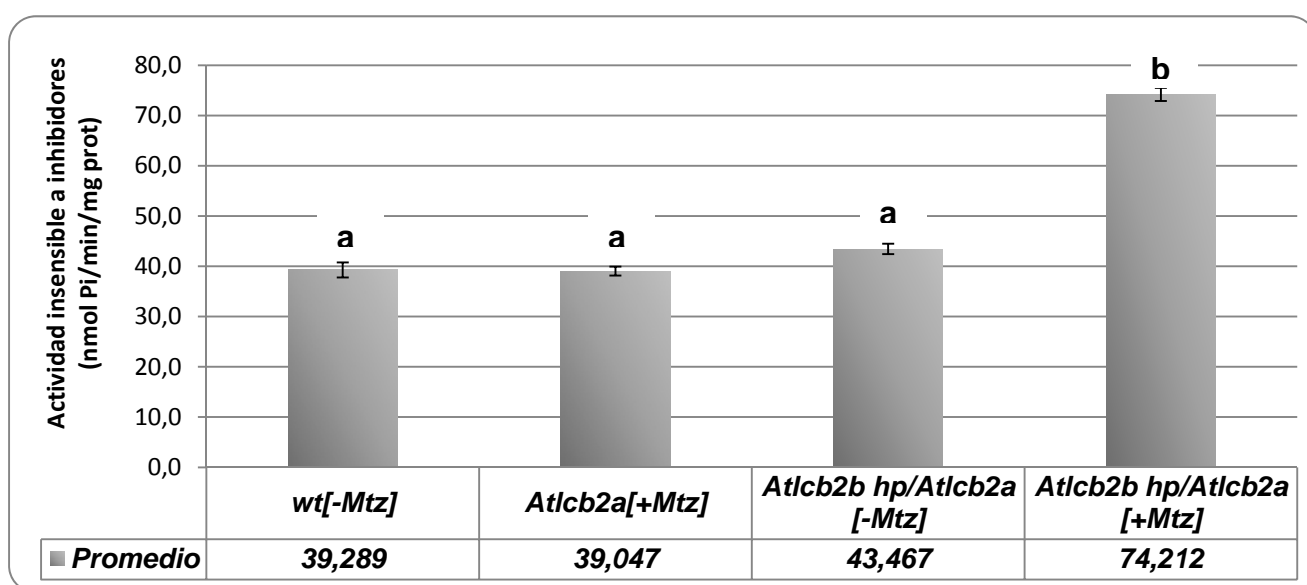
4. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-}

Ahora, con el objeto de determinar la contribución de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en la actividad total de hidrólisis de ATP, se determinó la actividad insensible a los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} en las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de *Arabidopsis*. Estos inhibidores apagan la actividad de las otras enzimas capaces de hidrolizar ATP presentes en las muestras.

Se encontró que al igual que en la hidrólisis total, hay un aumento en la actividad insensible a los inhibidores en la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* tratada con metoxifenoza, llegando a valores

de 75 nmol Pi/min/mg de proteína (Figura 10). En comparación, los valores de las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* con o sin tratamiento y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin tratamiento presentan valores promedio similares alrededor de 40-47 nmol Pi/min/mg de proteína.

De la misma manera, al realizar el análisis estadístico de los datos, se corroboró la diferencia significativa entre la actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor y las demás líneas con y sin tratamiento (Figura 10). Así, la diferencia en actividad corresponde entonces a un aumento del 60 al 80% en la actividad insensible a la mezcla de inhibidores, misma que se puede atribuir específicamente a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.



Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
<i>Wt</i> [-Mtz] vs <i>Atlcb2a-1</i> [+Mtz]	1.597	1.073	No	ns	-2.424 to 5.617
<i>Wt</i> [-Mtz] vs <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> [-Mtz]	-2.012	0.6152	No	ns	-10.85 to 6.824
<i>Wt</i> [-Mtz] vs <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> [+Mtz]	-33.57	24.28	Yes	****	-37.30 to -29.83
<i>Atlcb2a-1</i> [+Mtz] vs <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> [-Mtz]	-3.608	1.093	No	ns	-12.53 to 5.313
<i>Atlcb2a-1</i> [+Mtz] vs <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> [+Mtz]	-35.17	24.15	Yes	****	-39.10 to -31.23
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> [-Mtz] vs <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> [+Mtz]	-31.56	9.694	Yes	****	-40.35 to -22.76

Figura 10. Determinación de la hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de hojas de las líneas silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp /Atlcb2a* de *A. thaliana* tratadas con o sin metoxifenozida en presencia de los inhibidores N₃⁻, NO₃⁻ y MoO₄²⁻. Análisis estadístico. Se determinó la hidrólisis de ATP de las fracciones microsomales de las hojas en la presencia de los inhibidores N₃⁻, NO₃⁻ y MoO₄²⁻ en el medio de reacción a las concentraciones finales de 2 mM, 2 mM y 50 mM respectivamente. La gráfica muestra los valores promedio obtenidos para cada línea con [+Mtz]

o sin [-Mtz] exposición al inductor expresado como nmol Pi/min/mg proteína \pm EE. Se realizaron como mínimo 20 repeticiones para cada línea usando de 2 a 3 preparaciones independientes. Estos datos de actividad fueron procesados en el programa estadístico GraphPad Prism 5 aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni. Las letras sobre las barras son iguales si no existe diferencia entre ellas y cambia cuando la barra es significativamente diferente a las demás. Se utilizó un valor de $P < 0.05$

Ya que los resultados fenotípicos, de rendimiento y de actividad de hidrólisis de ATP de las diferentes líneas después del silenciamiento de la subunidad LCB2b de la SPT en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor corresponden con los datos reportados previamente en el trabajo de Mejía-Hernández (2010), se decidió para los siguientes experimentos de este trabajo utilizar las líneas *wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición al inductor y *Atlcb2a-1* expuesta al inductor como controles de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor.

5. Determinación del nivel de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de *A. thaliana*.

Para establecer si este aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] se debía a un aumento en la expresión de la enzima, se realizó su inmunodetección usando anticuerpos específicos contra la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, mismos que se hicieron reaccionar con las fracciones microsomales de las diferentes líneas para observar el nivel de proteína presente en cada muestra. En la Figura 11A se muestra que la cantidad de proteína cargada al gel de cada una de las líneas de *Arabidopsis* fue similar. La Figura 11B muestra la membrana completa de PVDF después de haber sido expuesta al anticuerpo primario contra la ATPasa de H⁺ y revelada.

Datos teóricos indican que la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática tiene una masa molecular de alrededor de los 100 kDa, entonces, al observar la membrana y después de comparar con el marcador de pesos moleculares, se comprueba que la banda observada corresponde a este peso molecular y que no hay una reacción del anticuerpo con otra de las proteínas membranales presentes, por lo tanto, el anticuerpo primario utilizado es específico

para la enzima correspondiente a 100 kDa que puede ser la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática.

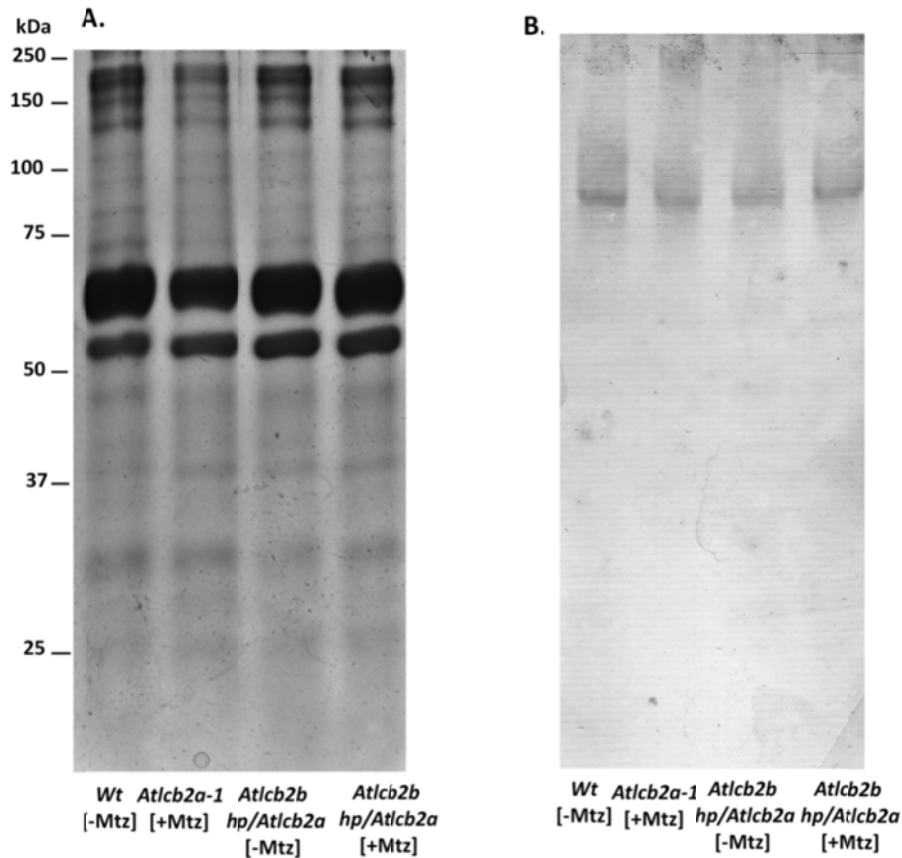


Figura 11. Detección de los niveles de ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las líneas silvestre (*wt*), *At1cb2a-1* y *At1cb2b hp /At1cb2a* de *A. thaliana* tratadas con o sin metoxifenozida. Se separaron las proteínas presentes en las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de *Arabidopsis* en geles de PAGE-SDS y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF. **A)** Gel de PAGE-SDS teñido con plata con las fracciones microsomales de cada una de las líneas expuestas [+Mtz] o no [-Mtz] al inductor. **B)** Membrana de PVDF completa después de la transferencia de las proteínas separadas en el gel y de haber sido expuesta al anticuerpo primario contra la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática y revelada con un método colorimétrico. Se muestran el gel y la membrana representativos de un total de 8 experimentos independientes.

A partir de un total de 8 diferentes experimentos como los de la Figura 11, se determinó la densidad de cada una de las bandas observadas en la membrana y se graficaron los valores de densidad integrada. Este valor considera tanto la intensidad como el área de cada banda

(Figura 12B). Así, las barras representan el nivel estimado de proteína encontrado en cada línea de *A. thaliana* en términos de la Densidad Integrada (promedio \pm DE). Tomando en cuenta los valores obtenidos y las dispersiones experimentales de cada muestra, se observa que no existe una diferencia significativa entre los niveles de proteína presentes en las diferentes líneas.

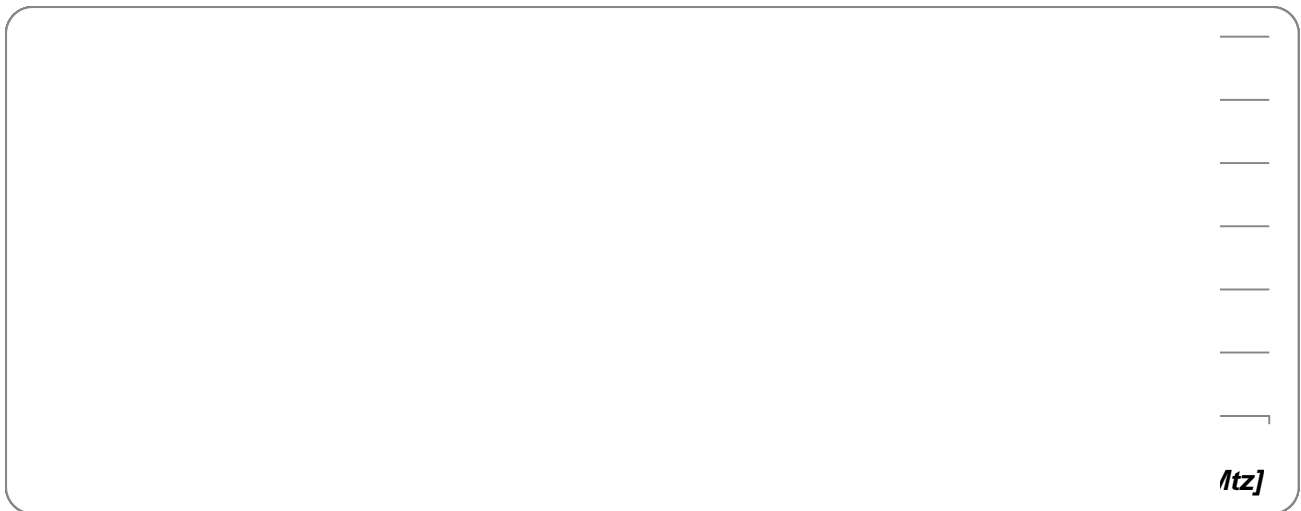
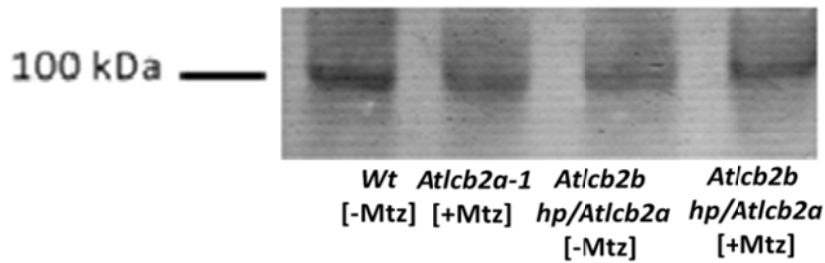


Figura 12. Densitometría de la banda correspondiente a la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las diferentes líneas de *A. thaliana*. Se realizó la densitometría de las bandas obtenidas de las repeticiones de la inmunoréplica mostrada en la Figura 11B utilizando el programa *Image J*. La densitometría se graficó en términos de la Densidad Integrada (intensidad por área de la banda analizada). Se muestran los valores promedio de la Densidad Integrada para cada línea respectivamente \pm DE. Se realizaron 8 réplicas para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones membranales independientes.

6. Reconstitución membranal de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con glicerolípidos y esfingolípidos comerciales después de 7 días de inducción con metoxifenoza y determinación de la hidrólisis total de ATP.

Al observar que el aumento de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* deficiente en esfingolípidos no se debía a un aumento en los niveles de proteína, se decidió explorar ahora el efecto de los esfingolípidos exógenos y de otros lípidos exógenos en la actividad de la enzima. Para eso, se hizo una reconstitución membranal con diferentes muestras comerciales de glicerolípidos y esfingolípidos para después medir la actividad de hidrólisis total de ATP y observar si se podían recuperar los valores de actividad control (líneas *wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor), es decir, los que se presentan cuando no hay deficiencia de esfingolípidos en la membrana.

Experimentos realizados por González-Reyes (2010) mostraron que al reconstituir las membranas plasmáticas de plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor con 50 µg de una muestra comercial de glucosilceramida, los niveles de actividad de hidrólisis de ATP disminuían hasta llegar a los valores de las líneas utilizadas como control. Por otro lado, experimentos preliminares de González-Reyes (2010) mostraron que al reconstituir las membranas plasmáticas de esta misma línea y de la línea control *Atlcb2a-1* con la misma cantidad de algunos tipos de glicerolípidos, la actividad de hidrólisis de ATP se alteraba, generalmente disminuyendo en ambas líneas, incluso a niveles más bajos de los niveles control.

En la Figura 13 se muestran los valores promedio de actividad de hidrólisis total de ATP obtenidos después de incubar las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de *Arabidopsis* durante 40 min con 50 µg de los esfingolípidos comerciales: galactocerebrósidos (GalC) y glucocerebrósidos (GluC) o con 50 µg de los glicerolípidos comerciales: fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilinositol (FI), fosfatidilcolina (FC) y fosfatidilserina (FS). Como se observa, la actividad de hidrólisis de ATP tanto de las líneas control como de la línea deficiente de esfingolípidos se altera con la presencia de los diferentes lípidos.

Al realizar la reconstitución con 50 μ g de galactosilceramida, los valores de actividad se mantienen similares a los valores obtenidos en la ausencia del lípido para todas las líneas; con glucosilceramida, la actividad inclusive aumenta ligeramente para la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* [+Mtz] de 115 a 130 nmol Pi/min/mg de proteína, mientras que para las líneas control se mantiene en valores alrededor de los 80 nmol Pi/min/mg de proteína.

Ahora, al hacer la reconstitución con los diferentes glicerolípidos utilizando la misma cantidad de 50 μ g, se observa que también alteran la actividad de hidrólisis de ATP. Con la fosfatidiletanolamina (FE) los valores de actividad tanto para las líneas control como para la línea deficiente de esfingolípidos, se mantienen en valores similares a los encontrados cuando no hay presencia de lípido.

Al utilizar fosfatidilinositol (FI), tanto los valores de actividad de las líneas control como los de la línea deficiente de esfingolípidos disminuyen en comparación a la actividad sin lípidos. Las líneas control disminuyen su actividad de 80 a 60 nmol Pi/min/mg de proteína, mientras que la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* [+Mtz] disminuye de 115 a 85 nmol Pi/min/mg de proteína. Esto indica que el FI causó una ligera disminución en la actividad de hidrólisis de ATP de alrededor del 25 % para las diferentes líneas en comparación con la actividad de las membranas sin la adición de lípidos.

Por último, al hacer la reconstitución utilizando fosfatidilcolina (FC) y fosfatidilserina (FS), la actividad tanto de las líneas control como de la línea deficiente de esfingolípidos disminuyen hasta más del 50% en comparación con la actividad determinada en la ausencia de lípidos. Al utilizar FC, la actividad de las líneas control disminuye cerca de un 57% (de 70 a 30 nmol Pi/min/mg de proteína), mientras que la línea deficiente de esfingolípidos disminuye hasta un 80% (de 114 a 24 nmol Pi/min/mg de proteína). Con la FS, la disminución de la actividad está cerca del 70% para todas las muestras: las líneas control disminuyen su actividad de 73 a 23 nmol Pi/min/mg de proteína mientras que en la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* [+Mtz] la actividad disminuye de 70 a 20 nmol de Pi/min/mg de proteína.

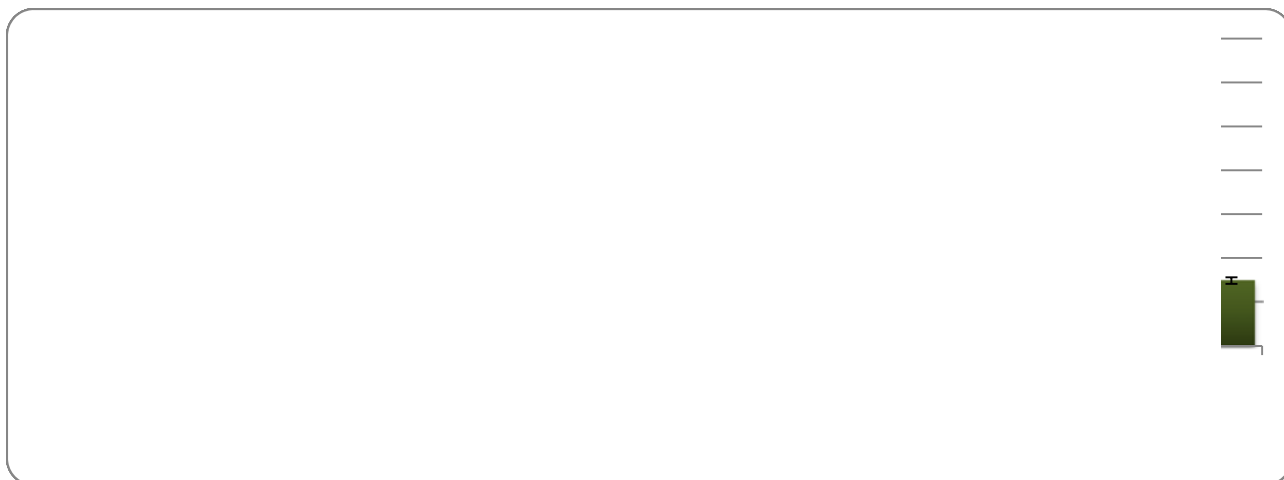


Figura 13. Reconstitución membranal de las líneas (■) silvestre (*wt*), (■) *At1cb2a-1* y (■) *At1cb2b hp /At1cb2a* con lípidos exógenos comerciales y su efecto en la actividad de hidrólisis de ATP total. Se determinó la hidrólisis total de ATP en las fracciones microsomales de las plántulas de las diferentes líneas que fueron expuestas o no al inductor después de incubar 10 μg de las muestras membranales con 50 μg de esfingolípidos comerciales: galactocerebrósidos (**GalC**) y glucocerebrósidos (**GluC**) o con 50 μg de diferentes glicerolípidos comerciales: fosfatidiletanolamina (**FE**), fosfatidilinositol (**FI**), fosfatidilcolina (**FC**) o fosfatidilserina (**FS**). La gráfica muestra los valores promedio de actividad obtenidos para cada línea con [+Mtz] o sin [-Mtz] exposición al inductor expresados como nmol Pi/min/mg proteína \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando de 2 a 3 preparaciones membranales independientes.

7. Reconstitución membranal de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* con glicerolípidos y esfingolípidos comerciales después de 7 días de inducción con metoxifenoza y determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} .

Ahora, para determinar la contribución de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en la actividad de hidrólisis de ATP en las membranas reconstituidas y mostradas en la Figura 13, se midió la actividad insensible a los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} después de incubar las muestras con 50 μg de los diferentes lípidos utilizados anteriormente.

En la Figura 14 se muestran los valores promedio de esta actividad de hidrólisis de ATP insensible a los inhibidores. Ya que el uso de los inhibidores es para apagar la actividad de las enzimas presentes capaces de hidrolizar ATP excepto la de la ATPasa de H^+ de membrana

plasmática, la actividad mostrada en las gráficas se pueden atribuir específicamente a la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática.

Al reconstituir la membrana con galactosilceramida y glucosilceramida, los valores de actividad se mantienen similares a los valores de actividad sin la presencia de lípidos para todas las líneas. A diferencia de lo que se observa en la hidrólisis total de ATP (Figura 13), la glucosilceramida no aumenta la actividad de la línea experimental *AtIcb2b hp/AtIcb2a* sino que la mantiene en valores similares a los de la actividad sin lípidos.

Con la fosfatidiletanolamina (FE) los valores de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática tanto para las líneas control como para la línea deficiente en esfingolípidos se mantienen similares a los que se presentan cuando no hay presencia de lípidos.

Al utilizar fosfatidinositol (FI) la actividad de la ATPasa de H⁺ en las líneas control disminuyen de 40 a 25 nmol Pi/min/mg de proteína, mientras que en la línea deficiente de esfingolípidos disminuye de 70 a 60 nmol Pi/min/mg de proteína. Esto indica que el FI causó una disminución en la actividad de hidrólisis de ATP de alrededor del 37% para las líneas control y del 14% para la línea experimental *AtIcb2b hp/AtIcb2a* [+Mtz].

Por último, al hacer la reconstitución utilizando fosfatidilcolina (FC) y fosfatidilserina (FS), la actividad insensible a los inhibidores disminuyó más del 50% tanto en las líneas control como en la línea deficiente de esfingolípidos. Al utilizar FC, la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de las líneas control disminuye cerca de un 70 % (de 40 a 11 nmol Pi/min/mg de proteína), mientras que en la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* [+Mtz] disminuye hasta un 80% (de 74 a 14 nmol Pi/min/mg de proteína). Con la FS, las líneas control disminuyen su actividad enzimática un 77% (de 40 a 9 nmol Pi/min/mg de proteína) y la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* [+Mtz] la disminuye un 87% (de 70 a 9 nmol de Pi/min/mg de proteína).

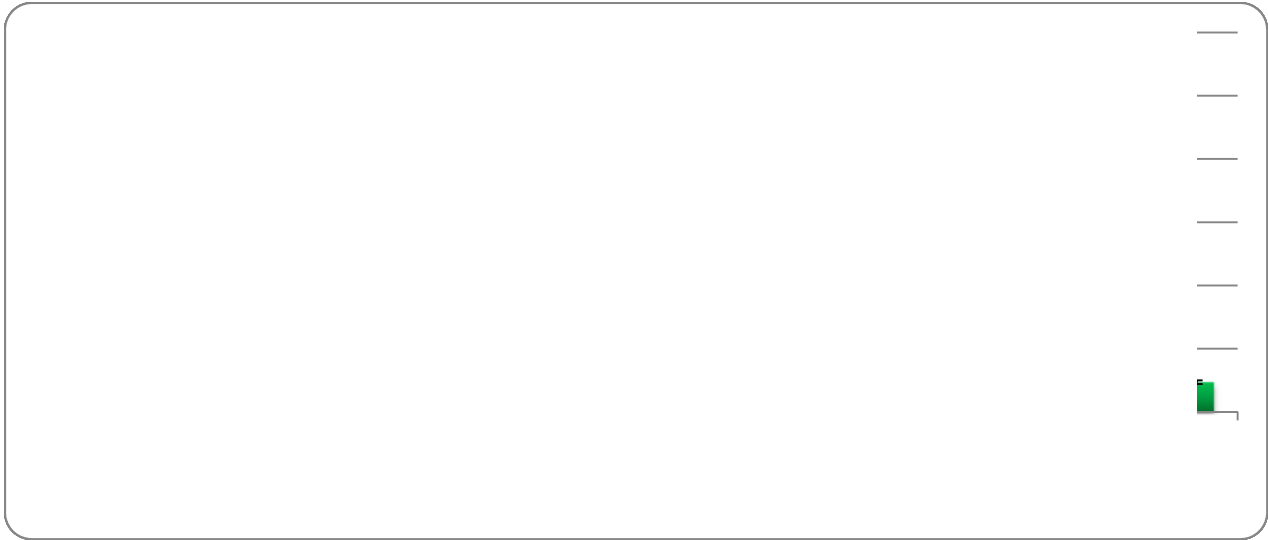


Figura 14. Reconstitución membranal de las líneas (■) silvestre (*wt*), (■) *Atlcb2a-1* y (■) *Atlcb2b hp /Atlcb2a* con lípidos exógenos comerciales y determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de inhibidores. Se determinó la hidrólisis de ATP en la presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} en el medio de reacción a las concentraciones finales 2 mM, 2 mM y 50 mM respectivamente después de incubar 10 μg de las muestras membranales de las diferentes líneas con 50 μg de los esfingolípidos comerciales: galactocerebrósidos (**GalC**) y glucocerebrósidos (**GluC**) o con 50 μg de diferentes glicerolípidos comerciales: fosfatidiletanolamina (**FE**), fosfatidilinositol (**FI**), fosfatidilcolina (**FC**), fosfatidilserina (**FS**). La gráfica muestra los valores promedio de actividad obtenidos para cada línea con [+Mtz] o sin [-Mtz] exposición al inductor expresados como nmol Pi/min/mg proteína \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando de 2 a 3 preparaciones membranales independientes.

8. Reconstitución membranal de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* después de 7 días de inducción con metoxifenoza con un extracto de esfingolípidos y determinación de la actividad total de hidrólisis de ATP.

Al ver que los cambios en la actividad de hidrólisis de ATP en las diferentes muestras variaban de diferente manera dependiendo del tipo de lípido utilizado para la reconstitución y sin importar si se trataba de una línea deficiente en esfingolípidos endógenos o no, se decidió probar si al restituir los esfingolípidos faltantes en la membrana de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] con un extracto de esfingolípidos obtenido de plántulas silvestres, se podían recuperar los valores control de la actividad de hidrólisis de ATP. Experimentos de González-Reyes

(2010) realizados en plantas adultas mostraron que se necesitaba reconstituir la membrana con cerca de 50 μg de extracto de esfingolípidos para que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] mostrara niveles de actividad similares a los valores que se observan cuando no hay una deficiencia de esfingolípidos endógenos.

En la Figura 15 se muestran los valores de actividad total de hidrólisis de ATP obtenidos después de la reconstitución membranal de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] con diferentes cantidades de un extracto de esfingolípidos obtenido de plántulas de la línea silvestre.

Como se observa, sólo al reconstituir la membrana con 2.5 y 5 μg de extracto de esfingolípidos la actividad de hidrólisis de ATP disminuye de 115 nmol Pi/min/mg de proteína hasta los 90 nmol Pi/min/mg de proteína. Después, al aumentar la cantidad de extracto, la actividad empieza a aumentar gradualmente hasta llegar a 180 nmol Pi/min/mg de proteína cuando se utilizan 250 μg de extracto. Es importante hacer notar que al utilizar los 50 μg , reportados en los experimentos de González-Reyes (2010) como la cantidad necesaria para disminuir la actividad de hidrólisis de ATP hasta valores control, en este caso, la actividad enzimática aumenta cerca de un 10% (de 115 a 130 nmol Pi/min/mg de proteína).

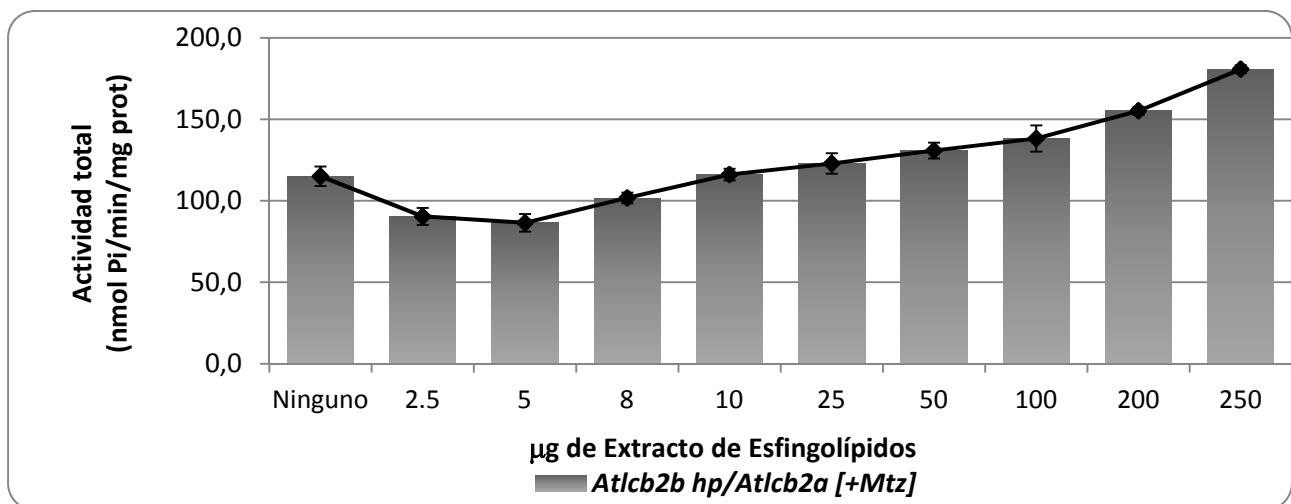


Figura 15. Reconstitución membranal de las línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] con un extracto de esfingolípidos y determinación de la actividad de hidrólisis total de ATP. Se determinó la hidrólisis total de ATP de las fracciones membranales de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] (deficiente en esfingolípidos) después de incubar 10 μg de muestra membranal con cantidades desde 2.5 hasta 250 μg del extracto de esfingolípidos obtenido de plántulas silvestres. La gráfica muestra los valores

promedio de actividad obtenidos expresados como nmol Pi/min/mg proteína \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada cantidad de extracto usando como mínimo 2 preparaciones membranales independientes.

Después de haber obtenido este resultado, se utilizaron las diferentes cantidades de extracto para reconstituir la membrana de las líneas control y observar si también se presentaban cambios en la actividad de hidrólisis de ATP.

En la Figura 16 se muestran los valores de actividad total de hidrólisis de ATP obtenidos después de la reconstitución membranal de la línea silvestre (wt), *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con las diferentes cantidades del extracto de esfingolípidos.

En la Figura 16A se observa que al reconstituir la membrana con 2.5 μ g de extracto, los valores de actividad de las líneas control no se alteran, mientras que como se mencionó anteriormente, la actividad de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] disminuye hasta alcanzar los valores de las líneas control. De la misma manera, al utilizar cantidades más grandes de extracto para reconstituir las membranas de las líneas control, se empieza a observar un aumento gradual de la actividad de hidrólisis de ATP desde 80 hasta 195 nmol Pi/min/mg de proteína.

Al observar los mismos datos de actividad en una gráfica lineal (Figura 18B) se observa fácilmente que la actividad de todas las líneas está en los mismos niveles cuando se utilizan 2.5 μ g de extracto para la reconstitución membranal. Y que al seguir aumentando la cantidad de extracto, la actividad de las diferentes líneas también aumenta de manera gradual. Es importante hacer notar que aunque la actividad de hidrólisis de ATP aumenta en todas las líneas estudiadas, no lo hace en la misma magnitud. El aumento en la actividad de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] se da de manera más gradual que el aumento en la actividad de las líneas control.

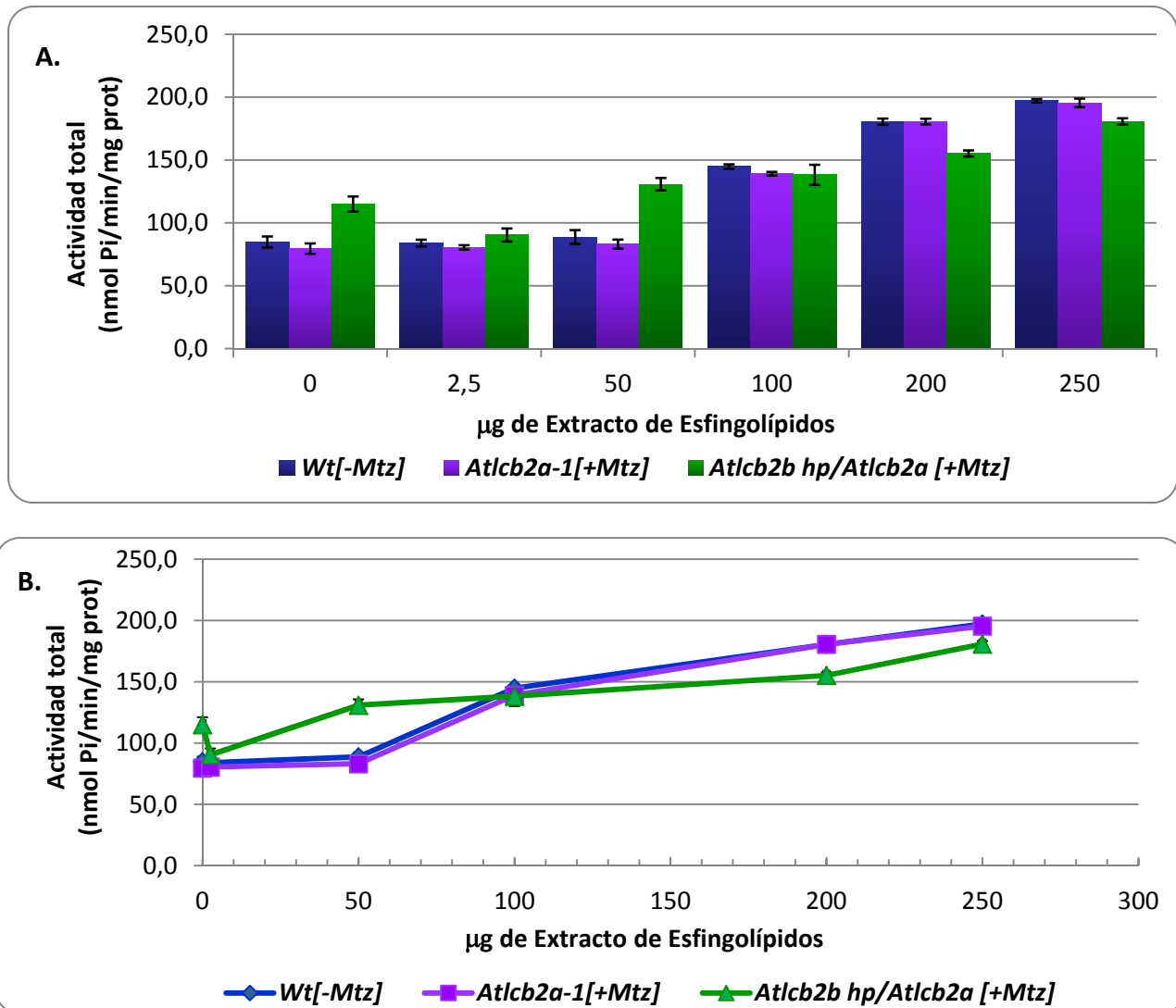


Figura 16. Reconstitución membranal de las líneas (■) silvestre (*wt*), (■) *Atlcb2a-1* y (■) *Atlcb2b hp /Atlcb2a* con el extracto de esfingolípidos y determinación de la actividad de hidrólisis total de ATP. Se determinó la hidrólisis total de ATP de las diferentes líneas después de incubar 10 µg de muestras membranales con cantidades desde 2.5 hasta 250 µg del extracto de esfingolípidos obtenido de plántulas silvestres. Ambas gráficas (A y B) muestran los valores promedio de actividad obtenidos para cada línea con [+Mtz] o sin [-Mtz] exposición al inductor expresados como nmol Pi/min/mg proteína ± EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando como mínimo 2 preparaciones membranales independientes.

9. Reconstitución membranal con extracto de esfingolípidos de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* después de 7 días de inducción con metoxifenoza y determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-}

Como en experimentos anteriores, para determinar la contribución de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática a la actividad de hidrólisis de ATP en las membranas reconstituidas con el extracto de esfingolípidos, se midió la actividad insensible a los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} después de incubar las muestras con las diferentes cantidades de extracto.

En la Figura 17 se muestran los valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores después de la reconstitución membranal con las diferentes cantidades de extracto. Al igual que en la gráfica de la actividad total, se observa que la actividad de hidrólisis de ATP disminuye solamente cuando se utilizan 2.5 y 5 μg de extracto y que a partir de ahí, cuando se aumenta la cantidad de extracto, la actividad aumenta también de manera gradual. Ya que esta hidrólisis de ATP se determinó en la presencia de los inhibidores, los cambios en la actividad se pueden atribuir específicamente a la ATPasa de H^+ de membrana plasmática.

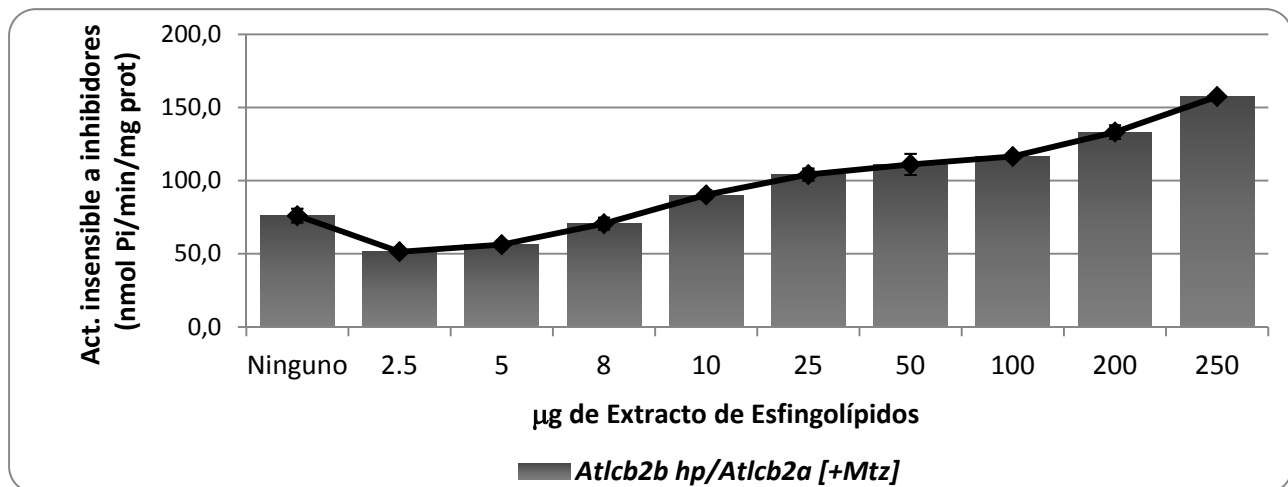


Figura 17. Reconstitución membranal de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] con un extracto de esfingolípidos y determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de inhibidores. Se determinó la hidrólisis de ATP de las fracciones membranales de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] con la presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} en el medio de reacción a las

concentraciones finales 2 mM, 2 mM y 50 mM después de incubar 10 μg de las muestras membranales con cantidades desde 2.5 hasta 250 μg del extracto de esfingolípidos obtenido de plántulas silvestres. La gráfica muestra los valores promedio de actividad obtenidos expresados como nmol Pi/min/mg proteína \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada cantidad de extracto usando mínimo 2 preparaciones membranales independientes.

Después se reconstituyó la membrana de las líneas control y se determinó la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores.

En la Figura 18 se muestran los valores obtenidos de actividad total de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores después de la reconstitución membranal de la línea silvestre (wt), *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con las diferentes cantidades del extracto de esfingolípidos.

Igual que en la gráfica de la actividad total de hidrólisis de ATP, en la Figura 18 se observa que al reconstituir la membrana con 2.5 μg de extracto, los valores de actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de las líneas control no se alteran y que la actividad de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] disminuye hasta alcanzar los valores de las líneas control. Además, como se observó en los experimentos anteriores, con cantidades más grandes de extracto, la actividad de hidrólisis de ATP aumenta de manera gradual tanto para las líneas control como para la línea experimental.

De la misma manera, al observar ahora la gráfica lineal de la actividad de hidrólisis de ATP insensible a los inhibidores, se observa que aunque la actividad de todas las líneas aumenta cuando se utilizan más de 50 μg de extracto, la actividad de la línea *Atlcb2b hp /Atlcb2a* [+Mtz] aumenta con una magnitud menor que las líneas control.

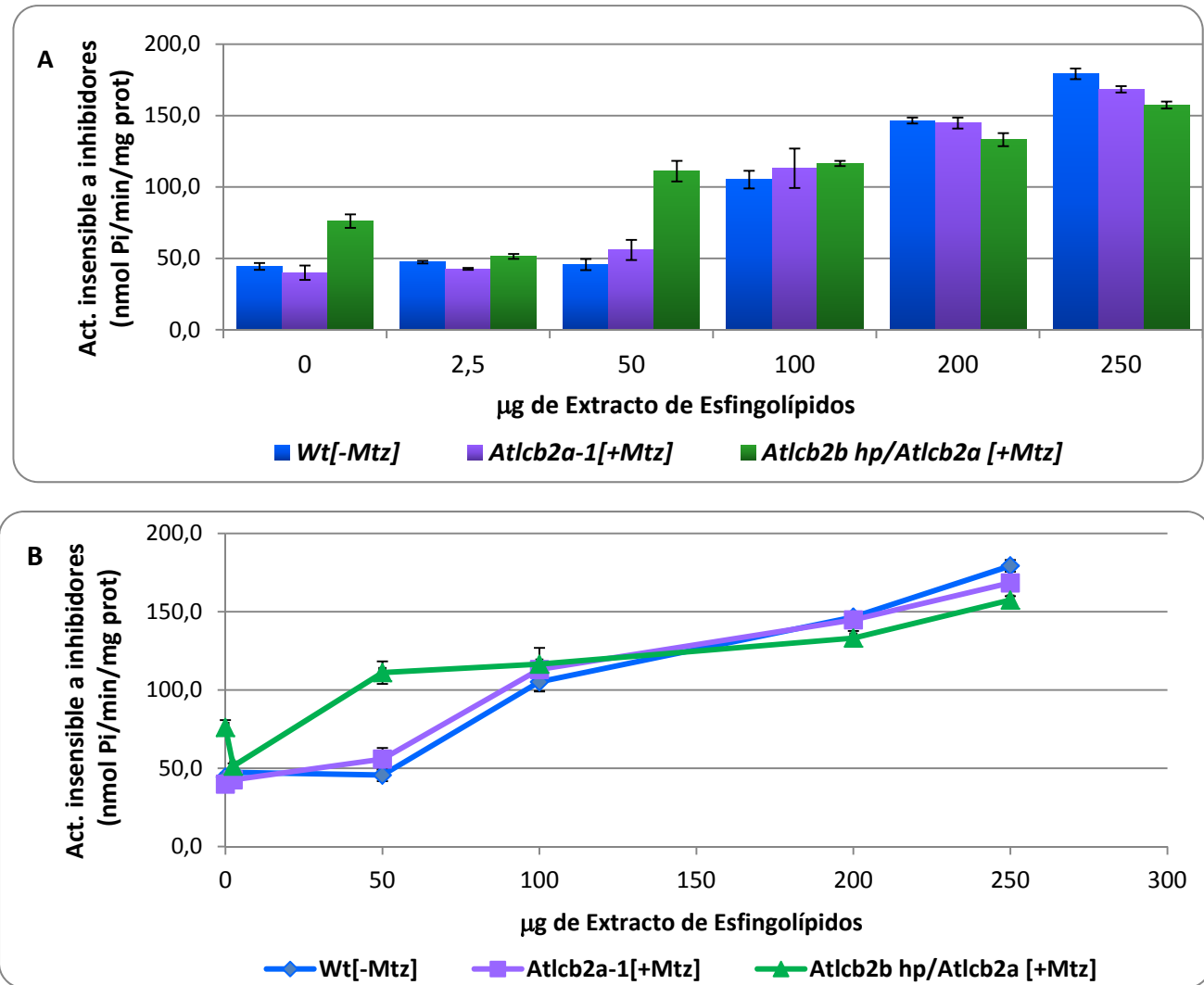


Figura 18. Reconstitución membranal de las líneas (■) silvestre (*wt*), (■) *At1cb2a-1* y (■) *At1cb2b hp /At1cb2a* con el extracto de esfingolípidos y determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores. Se determinó la hidrólisis de ATP de las diferentes líneas en la presencia de los inhibidores N_3^- , NO_3^- y MoO_4^{2-} en el medio de reacción a las concentraciones finales 2 mM, 2 mM y 50 mM, después de incubarlo con diferentes cantidades del extracto de esfingolípidos obtenido de plántulas silvestres. Ambas gráficas (A y B) muestran los valores promedio de actividad obtenidos para cada línea con [+Mtz] o sin [-Mtz] exposición al inductor expresados como nmol Pi/min/mg proteína \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando como mínimo 2 preparaciones membranales independientes.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los lípidos son reconocidos como los componentes mayoritarios de las membranas biológicas y juegan papeles importantes en actividades celulares regulando la permeabilidad, la fluidez, el transporte de nutrientes, contribuyendo a la percepción de señales del exterior (Pata *et al.*, 2010) y permitiendo el anclaje de diferentes proteínas (Yoshida y Uemura, 1986). Dentro de estas proteínas está la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, cuyo mecanismo está implicado en diversos procesos que son determinantes para el desarrollo de la planta (Sussman y Surowy, 1987; Palmgren, 2001; Gaigg *et al.*, 2005). Dada su importancia, es de esperarse que esté sujeta a varios mecanismos de regulación y que dentro de estos se encuentren los lípidos membranales. Esta idea ha sido explorada en diversos estudios en los que se han utilizado diferentes metodologías para determinar los requerimientos lipídicos de esta enzima, como la supresión selectiva de lípidos (Sandstrom y Cleland, 1989) o la modificación del ambiente anfipático solubilizando a la enzima con detergentes y luego reconstituyéndola con lípidos específicos u otros detergentes que restauren su actividad (Briskin y Poole, 1983; Briskin y Niesman-Reynolds, 1989; Sandstrom y Cleland, 1989). Con estos estudios *in vitro* se han podido encontrar diferentes compuestos anfífilos que modifican la actividad de la enzima (Tabla III).

Sin embargo, estos estudios nunca han explorado la participación de los esfingolípidos en la regulación de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, a pesar de que son el componente mayoritario en las membranas vegetales. Lo anterior puede explicarse por el hecho de que los esfingolípidos fueron descritos como componentes muy abundantes en las plantas hasta hace poco (Sperling y Heinz, 2003). Adicionalmente, el estudio de un posible papel de los esfingolípidos en la regulación de la ATPasa de H⁺ cobra especial importancia al haberse encontrado esta enzima en las balsas lipídicas, mismas que son ricas en esteroides y esfingolípidos (Bagnat *et al.*, 2001; Gaigg *et al.*, 2006).

En este contexto, experimentos realizados en el laboratorio en plantas adultas y plántulas de líneas mutantes de *Arabidopsis*, indican que los esfingolípidos también juegan un papel en la regulación de actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática. Se ha observado que cuando disminuye la presencia endógena de estos lípidos, la enzima muestra un aumento en su capacidad de hidrólisis de ATP, llegando a valores hasta del doble en comparación con la actividad de las líneas control (González-Reyes, 2010; Mejía-Hernández, 2010). Por ello, esta tesis busca ampliar los datos que se tienen sobre la participación de los lípidos membranales, en especial de los esfingolípidos y glicerolípidos, en la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* utilizando plántulas de las líneas descritas en la Tabla IV.

Tabla III. Compuestos anfífilos modificadores de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Se muestran los compuestos que se ha encontrado que activan (↑) o inhiben (↓) la actividad de la enzima (Serrano *et al.*, 1988; Palmgren *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 1995; Alexandre *et al.*, 1996; Bohn *et al.*, 2001)

Glicerofosfolípidos	Detergentes	Esteroles
Fosfatidilcolina ↑	Lisofosfatidilcolina ↑	Stigmasterol ↑
Fosfatidiletanolamina ↑	Lisofosfatidiletanolamina ↑	24 Metilcolesterol ↓
Fosfatidilinositol ↑	Lisofosfatidilinositol ↑	
Fosfatidilserina ↑	Lisofosfatidilserina ↑	
Fosfatidilglicerol ↑	Lisofosfatidilglicerol ↑	
Ácido fosfatídico ↑	Triton X-100 ↓	
	Brij 58 ↑	
	Brij 78 ↑	
	Brij 35 ↑	

En este trabajo, las fracciones microsomales obtenidas de las plántulas de las línea silvestre (*wt*) [-Mtz] fueron consideradas como el control principal, ya que esta línea no tenía alteraciones en su contenido de esfingolípidos debidas a cambios en su genoma y por lo tanto, la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática no se veía alterada. Por otro lado, las líneas *Atlcb2a-1* [+Mtz] y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [-Mtz] mostraron un contenido normal de esfingolípidos aún después de haber sido tratadas con el inductor según los análisis de Dietrich *et al.* (2008). Además, al determinar la hidrólisis de ATP por parte de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, estas líneas mutantes no mostraron diferencias significativas al comparar su actividad con la línea silvestre. Es por eso que para los experimentos realizados, tanto la línea silvestre (*wt*) [-Mtz] como las líneas mutantes *Atlcb2a-1* [+Mtz] y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [-Mtz] fueron tomadas como controles de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz]. Es importante mencionar que aunque las líneas control no mostraban una construcción genética que permitiera la disminución de esfingolípidos endógenos, fueron expuestas al inductor para comprobar que este, por sí sólo, no causaba una disminución en los esfingolípidos que llevara a alteraciones en la actividad de la enzima.

De acuerdo a los reportes de Dietrich *et al.* (2008) después de exponer las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* [+Mtz] y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* al inductor, la disminución en la cantidad de bases de cadena larga, sólo se observó en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz], la cual es la línea capaz de

codificar el RNAi que lleva al silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la SPT, mientras que tanto la línea *wt* como la *Atlcb2a-1* expuestas al inductor presentaron niveles de bases de cadena larga similares a cuando no había exposición al inductor. También después de determinar la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, esta sólo presentó un aumento en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor mientras que las líneas *wt* y *Atlcb2a-1* expuestas presentaron los mismos niveles de actividad que las mismas líneas no expuestas al inductor. Estos resultados indican que el aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor se produjo después del silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la SPT que llevó a una disminución en la cantidad de esfingolípidos endógenos.

Tabla IV. Resumen de las características genóticas, de contenido de esfingolípidos y de actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática que presentan las diferentes líneas de *A. thaliana* utilizadas en esta tesis. El tratamiento de las plántulas se indica como: expuesta al inductor ([+Mtz]) y sin exposición al inductor ([-Mtz]). La actividad de ATPasa en las líneas *Atlcb2a-1*[+Mtz] y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [±Mtz] se presenta como porcentaje con respecto a la actividad de la línea silvestre (Mejía-Hernández, 2010).

Línea de <i>A. thaliana</i> (Col-0)	Características genóticas	Tratamiento	Contenido esfingoideo	Actividad de la ATPasa de H ⁺ de MP (%)
Silvestre (<i>wt</i>)	Sin modificaciones en el genoma	-Mtz	Normal	100%
<i>Atlcb2a-1</i>	Inserción de un transposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT	+Mtz	Normal	99.5%
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	Tiene: a) La inserción del transposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT. b) Expresión inducible de un iRNA que silencia el gene de la subunidad LCB2b de la SPT	a) + Mtz b) - Mtz	a) Normal b) Disminución del 36 % en el contenido total de bases de cadena larga	a) 121.4%* b) 189%

1. Contenido total membranal en las fracciones microsomales de plántulas de *A. thaliana* después de la exposición al inductor.

Como se observó en los resultados, después de obtener las fracciones microsomales de las plántulas de las diferentes líneas y de comparar los rendimientos obtenidos, tanto en raíz como en hoja hubo una disminución de más del 60% en la cantidad de proteína recuperada de la línea deficiente en esfingolípidos a comparación de las líneas control.

Ya que ésta determinación fue de proteína total y se hizo en fracciones microsomales, las diferencias en la cantidad de proteína recuperada no se pueden atribuir sólo a la disminución de ésta en la membrana plasmática, sino que también pudo haber una disminución en las proteínas de las demás membranas presentes en la muestra, como la membrana de vacuola, tonoplasto y/o mitocondria. Es posible que en este caso, la falta de nuevos esfingolípidos en las membranas por el silenciamiento progresivo de la enzima SPT haya impedido el correcto ensamblaje de las proteínas o su inserción a la membrana, ya que a este respecto, algunos estudios realizados en levaduras han encontrado que la presencia de esfingolípidos es necesaria para el correcto transporte de las proteínas hacia la membrana, así como para mantener su topología y estabilidad (Horvath *et al.*, 1994; Gaigg *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2009). En este sentido, la disminución en la cantidad de proteína recuperada podría deberse a que aún si las proteínas logran llegar a las membranas en forma de vesículas, la falta de esfingolípidos provocaría que su inserción no fuera la adecuada, por lo que entonces algunas proteínas se degradarían más rápido, produciendo una disminución en la proteína membranal. En apoyo a esta posibilidad, se ha reportado que en células eucariontes, el mantenimiento de la composición lipídica y asimetría membranal contribuye a la correcta inserción de las proteínas en distintos organelos (Fadeel y Xue, 2009) y estudios más recientes muestran que la síntesis de esfingolípidos con cadenas largas de ácidos grasos son necesarios para el transporte de la ATPasa de H⁺ de levadura a la superficie celular (Gaigg *et al.*, 2006).

Una posibilidad adicional es que un menor contenido de esfingolípidos haya originado variaciones en la distribución de esteroides y ácidos grasos que pueden ser responsables de un cambio en la fluidez de la bicapa lipídica, y estos a su vez, disminuir la inserción de nuevas proteínas a la membrana (Alexandre *et al.*, 1996).

Para saber si la disminución en la cantidad de proteínas membranales se debe a que hay menos membranas, se podría hacer un análisis cuantitativo y cualitativo de los lípidos presentes en las vesículas membranales tanto en las líneas control como en la que tiene una disminución de esfingolípidos endógenos y comparar los resultados o analizar el contenido de proteínas totales en las diferentes líneas utilizando una electroforesis en dos dimensiones.

Después, para explorar si en la disminución en los rendimientos de proteínas membranales estaba involucrada la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, se realizaron los siguientes experimentos de determinación específica de la actividad de hidrólisis de ATP y de detección de la enzima utilizando inmunoréplicas.

2. Efectos de la disminución en el nivel de esfingolípidos endógenos por el silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b de la SPT en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática.

Los resultados reportados previamente en el trabajo de Mejía-Hernández (2010) sobre el aumento de la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en hojas de la línea deficiente de esfingolípidos en comparación con las líneas control concuerdan con los obtenidos en esta tesis, en los que el aumento en la actividad de hidrólisis total de ATP en la línea deficiente de esfingolípidos fue de más del 40% en comparación con las líneas control. Hay que recordar que en esta determinación se está tomando en cuenta la actividad de hidrólisis de ATP que realizan otras enzimas presentes en las muestras, además de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática (como las ATPasas de las membranas de vacuola y de mitocondria, y las fosfatasas). Por eso, para eliminar la contribución de esta actividad y ver el efecto que hubo sólo en la ATPasa de membrana plasmática, se utilizó una mezcla de inhibidores selectivos en el medio de reacción. La capacidad de hidrólisis de ATP determinada en estas condiciones mostró un aumento en la línea deficiente de esfingolípidos aproximadamente del 60 al 80% en comparación con la de las líneas control. Al obtener el porcentaje de actividad de hidrólisis de ATP con el que contribuyen las otras enzimas capaces de liberar Pi al medio, se observó que en las líneas control estas enzimas realizan el 40% de la hidrólisis total de ATP, mientras que en la línea con una deficiencia de esfingolípidos, la contribución es del 30%. Esta disminución pudiera deberse a una menor presencia de todas o de algunas de estas proteínas en las membranas o incluso a que su actividad también se vio afectada por el decremento de esfingolípidos y ya que el método de cuantificación de proteína que se utilizó en este trabajo determina cantidades de proteína total, no es posible especificar a cuál o cuáles de las proteínas presentes en las diferentes membranas se debió la disminución en los rendimientos. Un estudio de proteómica de las membranas de las diferentes líneas podría ayudar a aclarar este punto.

Por otro lado, al hacer la caracterización cinética de la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de hojas adultas de la línea con menor contenido de esfingolípidos (González-Reyes, 2010), se encontró que el aumento de la actividad estaba acompañado de un aumento en la V_{max} del 40%, mientras que los valores de K_m se mantenían muy similares en todas las líneas. El valor en la K_m indicaba así que un déficit de esfingolípidos no estaba afectando la

afinidad de la enzima por el sustrato y que el aumento en el valor de la V_{max} mostraba que ahora la enzima era capaz de hidrolizar más moléculas de ATP por unidad de tiempo. Esto último sugería que el aumento en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática observada en la línea deficiente de esfingolípidos, podía deberse a una mayor cantidad de proteína. Por ello, se procedió a hacer la estimación correspondiente.

3. Determinación del nivel de ATPasa de H^+ de membrana plasmática en las fracciones microsomales de las hojas de las diferentes líneas de *A. thaliana*

Para explorar la posibilidad de que el aumento en la actividad de la ATPasa de H^+ en la línea con bajo contenido de esfingolípidos se debiera a un aumento en la cantidad de enzima en la membrana plasmática como se ha reportado que ocurre en condiciones de estrés salino (López-Pérez *et al.*, 2009), se realizaron inmunoréplicas de las fracciones microsomales de las diferentes líneas de *Arabidopsis*. Hay que mencionar que experimentos preliminares de este tipo realizados en el laboratorio en hojas de las plantas adultas sugerían que la cantidad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática era igual en todas las muestras sometidas a las mismas condiciones de inducción que se estudiaron en esta tesis (Carmona 2010, no publicado).

En las inmunoréplicas obtenidas en esta tesis se observó que el anticuerpo contra la ATPasa de H^+ de membrana plasmática que se utilizó produjo una única banda a la altura de 100 kDa, el cual es el peso molecular reportado para esta enzima, por lo tanto, el anticuerpo es específico y adecuado para analizar los niveles de ATPasa presentes en las muestras.

En una inmunoréplica, el perfil de proteínas de una muestra que se corre en un gel es transferido a una membrana, en donde la proteína de interés es detectada utilizando un anticuerpo primario específico, para después, hacer evidente la unión anticuerpo-proteína utilizando un anticuerpo secundario acoplado a algún tipo de señal, por ejemplo, una enzima que produzca un producto colorido. Entonces, la intensidad de color obtenida en la o las bandas indicaría la cantidad de anticuerpo unido a una cantidad equivalente de proteína presente. Así, primero se observó, en el perfil de proteínas completo, que efectivamente se cargaron cantidades equivalentes de cada muestra y después de analizar las membranas de PVDF y graficar los valores de densidad integrada (intensidad x área) correspondientes a cada banda, se observó que al tomar en cuenta los valores promedio y las desviaciones estándar no hubo una diferencia significativa en los niveles de ATPasa de H^+ de membrana plasmática presentes en las diferentes líneas de *Arabidopsis*.

Estos resultados indican que el aumento de la actividad de hidrólisis de ATP observada por una disminución en el nivel de esfingolípidos endógenos no se debe a un aumento del nivel de ATPasa de H^+ en la membrana plasmática, dejando la posibilidad de que la alteración en la cantidad y tipo de esfingolípidos presentes sea lo que favorezca la activación de la enzima.

Es importante mencionar que el método (réplica en Western) utilizado para la determinación de los niveles de proteína no es cuantitativo, ya que en este método no se aisló y analizó la cantidad de ATPasa de H⁺ presente en las muestras por un método cuantitativo directo como el de Lowry, sino que se hizo de una manera indirecta (utilizando un anticuerpo que reconoce a la proteína) y comparando relativamente la cantidad de proteína presente entre las líneas. Por eso, para disminuir el error en las determinaciones y poder tener resultados confiables, se realizaron ocho réplicas independientes de las membranas utilizando mínimo 2 preparaciones para cada línea y las imágenes fueron tomadas cuidando que las condiciones de iluminación y de resolución fueran las mismas para todas las membranas.

En nuestro caso no se puede descartar que la activación de la ATPasa que observamos en la enzima de la línea con menor contenido de esfingolípidos se deba a mecanismos de fosforilación conocidos como los que se dan con la toxina fusicoccina y a la unión posterior de la proteína reguladora 14-3-3 (Kanczewska *et al.*, 2005), ya que nuestro sistema sólo detecta la presencia de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática y no la de la proteína reguladora. Sin embargo, experimentos previos realizados en el laboratorio en los que se realizaron inmunoréplicas con anticuerpos dirigidos contra la proteína 14-3-3, mostraron niveles similares de esta proteína en las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis* aún después de haber sido expuestas al inductor durante períodos de tiempo de 0, 3 y 6 días (Carmona, 2010 no publicado). Esto sugiere que la activación de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática cuando hay una deficiencia de esfingolípidos, no se está dando por un mecanismo que involucre a la proteína reguladora 14-3-3. Sin embargo, no descarta que el carboxilo terminal de la proteína, conocido como un dominio inhibitorio tenga una conformación distinta que modifique la actividad de la enzima.

4. Reconstitución membranal de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Efectos en la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática.

Ya que las inmunoréplicas realizadas muestran que el aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en la línea deficiente de esfingolípidos no es causado por un aumento en la expresión de la enzima, surge la posibilidad de que la alta actividad observada pueda deberse a la composición de los lípidos presentes en la membrana.

Son varios los reportes de diferentes proteínas membranales cuya actividad depende de un ambiente lipídico específico para su funcionamiento, por ejemplo, la lactosa permeasa en *E. coli* necesita la presencia de fosfatidiletanolamina en la membrana para su correcto plegamiento y función (Dowhan *et al.*, 2004), también, es necesaria la presencia de los lípidos para proveer una determinada tensión membranal que permita la apertura adecuada de canales iónicos en bacterias (Phillips *et al.*, 2009).

Entonces, para explorar la posibilidad de que la ATPasa de H^+ de membrana plasmática aumente su actividad por una alteración en la abundancia y la clase de esfingolípidos membranales, se decidió realizar una reconstitución membranal de las vesículas microsomales obtenidas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] con lípidos exógenos y observar así si al restituir los esfingolípidos endógenos faltantes, la actividad de la ATPasa de H^+ podía regresar a los valores que se presentan cuando la composición de la membrana no está alterada.

a) **Reconstitución membranal utilizando preparaciones comerciales de esfingolípidos y glicerolípidos.**

Los antecedentes inmediatos de estos experimentos son los experimentos preeliminarios de González-Reyes (2010, no publicado) en los que después de realizar la reconstitución membranal de vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de *Arabidopsis* utilizando preparaciones comerciales de fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS) y fosfatidilcolina (FC), encontró que la actividad de hidrólisis total de ATP, se alteraba de la siguiente manera: al utilizar FE, la actividad tanto de las líneas control como de la línea deficiente en esfingolípidos se mantenía en valores similares a los que se presentaban cuando no se utilizaba ningún lípido. Mientras que al utilizar FC o FS, la actividad de todas las líneas disminuía cerca de un 80%, quedando con valores por debajo de la actividad que se presentaba cuando no se realizaba la reconstitución.

En esta tesis, después de realizar la reconstitución membranal de las fracciones microsomales de plántulas de *Arabidopsis* con preparaciones comerciales de esfingolípidos y glicerolípidos y determinar la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática se obtuvieron resultados que se pueden dividir en tres bloques para su análisis, en el primero, al utilizar los esfingolípidos comerciales glucosilceramida (GluC) y galactosilceramida (GalC), y el fosfolípido, fosfatidiletanolamina (FE), no se observa un efecto sobre la actividad de la ATPasa de H^+ en ninguna de las 3 líneas de estudio (las dos líneas control y la línea deficiente en esfingolípidos). En el segundo bloque, el fosfatidilinositol (FI) causa una disminución de alrededor del 25% en la actividad de la enzima tanto en las líneas control como de la línea deficiente en esfingolípidos. Por último, en el tercer bloque se observó que cuando se utilizan fosfatidilcolina (FC) o fosfatidilserina (FS), la actividad de las tres líneas disminuye en más del 60%. En conjunto, estos datos confirman que la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática es afectada por los lípidos membranales y que este efecto es específico del tipo de lípido utilizado para la reconstitución.

Para analizar la asociación entre los diferentes lípidos utilizados y su efecto en la actividad de la ATPasa, se puede revisar la estructura de los lípidos probados. Como se

mencionó en la introducción de esta tesis, el diseño de los glicerolípidos se basa en una molécula de glicerol y un grupo fosfato. A la molécula de glicerol se encuentran unidas dos moléculas de ácidos grasos, generalmente con 20-22 átomos de carbono de longitud y una molécula suplementaria que forma la cabeza polar que puede ser un alcohol (e.g. glicerol, inositol, colina, o etanolamina) o un aminoácido como serina. Es posible entonces que estos grupos variables de ácidos grasos y grupos polares ocasionen una interacción diferente con la proteína y originen cambios en su actividad. Bajo esta perspectiva, al analizar las cabezas polares de los glicerofosfolípidos utilizados (Figura 19) se observa que los lípidos que disminuyeron la actividad de manera más marcada, la FC y FS, tienen un balance de cargas neutro y negativo respectivamente, mientras que la FE, que no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima y el FI, que sólo disminuyó la actividad un 25%, carecen de carga. Por otra parte, es importante notar que la parte polar del FI es un carbohidrato, a diferencia de los demás glicerofosfolípidos utilizados que están formados por alcoholes. Esta característica hace al FI parecido a los esfingolípidos, los cuales, cuando se encuentran en las proporciones normales, mantienen a la enzima en niveles bajos, sugiriendo entonces que la forma y tamaño de la cabeza polar de los lípidos puede tener un efecto en la interacción lípido-proteína y afectar la actividad de la enzima.

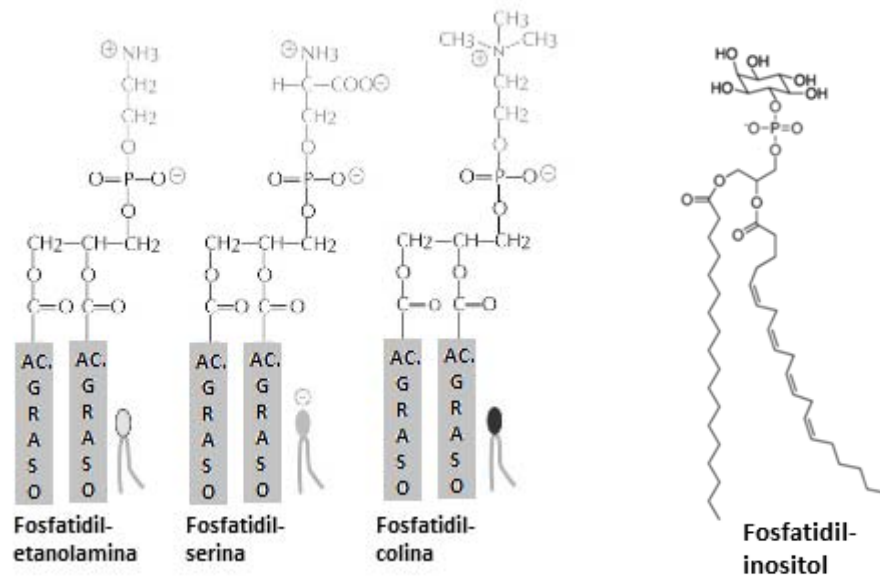


Figura 19. Estructura de los glicerofosfolípidos utilizados para la reconstitución de las membranas de las diferentes líneas de *A. thaliana* (Alberts *et al.*, 2002).

Entonces, los datos obtenidos en nuestros experimentos parecen indicar que no hay una correlación directa entre la carga de la cabeza polar de los lípidos y la actividad de la enzima. Si bien hay reportes de la literatura en los que la reconstitución de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática con glicerolípidos sugiere que grupos polares

zwitteriónicos como la FC o la FE activan con mayor eficiencia a la enzima (Serrano *et al.*, 1988).

Con respecto a la porción hidrofóbica de los glicerolípidos, se ha demostrado que la exposición de la ATPasa de H⁺ a detergentes como la lisofosfatidilcolina causa un aumento en la actividad de la enzima (Gomès *et al.*, 1996), efecto que se ha atribuido a la longitud de la cadena del ácido graso, estableciendo que mientras más larga es la cadena, mayor es la eficiencia en el aumento de la actividad (Dufour y Goffeau, 1980; Palmgren *et al.*, 1990). Por otro lado, estudios de Simmonds *et al.* (1982) mostraron que la fosfatidilcolina formada por un ácido graso saturado y otro insaturado, aumentaba la actividad de ATPasa, mientras que si los dos ácidos grasos eran insaturados, el estímulo era menos efectivo. Con estos estudios reportados y a pesar de que el proveedor no especifica las características de los ácidos grasos que forman a los glicerolípidos comerciales utilizados en este trabajo, se puede inferir, que de los lípidos con los que se realizó la reconstitución, los que no afectaron la actividad de la ATPasa de H⁺ (GalC, GluC y FE), no cuentan con cadenas de carbono lo suficientemente largas (de 20-22C) y saturadas como para permitir una interacción adecuada con la enzima, mientras que el FI, la FC y la FS están formados por ácidos grasos con las características adecuadas que permiten una interacción correcta con la enzima y su activación. Otra posibilidad, es que todos los lípidos utilizados para la reconstitución estén formados por ácidos grasos con las características necesarias tener un efecto en la actividad de la enzima, pero que su presencia en exceso no haya permitido una correcta interacción lípido-proteína como se discute más adelante.

Es importante notar que si bien, los resultados obtenidos en esta tesis para plántulas concuerdan con lo que se reportó previamente para plantas adultas por González-Reyes (2010), en cuanto a que la reconstitución con algunos glicerolípidos aumenta la actividad de la ATPasa de H⁺, mientras que otros la disminuyen, los resultados parecen contradecir los reportes mencionados de la literatura, donde se indica que al realizar la reconstitución de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática utilizando diferentes glicerolípidos, en general se observa un aumento en la actividad de la enzima (Serrano *et al.*, 1988, Sandstrom y Cleland., 1989, Kasamo, 1990). Para aclarar esto, es importante tomar en cuenta que en los reportes de la literatura mencionados, la reconstitución se hizo sobre una proteína purificada, donde la presencia de lípidos remanentes es mínima y en el caso de los experimentos de reconstitución de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz] utilizada en esta tesis, la membrana plasmática solo tiene una deficiencia en esfingolípidos endógenos y por lo tanto, la presencia adicional de otros tipos de lípidos membranales (como los glicerolípidos y los esteroides) durante el proceso de reconstitución, puede representar un exceso sobre el contenido endógeno normal correspondiente, lo cual perturbaría la interacción normal entre la ATPasa y

estos lípidos. De la misma manera, el hecho de que la adición de lípidos exógenos haya tenido también un efecto en la actividad de la ATPasa de H^+ presente en las membranas con un contenido normal de esfingolípidos (líneas control), sugiere también que un exceso en el contenido de glicerolípidos, afecta las interacciones de estos con la enzima alterando su actividad.

Por último, para apoyar la idea de que la presencia de lípidos remanentes puede afectar la interacción con la enzima, estudios de delipidación selectiva de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática con el uso de detergentes sugieren que la presencia de esteroides remanentes en la membrana después la purificación pueden ayudar a modular la interacción con los surfactantes o fosfolípidos añadidos en la reconstitución, y que en un sentido práctico pueden ayudar a proteger a la enzima de la desnaturalización durante el proceso de purificación y facilitar o promover su actividad durante la reconstitución (Sandstrom y Cleland, 1989).

b) Reconstitución membranal utilizando un extracto de esfingolípidos.

Los experimentos realizados hasta ahora analizan el efecto de diferentes lípidos, pero realizando la reconstitución membranal con un lípido puro comercial a la vez. Sin embargo, las membranas celulares están formadas por una amplia variedad de lípidos en diferentes proporciones y en cuanto a los esfingolípidos, sólo en *Arabidopsis* se han descrito cerca de 168 clases distintas (Sperling y Heinz, 2003), por eso para poder restituir la membrana con una mezcla de esfingolípidos más cercana a la que se encuentra en las membranas *in vivo*, se obtuvo un extracto de estos a partir de fracciones microsomales de plántulas silvestres utilizando la técnica descrita por Markham *et al.* (2006) con la cual se extraen cerca del 97% de los esfingolípidos presentes en las muestras.

Después al utilizar diferentes cantidades del extracto obtenido para reconstituir las membranas de las diferentes líneas y determinar su actividad de hidrólisis de ATP total y en presencia de inhibidores, se encontró que es posible disminuir la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de la línea deficiente de esfingolípidos (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* [+Mtz]) hasta los niveles de las líneas control (*wt* [-Mtz] y *Atlcb2a-1* [+Mtz]) cuando se utilizan cantidades de extracto menores a 5 μ g para la reconstitución. Este resultado indica que la reposición de esfingolípidos endógenos por los exógenos es suficiente para restablecer la actividad de la enzima.

Sin embargo, estos resultados contrastan de manera importante con los obtenidos previamente por González-Reyes (2010) realizados en plantas adultas, en los que la actividad de la enzima disminuyó hasta los niveles de la línea control (*Atlcb2a-1* [+Mtz]) utilizando 48 μ g de extracto, mientras que en las plántulas, cuando se utilizan

cantidades mayores a 10 μg de extracto, la actividad de la ATPasa de H^+ aumenta en función de la cantidad de extracto utilizada.

Así, los resultados obtenidos en las plántulas indican:

- 1) que la actividad de la ATPasa de H^+ se puede restituir utilizando esfingolípidos exógenos extraídos de fracciones membranales de plántulas silvestres y
- 2) ya que la reconstitución membranal de las plántulas se logra con menores cantidades de extracto a las que se necesitan para reconstituir la membrana de plantas adultas, es posible que los requerimientos de la cantidad y/o tipo de esfingolípidos varíen para las distintas etapas de crecimiento de la planta.

Es posible entonces que al utilizar cantidades de extracto mayores a las necesarias para la reconstitución de la enzima en plántulas, se pudiera estar favoreciendo un efecto de solubilización de la proteína que permita su activación. Es decir, que con cantidades grandes de lípidos se promueve la formación de micelas que pueden desplazar a la proteína fuera de la membrana, ya sea dejándola con sólo unos pocos lípidos circundantes que mantengan a la enzima en su estado activado o desestabilizándola por completo disminuyendo su actividad (Figura 20). El primer caso puede explicar por qué al utilizar cantidades que representan un exceso de esfingolípidos en la membrana, se observó un aumento en la actividad de la enzima, mientras una desestabilización en la enzima puede explicar por qué la FC y FS parecieran tener un efecto inhibitorio en la actividad.

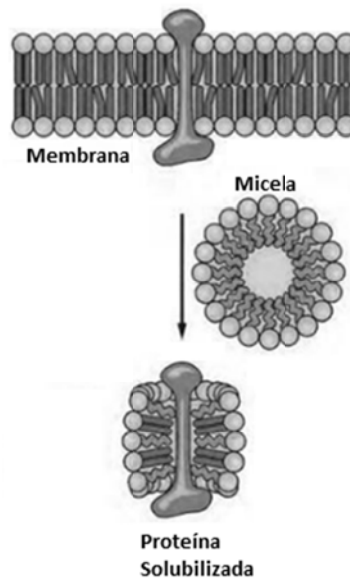


Figura 20. Efecto de solubilización de proteínas. La formación de micelas sucede cuando la cantidad de lípido utilizada se encuentra en los límites o sobrepasa su concentración micelar crítica (CMC). Esta concentración depende de la composición química de la molécula,

principalmente del radio del área de la cabeza polar y de la longitud de la cadena hidrofóbica (Alberts *et al.*, 2002).

Este efecto de solubilización de proteínas se ha observado en estudios como los de Dufour y Goffeau (1980) en los que se reportó que la activación de la ATPasa de H⁺ con el uso de lisolecitinas, sucede cerca de o en la concentración micelar del lípido, lo que puede significar una activación de la enzima por un efecto de solubilización.

El hecho de que la enzima se encontrara solubilizada, también podría explicar por qué al utilizar 50 µg de las preparaciones comerciales de los esfingolípidos GluC y GalC, no se observó una disminución de la actividad en la línea deficiente de esfingolípidos. Este punto se puede aclarar si se hacen los ensayos de reconstitución utilizando cantidades menores a 5 µg.

Todos estos experimentos sugieren fuertemente que el aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ puede ser el reflejo de un cambio en la estructura de la enzima inducido por la alteración en la composición y/o abundancia de los esfingolípidos circundantes, y que estas características de la composición de los esfingolípidos pueden estar variando dependiendo de la etapa de crecimiento de la planta.

Una teoría interesante sugiere que cuando la distancia entre proteínas membranales vecinas se hace más corta por modificaciones en la bicapa lipídica en la que se encuentran, por ejemplo, la falta de esfingolípidos, las unidades protéicas pueden interactuar de manera diferente (Phillips *et al.*, 2009). Se ha sugerido también que mientras se mantenga un ambiente hidrofóbico adecuado, con la suficiente fluidez membranal alrededor de la enzima, la actividad se mantiene o promueve dependiendo de alteraciones sutiles en ese ambiente (Dufour y Goffeau, 1980; Sandstom y Cleland, 1989). Tomando en cuenta estos datos, puede ser que los esfingolípidos presentes aumenten el grado de orden en la membrana, disminuyendo la fluidez y creando un ambiente hidrofóbico necesario que mantenga a la ATPasa de H⁺, con niveles de actividad basales bajos y entonces, cuando la cantidad de los esfingolípidos disminuye, la fluidez y el ambiente hidrofóbico también disminuirían y la enzima tomaría una conformación que le permite aumentar su actividad.

Estas observaciones y los datos obtenidos en este trabajo pueden ayudar a un mayor entendimiento tanto de los procesos de regulación de la enzima como de su presencia en regiones de balsas lipídicas donde hay una gran abundancia de esfingolípidos y esteroides (Bhat y Panstruga, 2005; Laloi *et al.*, 2007).

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES PARTICULARES

1. Una disminución en la cantidad de esfingolípidos en la membrana plasmática no ocasiona un aumento en la expresión proteica de la ATPasa de H^+
2. La presencia de los esfingolípidos en la membrana plasmática regulan a la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, manteniendo su actividad en niveles basales bajos.
3. Los efectos en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática después de la reconstitución con lípidos exógenos, dependen del tipo de lípido utilizado para la reconstitución.
4. Al realizar la reconstitución membranal, la presencia de lípidos remanentes afectan las interacciones lípido-proteína y por lo tanto, la actividad de la enzima.
5. Es posible restituir la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática hasta los niveles de las líneas control si se utilizan cantidades pequeñas de un extracto de esfingolípidos.
6. La cantidad necesaria del extracto de esfingolípidos para disminuir la actividad de la ATPasa de H^+ a los niveles control es diferente en plántulas y en plantas adultas, sugiriendo que estos lípidos se encuentran en diferentes proporciones en los diferentes estados de desarrollo de la planta.

CONCLUSIÓN GENERAL

El aumento de la actividad de la de la ATPasa de H^+ en la membrana plasmática de la línea deficiente de esfingolípidos endógenos no se debe a una mayor expresión de la enzima en la membrana. Estos cambios en la actividad se deben más probablemente a la alteración en la composición de los esfingolípidos membranales, los cuales, junto con la presencia de proporciones específicas de glicerolípidos, proveen del ambiente de soporte y de hidrofobicidad necesarios para mantener a la enzima en niveles basales bajos de actividad.

IX. PERSPECTIVAS

1. Realizar la reconstitución membranal en plántulas de *A. thaliana* con los esfingolípidos y glicerolípidos comerciales utilizando cantidades menores a 5 μg para observar si se puede restituir la actividad de la ATPasa de H^+ a niveles control.
2. Analizar el efecto del extracto de esfingolípidos obtenido de plantas adultas y de plántulas de forma cruzada sobre la actividad de la ATPasa para observar si la diferencia está entre los contenidos de esfingolípidos o las isoformas de la enzima en los diferentes estados de crecimiento de la planta.
3. Analizar la composición del extracto de esfingolípidos obtenido de plantas adultas y de plántulas para observar si la composición varía en los diferentes estados de crecimiento de la planta.
4. Analizar el contenido de lípidos presente en la membrana plasmática de la línea deficiente de esfingolípidos para determinar la abundancia de los lípidos remanentes.

X. APÉNDICE

1. Resultados individuales del contenido membranal total de hojas en cada línea de *A. thaliana*.

Tabla V. Se muestran los datos individuales de las fracciones membranales obtenidas de la parte aérea de las plántulas de las diferentes líneas de *A. thaliana*.

Línea/tratamiento	Tipo de tejido	Peso (g)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Vol. total obtenido (mL)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg prot/g tejido)	% Rendimiento
<i>Wt [-Mtz]</i>	hoja	2.2603	<u>10.94</u>	13.96	0.621	6.794	3.01	0.30
			14.38			8.929	3.95	0.40
			13.55			8.412	3.72	0.37
		2.6743	10.36	10.69	0.801	8.295	3.10	0.31
			<u>18.34</u>			14.688	5.49	0.55
			11.03			8.834	3.30	0.33
<i>Atlcb2a-1 [+Mtz]</i>	hoja	2.5236	<u>23.23</u>	15.47	0.613	14.242	5.64	0.56
			14.90			9.133	3.62	0.36
			16.05			9.836	3.90	0.39
		2.0388	12.47	12.44	0.805	10.039	4.92	0.49
			13.14			10.581	5.19	0.52
			11.70			9.420	4.62	0.46
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a [-Mtz]</i>	hoja	2.3260	<u>18.55</u>	11.98	0.414	7.678	3.30	0.33
			12.50			5.176	2.23	0.22
			11.46			4.745	2.04	0.20
		1.8920	6.89	8.11	0.800	5.515	2.92	0.29
			8.05			6.438	3.40	0.34
			9.39			7.515	3.97	0.40
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a [+Mtz]</i>	hoja	2.0687	4.90	5.28	0.328	1.607	0.78	0.08
			5.42			1.778	0.86	0.09
			5.52			1.812	0.88	0.09
		1.3644	5.26	3.91	0.378	1.988	1.46	0.15
			3.05			1.152	0.84	0.08
			3.43			1.298	0.95	0.10

*Los valores subrayados no se tomaron en cuenta para calcular los promedios.

2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

A) Siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana*

20% (v/v) solución de hipoclorito de sodio (NaClO) elaborada a partir de cloro comercial Cloralex® .

0.1% (v/v) Tween 20

Microdyn® (opcional)

Agua bidestilada estéril

Medio Agar-Gamborg

Para preparar 100 mL pesar:

1 g agar

1 g sacarosa

0.32 g medio Gamborg

Disolver en H₂O bidestilada y esterilizar.

B) Inducción con Metoxifenoza

Insecticida Intrepid® (Dow AgroSciences de México S.A. de C.V., formulado a una concentración de 240 g i.a./L, el cual debe mantenerse lejos de la luz, en un lugar fresco y bien cerrado)

Agua bidestilada estéril

C) Obtención de Fracciones Microsomales

Buffer de Homogenización

620 mM sorbitol

50 mM hepes/BTP pH 7.8

15 mM ácido ascórbico

3 mM EDTA

1 mM KCl

0.8 % (m/v) PVP (polivinilpirrolidona)

0.2% BSA (albúmina sérica bovina)

Al momento de usar, agregar al buffer de homogenización:

DTT (ditiotreitól) relación: 16 µL/ 5 mL buffer

Cocktail de inhibidores relación: 115 µL/ 5 mL buffer

β- Mercaptoetanol relación: 4.9 µL/ 5 mL buffer

Buffer de Ajuste de Peso

620 mM sorbitol

5 mM KH₂PO₄

1 mM DTT

0.1 mM EDTA

Disolver en H₂O bidestilada

D) Determinación de proteína por el método de Lowry modificado por Petterson, 1977. Sin precipitación con TCA.

0.15% (m/v) desoxicolato de sodio (DOC)

10% (m/v) SDS

0.8 N NaOH

CTC (carbonato-tartrato-cobre)

Para preparar 100 mL pesar:

10 g Na₂CO₃

0.1 g CuSO₄

0.2 g K/Na tartrato

Disolver en el orden indicado en H₂O bidestilada

Reactivo A: Mezclar al momento de utilizar partes iguales de los stocks de CTC, NaOH, SDS, H₂O v/v/v/v.

Reactivo B. Reactivo Folin-Ciocalteu (Folin Ciocalteu's Phenol reagent): Diluir la solución concentrada comercial 1:5 v/v en agua desionizada.

1 mg/mL BSA. Almacenar a - 20°C.

E) Determinación de Pi por el método de Chifflet modificado. González-Romo et al. (1992).

Solución estándar de K₂HPO₄ 1 mM

24% (m/v) SDS Preparar utilizando el reactivo con alto grado de pureza (Sigma L-4509, 99% de pureza). Disolver perfectamente calentado la solución a baño María.

Solución B: 12% (m/v) ácido ascórbico en HCl 1 N. Añadir de 2-3 gotas de EDTA 100 mM, pH 8 para evitar la oxidación. Almacenado a 4 °C permanece incoloro hasta 2 meses.

Solución C: 2% (m/v) molibdato de amonio en HCl 1 N. Almacenado a 4 °C permanece incoloro hasta 2 meses.

Reactivo B/C: Mezclar la Solución B en C a partes iguales al momento de utilizarse. Añadir la solución B a la C.

Reactivo E : 2% (v/v) ácido acético; 2% (m/v) metarsenito de sodio; 2% (m/v) citrato de sodio disuelto en H₂O destilada

F) Ensayo de Hidrólisis de ATP

Solución Sacarosa/ PIPES

(250 mM Sacarosa; 20 mM PIPES pH 6.5 ajustada con BTP)

Para preparar 100 mL pesar:

8.5575 g sacarosa

0.6047 g PIPES
Disolver en H₂O bidestilada y ajustar pH 6.5 con BTP

0.015% (v/v) Brij 58

300 mM ATP
Para preparar 5 mL pesar:
0.8267 g ATP en un tubo frío tratado con H₂SO₄
Añadir 1.5 mL PIPES 20 mM pH 6.5
Agitar y ajustar pH a 6.5 con NaOH 1 M

300 mM MgCl₂
Para preparar 100 mL pesar:
6.143 g MgCl₂
Disolver en H₂O bidestilada

7 μM CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona) disuelto en etanol.

24% (m/v) SDS preparar utilizando el reactivo con alto grado de pureza (Sigma L-4509, 99% de pureza). Disolver perfectamente calentado la solución a baño María.

Stock de inhibidores:
1 M KNO₃
100 mM NaN₃
100 mM Na₂MoO₄·2H₂O

G) Gel de Acrilamida-SDS

10 % - 0.3% (m/v) Acrilamida-Bis acrilamida. Almacenar a 4 °C

Amortiguador del gel
3 M Tris
0.3% (m/v) SDS
Ajustar pH 8.9

Glicerol anhidro
H₂O bidestilada
10% (v/v) persulfato de amonio
0.3% y 10 % (m/v) SDS
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) disolución comercial sin diluir

Buffer de carga
10% (m/v) SDS
100 mM Tris pH 6.8
10.6% (m/v) azul de bromofenol
4% β-mercaptoetanol

Buffer de ajuste de peso
620 mM sorbitol

5 mM KH_2PO_4
1 mM DTT
0.1 mM EDTA
Buffer del cátodo
0.1 M Tris
0.1 M tricina
0.1% (m/v) SDS
Buffer del ánodo
0.1 M Tris
Ajustar pH 8.9 con HCl

H) Tinción con Plata. Método de Vorum.

Solución de Fijación
50% (v/v) metanol
12% (v/v) ácido acético
0.05% (v/v) formaldehído (SIGMA F-8775)
Solución de Lavado
35% (v/v) etanol
Solución de Sensibilización
0.02% (m/v) tiosulfato de sodio
Solución de plata
0.2% (m/v) AgNO_3
0.076% (v/v) formaldehído
Solución de Revelado
6% (m/v) Na_2CO_3
0.05% (v/v) formaldehído
0.0004% (m/v) tiosulfato de sodio
Solución Stop
50% (v/v) metanol
12% (v/v) ácido acético
Solución de Almacenamiento
1% (v/v) ácido acético

I) Tinción con azul de Coomasie

Solución para teñir
Para preparar 1000 mL:
395 mL metanol
395 mL H_2O
210.5 mL ácido acético

1.6 g azul brillante de Coomasie
Solución desteñidora
46% (v/v) etanol
9% (v/v) ácido acético
Solución para almacenar
10% (v/v) glicerol

J) Inmunoréplica

Solución amortiguadora de transferencia

Para preparar 1L, tomar el volumen indicado de las soluciones stock:

15 mL de una solución 1M de buffer de fosfatos pH 6.8. Se prepara tomando partes iguales de las soluciones 1M de Na_2HPO_4 y 1M de NaH_2PO_4 .

200 mL de metanol reactivo analítico

2.5 mL de una solución 20% (m/v) SDS

Aforar a 1L con H_2O bidestilada

Solución amortiguadora con Tris-solución salina (TBS)

20 mM Tris-HCl pH 7.5

0.5 M NaCl

Solución amortiguadora TBS con Tween 20 (TTBS)

Para preparar 1L medir:

995 mL disolución TBS

5 mL Tween 20 al 20% (v/v)

Solución bloqueadora

2% (m/v) leche descremada Svelty en TTBS

Solución del anticuerpo primario

1:1000 Anticuerpo anti- ATPasa de H^+ de membrana plasmática en 2% (m/v) de leche descremada Svelty y TBS

Solución del anticuerpo secundario

1: 1000 Anticuerpo cabra anti conejo Ig G. Fosfatasa alcalina en 2% (m/v) de leche descremada Svelty y TBS

Solución amortiguadora de carbonatos

0.1 M NaHCO_3

1 mM MgCl_2

Ajustar pH a 9.8 con NaOH

Solución para el desarrollo del color

Solución patrón de NBT (nitro blue tetrazolium)

Para preparar 1 mL:

Pesar 30 mg de NBT

Disolver en 1mL de una solución al 70% de DMF (dimetilformamida)

Guardar a 4°C en un envase protegido de la luz. Es estable por 2 meses.

Solución patrón de BCIP (5-bromo4-cloro-3-indolil fosfato)

Para preparar 1 mL:

Disolver 15 mg de BCIP en 1 mL de DMF (dimetilformamida)

Guardar a 4°C en un envase protegido de la luz. Es estable por 2 meses

La mezcla para desarrollar color se prepara justo antes de ser usada:

Añadir 100 µL de la solución NBT y 100 µL de la solución BCIP por cada 10 mL de solución amortiguadora de carbonatos.

K) Reconstitución de vesículas de membrana plasmática con lípidos exógenos

10 mM L- α -fosfatidilcolina en cloroformo (CH₃Cl). Polvo liofilizado. SIGMA P-7443

5 mg/ml L- α -fosfatidiletanolamina en cloroformo (CH₃Cl). Polvo liofilizado SIGMA P-8193

1 mg/ml L- α -fosfatidilinositol en cloroformo:metanol (CH₃Cl:CH₃OH) (95:5). Sal de sodio SIGMA P-0639

1 mg/ml L- α -fosfatidil-L-serina en cloroformo:metanol (CH₃Cl:CH₃OH) (95:5). Polvo amorfo SIGMA P-7769

5 mg/ml Glucocerebrósidos en cloroformo:metanol (CH₃Cl:CH₃OH) (2:1). MATREYA 1522

5 mg/ml Galactocerebrósidos en cloroformo:metanol (CH₃Cl:CH₃OH) (1:1). SIGMA C-4905

1% BHT (butilhidroxitolueno). Se utiliza a una concentración final de 0.002% en etanol

N₂ gas

L) Extracción de esfingolípidos de membranas de *Arabidopsis thaliana*. Método modificado de Markham *et al.*, 2006

Etanol reactivo analítico (BAKER 9014-03)

H₂O bidestilada

Dietileter solvente para HPLC (SIGMA 309966)

Piridina reactivo analítico (BAKER 3348-62)

Hidróxido de Amonio reactivo (SIGMA A-6899)

Fase E: etanol:H₂O:dietileter:piridina:amonio (15:15:5:1:0.08) (v:v:v:v:v)

1% (m:v) BHT (butilhidroxitolueno). Se utiliza a una concentración final de 0.002%

N₂ gas

XI. REFERENCIAS

1. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science 5ª ed. Nueva York. Pp 477-487, 510
2. **Alexandre H, Mathieu B, Charpentier C** (1996) Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H⁺ ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology* **142**: 469-475
3. **Bagnat M, Chang A, Simons K** (2001) Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* **12**: 4129-4138
4. **Bhat RA y Panstruga R** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5-19
5. **Bohn M, Heinz E, Lüthje S** (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *ABB* **387**: 35-40
6. **Borner GHH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, MacAskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104-116
7. **Brauer D y Tu SI** (1989) Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol* **89**: 867-874
8. **Briskin DP y Niesman-Reynolds I** (1989) Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol* **90**: 394-397
9. **Briskin DP y Poole RJ** (1983) Evidence for a β-aspartyl phosphate residue in the phosphorylated intermediate of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol* **72**:1133-1135
10. **Buchanan B, Grissem W, Jones RL** (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. U.S. Pp 902, 903.
11. **Callen J** (2000) Biología Celular de las Moléculas a los Organismos. Compañía Editorial Continental. 1ª ed. Ciudad de México. Capítulos 5-6.
12. **Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M** (2008) Plant sphingolipids:structure, synthesis and function. En: Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions. (H. Wada and N. Murata eds.) Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 30. Springer. New York 77-116
13. **Coccuci MC y Marrè E** (1984) Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate inhibited, Mg²⁺ ATPase from radish microsomes. *Biochim Biophys Acta* **771**: 42-52

14. **Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM, Cahoon EB** (2008) Loss of function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis lcb2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J* **54**: 284-298
15. **Dowhan W, Mileykovskaya E, Bogdanov M** (2004) Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**: 19-39
16. **Duby G y Boutry M** (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Eur J Physiol* **457**: 645-655
17. **Duby G, Poreba W, Piotrowiak D, Bobik K, Derua R, Waelkens E, Boutry M** (2008) Activation of plant plasma membrane H^+ -ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H^+ -ATPase C-terminal region *J Biol Chem* **248**: 4213-4221
18. **Dufour JP y Goffeau A** (1980) Phospholipid reactivation of the purified plasma membrane ATPase of yeast. *J Biol Chem* **255**: 10591-10598
19. **Fadeel B y Xue D** (2009) The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical Rev Biochem Mol Biol* **44**: 264-277
20. **Fuglsang A, Borch J, Bych K, Jahn T, Roepstroff P, Palmgren M** (2003) The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H^+ -ATPase. *JBC* **278**:42266-42272
21. **Gaigg B, Timischl B, Corbino L, Schneiter R** (2006) Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but nor ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J Biol Chem* **280**: 22515-22522
22. **Gomès E, Venema K, Simon-Plas F, Milat ML, Palmgren MG, Blein JP** (1996) Activation of the plant plasma membrane H^+ -ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS* **398**: 48-52
23. **González-Reyes KM** (2010) Caracterización de la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plántulas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM
24. **González-Romo P, Sánchez-Nieto S, Gavilanes-Ruiz M** (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem* **200**: 235-238
25. **Gouaux E y White SH** (2001) Lipids lost, lipids regained. *Struc Biol* **11**: 393-396
26. **Horvath A, Sutterlin C, Manning-Krieg U, Movva NR, Riezman H** (1994) Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *Embo J* **13**: 3687-3695

27. **Johansson F, Olbe M, Sommarin M** (1995) Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J* **7**: 165-173
28. **Kanczewka J, Marco S, Vandermeeren C, Madoux O, Rigaud JL, Boutry M** (2005) Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 11675-11680
29. **Kasamo K** (2003) Regulation of plasma membrane H⁺ ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res* **116**: 517-523
30. **Kasamo K** (1990) Mechanism for the activation of plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) culture cells by molecular species of a phospholipid. *Plant Physiol* **93**:1049-1052
31. **Kasamo K y Sakakibara Y** (1995) The plasma membrane H⁺ ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci* **111**:117-131
32. **Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX** (2009) Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**: 612-623
33. **Lalit M. Srivastava** (2002), Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Elsevier Science. China. Pp 173.
34. **Laloi M, Perret A-M, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier M-N, Zachowski A, Bathany K, Schmitter J-M, Vallet M, Lessire R, Hartmann M-A, Moreau P** (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol* **143**: 461-472
35. **Lefebvre B, Furt F, Hartmann M-A, Michaelson LV, Carde J-P, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule J-J, Mongrand S** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**: 402-418
36. **López-Pérez L, Martínez-Ballesta MC, Maurel C, Carvajal M** (2009) Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* **70**: 492-500
37. **Luckey M** (2008) Structural Biology with Biochemical and Biophysical Foundations. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 17-23

38. **Markham J y Jaworski JG** (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**:1304-1314
39. **Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG** (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* **281**: 22684-22694
40. **Mejía-Hernández Edgar** (2010) Contribución de los esfingolípidos a la actividad de la ATPasa de H⁺ en plantas jóvenes de *A. thaliana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM
41. **Michelet B y Boutry M** (1995) The plasma membrane H⁺ ATPase: A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol* **108**:1-6
42. **Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y, Uemura M** (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol* **50**: 341-359
43. **Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J-P, Hartman M-A, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J-J** (2004) Lipid rafts in higher plant cells. *J Biol Chem* **279**: 36277-36286
44. **Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule J-J, Blein J-P, Simon-Plas F** (2006) Proteomics of plant detergent resistant membranes. *Mol Cell Proteomics* **5**:1396-1411
45. **Mortz E, Krohg TN, Vorum H, Görg A** (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser adsorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**: 1359-1363
46. **Nelson DL y Cox MM** (2006) Lehninger Principios de Bioquímica. Ed. Omega. 4^a ed. España. Pp 372-374
47. **Palmgren MG y Christensen G** (1994) Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺ ATPase isoforms expressed in yeast. *J Biol Chem* **269**: 3027-3033
48. **Palmgren MG** (2001) Plant plasma membrane H⁺ ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 817-845
49. **Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskov P, Larsson C** (1990) Effects of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1021**: 133-140
50. **Pata MO, Hannun YA, Ng CK-Y** (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the sphinx. *New Phytol* **185**: 611-630

51. **Pedersen BP, Buch-Pedersen M, Morth P, Palmgren MG, Nissen P** (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* **450**: 1111-1115
52. **Peterson GL** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**:346-356
53. **Phillips R, Ursell T, Wiggins P, Sens P** (2009) Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **459**:379-385
54. **Sandstrom RP y Cleland RE** (1989) Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Enrichments of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol* **90**:1524-1531
55. **Schägger H y Von Jagow G** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379
56. **Serrano R, Montesinos C, Sánchez J** (1988) Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Science* **56**: 117-122
57. **Shahollari B, Peskan-Berghöfer T, Oelmüller R** (2004) Receptor kinase with leucine rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Plant Physiol* **122**:397-403
58. **Simmonds AC, East JM, Jones OT, Rooney EK, McWhirter J, Lee AG** (1982) Annular and non-annular binding sites on the (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase. *Biochim Biophys Acta* **693**: 398-406
59. **Sperling P y Heinz E** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* **1632**: 1-15
60. **Srivastava LM** (2002), Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Elsevier Science. China. Pp 173
61. **Sussman MR y Surowy TK** (1987) Physiology and Molecular Biology of Membrane ATPases. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* **4**:47-70
62. **Taiz L y Zeiger E** (2006) Fisiología Vegetal. Publicaciones de la Universidad Jaume. 3° ed. España. Pp 538-540.
63. **Vara F y Serrano R** (1983) Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes. *J Biol Chem* **258**: 5334-5336
64. **Yeagle PL** (1983) Cholesterol modulation of (Na⁺, K⁺)ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* **727**: 39-44
65. **Yoshida S y Uemura M** (1986) Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean. *Plant Physiol* **82**: 807-812