



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INTERACCIÓN DE LA ATPasa DE H⁺ CON LA REGIÓN LÍPIDICA DE LA MEMBRANA
PLASMÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.A. CHRISTIAN ALEJANDRO VÁZQUEZ VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. MARINA GAVILANES RUÍZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. ROSARIO VERA ESTRELLA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. FELIPE CRUZ GARCÍA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D. F.

Mayo, 2015



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: Dra. Marietta Tuena Sangri
Vocal: Dr. Omar Homero Pantoja Ayala
Vocal: Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
Vocal: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario: Dra. Rosario Vera Estrella

Sitio donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 101. Departamento de Bioquímica
Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante: _____
QA. Christian Alejandro Vázquez Vázquez

Comité tutorial: Dra. Rosario Vera Estrella (IBT)
Dr. Felipe Cruz García (FQ)

RECONOCIMIENTOS

Christian Alejandro Vázquez Vázquez, recibió becas de CONACYT (No. 214761) y de PAPIIT (proyecto IN209806) DGAPA, UNAM.

El trabajo de tesis fue financiado por los proyectos DGAPA (IN211409-3 e IN22815) y CONACYT (40311-Q y 55610).

A la colaboración de la M en C. Laura Carmona Salazar.

A la ayuda técnica de la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo y de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Al Dr. Diego González Halphen y al M. C. Rodolfo Paredes, por su participación en el trabajo de microscopía electrónica de transmisión realizada en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular.

Al Dr. Luis González de la Vara (CINVESTAV Irapuato) y a la Dra. Rosario Vera Estrella (Instituto de Biotecnología UNAM) por haber proporcionado los anticuerpos contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

ÍNDICE DE CONTENIDO

JURADO ASIGNADO.....	II
RECONOCIMIENTOS.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	- 1 -
INTRODUCCIÓN	- 3 -
I. Evolución del modelo de la estructura de la membrana plasmática.....	- 3 -
1. Modelo de membrana hasta antes de 1900.....	- 3 -
2. 1917, Irving Langmuir.....	- 3 -
3. 1925, Gorter-Grendel.....	- 3 -
4. 1935, Danielli-Davson y 1959, Robertson.....	- 4 -
5. 1966, Benson, Leonard-Singer y Wallach-Zahler.....	- 4 -
6. 1972, Singer y Nicholson. Modelo del mosaico fluido.....	- 4 -
7. 1980, Dinámica membranal.....	- 5 -
8. 1990, Balsas lipídicas y en la actualidad.....	- 5 -
II. Lípidos de la membrana plasmática de plantas.....	- 6 -
1. Glicerolípidos.....	- 6 -
A. Estructura.....	- 7 -
B. Biogénesis.....	- 7 -
2. Esfingolípidos.....	- 9 -
A. Estructura.....	- 10 -
B. Biogénesis.....	- 10 -
C. Transporte a la membrana.....	- 12 -
D. Principales inhibidores de la biosíntesis.....	- 12 -
3. Esteroles.....	- 13 -
A. Estructura.....	- 13 -
B. Biogénesis.....	- 14 -

C. Transporte a la membrana.....	- 14 -
D. Principales inhibidores de la biosíntesis.....	- 14 -
III. Proteínas de la membrana plasmática.....	- 15 -
1. Tipos de proteínas asociadas a la membrana plasmática.....	- 15 -
A. Proteínas periféricas.....	- 15 -
B. Proteínas integrales.....	- 15 -
IV. Interacción lípido-proteína.....	- 15 -
1. Importancia de los lípidos para la estructura y función de las proteínas de membrana.-	15 -
2. Principios generales de la interacción de los lípidos con las proteínas membranales..	- 16 -
3. Especificidad de la interacción lípido-proteína.....	- 16 -
V. La ATPasa de H ⁺ de plantas y su interacción con los lípidos membranales.....	- 17 -
1. Estructura y función.....	- 17 -
2. Biogénesis y expresión diferencial de isoformas.....	- 21 -
3. Regulación.....	- 22 -
A. Expresión de los genes de la enzima.....	- 22 -
B. Regulación transcripcional y traduccional.....	- 22 -
C. Fosforilación y desfosforilación de la enzima.....	- 23 -
D. Interacción con la proteína 14-3-3.....	- 24 -
4. Interacción con lípidos membranales.....	- 25 -
A. Interacción con los glicerolípidos.....	- 25 -
B. Interacción con esteroides.....	- 25 -
VI. Antecedentes.....	- 27 -
HIPÓTESIS.....	- 29 -
OBJETIVOS.....	- 30 -
OBJETIVO GENERAL.....	- 30 -
OBJETIVOS PARTICULARES.....	- 30 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 31 -
I. Reactivos.....	- 31 -
II. Material biológico.....	- 31 -
III. Germinación de semillas de <i>A. thaliana</i>	- 31 -
IV. Ensayo de acidificación de raíces de <i>A. thaliana</i>	- 32 -

V. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 32 -
1. Obtención de la fracción microsomal.....	- 32 -
2. Optimización de la obtención de VMP de hojas de <i>A. thaliana</i>	- 33 -
VI. Determinación de hidrólisis de ATP.....	- 33 -
VII. Análisis por microscopía electrónica.....	- 34 -
VIII. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes [Schägger y von Jagow 1987].....	- 34 -
IX. Electrotransferencia de proteínas a partir de geles de poliacrilamida-SDS a membranas de PVDF.....	- 35 -
X. Inmunodetección de la ATPasa de H ⁺	- 36 -
RESULTADOS.....	- 37 -
I. Purificación de VMP de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-O (tipo silvestre).....	- 37 -
1. Pureza de la preparación de VMP. Determinación de la actividad de enzimas marcadoras.....	- 40 -
2. Pureza de la preparación de VMP. Enriquecimiento de la ATPasa de H ⁺	- 41 -
3. Ultraestructura de las vesículas de membrana plasmática.....	- 41 -
II. Efecto de la modificación de esfingolípidos endógenos sobre la actividad de la ATPasa de H ⁺ en hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> .-	43
1. Actividad de la ATPasa de H ⁺ en VMP de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en la línea silvestre y en las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> que expresan contenidos diferentes de ceramidas/esfingolípidos complejos.....	- 43 -
2. Niveles de la ATPasa de H ⁺ y proteína 14-3-3 en preparaciones de VMP de las tres líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 47 -
III. Valoración de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática por un parámetro fisiológico en las diferentes líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 50 -
DISCUSIÓN.....	- 53 -
I. Purificación de VMP de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre.....	- 53 -
II. Efecto de la modificación del contenido de esfingolípidos endógenos sobre la actividad de la ATPasa de H ⁺ de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y de las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	- 55 -

1. Fenotipo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en la línea silvestre y en las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> que expresan contenidos diferentes de esfingolípidos complejos y sus precursores.....	- 56 -
2. Actividad de la ATPasa de H ⁺ en VMP de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en la línea silvestre y en las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> que expresan contenidos diferentes de esfingolípidos complejos y sus precursores.....	- 56 -
3. Contenido de la ATPasa de H ⁺ y de la proteína 14-3-3 en preparaciones de VMP de las tres líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 57 -
III. Ensayo fisiológico de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática.	- 58 -
IV. Modelo de la interacción esfingolípido proteína.....	- 59 -
RESUMEN DE RESULTADOS	- 63 -
CONCLUSIÓN GENERAL	- 64 -
PERSPECTIVAS.....	- 65 -
BIBLIOGRAFÍA	- 66 -

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Fig. 1. Estructura de los lípidos con base en el glicerol y el fosfato.	- 7 -
Fig. 2. Estructura de los principales ácidos grasos y grupos polares de glicerolípidos de las membranas celulares de plantas.	- 8 -
Fig. 3. Estructura de los esfingolípidos encontrados en plantas.	- 9 -
Fig. 4. Ruta de biosíntesis de esfingolípidos en plantas.	- 11 -
Fig. 5. Estructura básica de un esteroles con la numeración estándar de los carbonos de acuerdo a las recomendaciones de la convención IUPAC-IUB de 1989.	- 13 -
Fig. 6. Estructura cristalográfica de la ATPasa de H ⁺ , isoforma AHA2 de <i>A. thaliana</i>	- 18 -
Fig. 7. Modelo propuesto para la conversión de un dímero inactivo de ATPasa a un hexámero activo por fosforilación y unión de la proteína 14-3-3.	- 20 -
Fig. 8. Procedimiento de purificación de las VMP.	- 33 -
Fig. 9. Evaluación de la purificación de vesículas de membrana plasmática de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre según la actividad específica de enzimas marcadoras de diferentes endomembranas.	- 40 -
Fig. 10. Estimación del enriquecimiento de membrana plasmática en las distintas fases de purificación de las vesículas de membrana plasmática a partir de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0.	- 41 -
Fig. 11. Ultraestructura de las VMP provenientes de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 42 -
Fig. 12. Fenotipo de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y de las líneas, <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> expuestas al inductor.	- 44 -
Fig. 13. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT en la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> sobre la actividad de la ATPasa de H ⁺ insensible a inhibidores de la membrana plasmática a diferentes tiempos de exposición al inductor.	- 46 -
Fig. 14. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT sobre la cantidad de ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática en <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y de las líneas mutantes a diferentes tiempos de exposición al inductor.	- 48 -
Fig. 15. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT en la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> sobre la cantidad de proteína 14-3-3 en la membrana plasmática.	- 49 -

Fig. 16. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT sobre acidificación del sistema de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana*..... - 51 -

Fig. 17. Modelo que explica el efecto de esfingolípidos complejos y sus precursores en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática..... - 61 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Localización anatómica de la expresión génica de diferentes isoformas de ATPasa H ⁺ en 5 especies distintas de plantas.....	- 21 -
Tabla II. Efecto de algunos compuestos anfífilos en la actividad de la ATPasa de H ⁺ de plantas. ..	- 26 -
Tabla III. Características de las plantas mutantes de <i>A. thaliana</i> proporcionadas por el grupo del Dr. E.B. Cahoon.	- 31 -
Tabla IV. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS [según Schägger y von Jagow 1987].	- 35 -
Tabla V. Soluciones para geles.....	- 35 -
Tabla VI.- Purificación de vesículas de membrana plasmática de hojas de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre.	- 39 -
Tabla VII. Actividad de la ATPasa de H ⁺ de VMP de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con modificación en el contenido de los niveles de esfingolípidos endógenos totales.....	- 45 -

ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi$** - Potencial eléctrico
- ΔpH** – Diferencia de pH
- Å** – Angstrom
- %C** – Proporción de entrecruzamiento del agente bisacrilamida-acrilamida
- %T** – Contenido total de acrilamida (peso/volumen)
- A** – Dominio de activación
- AAL** – Toxinas producidas por *Alternaria alternata*
- ACP** – Proteína acarreadora de acilos (Acyl carrier protein)
- AHA** – ATPasa de H⁺ de *Arabidopsis thaliana*
- ATP** – Adenosin trifosfato
- BCIP** – 5-Bromo-4cloro-3-indoifosfato
- BCL** – Base de cadena larga
- Brij** – Polioxietilenlauril éter
- BSA** – Albumina sérica bovina
- BTP** – Bis-Tris-propano
- C6** – Ceramida C6, *N*-hexanoil-D-esfingosina
- C16** – Ceramida-C16, *N*-palmitoil-D-esfingosina
- C18/20** – Diacilglicerol, 1-estearil-2-araquidonoil-*sn*-glicerol
- CERT** – transportador de ceramida, (ceramide transport)
- CCCP** – Carbonilcianida-*m*-clorfenilhidrazona
- CDF** – Citidindifosfato-diacilglicerol
- CHAPS** – Desoxicolato sódico, colato sódico, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
- COP** – Complejo de proteínas de cubierta, (Coat protein complex)
- DDR** – Danielli-Davson-Robertson
- DEAE** – Dietilaminoetil
- DEX** – Dextran
- DGA** – Diacilglicerol
- DGDG** – Digalactosil diacilglicerol
- DIC** – Contraste de interferencia diferencial
- DIG** – Dominios enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergente
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DRM** – Membranas resistentes a la solubilización por detergente no iónico
- DTT** – *DL*-ditiotreitól
- EDTA** – Ácido etilendiaminotetracético
- ER** – Retículo endoplásmico
- F** – Fosfatasas
- FB1** – Fumonisina B1
- FM** – Fracción microsomal
- GIPC** – Glucosil inositol fosforilceramidas
- Gln** – Glutamina
- Glu** – Glucosa
- GluA** – Glucosamina
- GluN** – *N*-glucosa
- GluNac** – *N*-acetilglucosamina
- GPI** – Glucosilfosfatidilinositol
- HEPES** – *N*-[2-hidroxietil] piperazina-*N'*-[2-ácido etanosulfónico]
- HMG-CoA** – 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
- HMO** – Homogenado
- Ino** – (1-P)-inositol-1-fosfato
- L** – Fase inferior, (lower phase)
- lo** – Fase líquida ordenada
- Lys** – Lisina
- M** – Cruce transmembranal
- MES** – Ácido 2-[*N*-morfolino] etanosulfónico

MF Mezcla de fases	SAT – Esfinganina <i>N</i> -aciltransferasa
MGDG – Monogalactosil diacilglicerol	SDS – Dodecil sulfato de sodio
MIT – Mitocondria	SERCA – ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
MOPS – Ácido 3-[<i>N</i> -morfolino]propanosulfónico	SF – Sistema de fases
MP – membrana plasmática	SL – Sufoquinovosil diacilglicerol
Mr – Masa relativa	SN – Esfinganina, dihidroesfingosina
N – Dominio donde se une el nucleótido ATP	So – Esfingosina, <i>D,E</i> -esfingo-4-enina
N – <i>Nicotiana</i>	SPT – Serina palmitoiltransferasa
Na₃MoO₄ – Ortomolibdato de sodio	T – tonoplasto
Na₃N – Azida de sodio	TBS – Amortiguador salino con Tris
Na₃VO₄ – Ortovanadato de sodio	tej – tejido
NADPH – Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato	TEMED – <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina
NBT – Cloruro de 2,2'-bis(4-nitrofenil)-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difetileno) ditetrazolio, (Nitroblue tetrazolium chloride)	Tris – 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
ORF – Marco de lectura abierto	Triton X – Polioxietilen- <i>p</i> -isooctifenil éter
P. – <i>Phaseolus</i>	TTBS – Amortiguador salino con Tris y Tween 20
P – Dominio de fosforilación	TX100 – Triton X-100
PA – Ácido fosfatídico	Tyr – Tirosina
PC – Fosfatidilcolina	U – Fase superior, (upper phase)
PE – Fosfatidiletanolamina	uORF – Marco de lectura abierta corriente arriba, (upstream open reading frame)
PEG – Polietilenglicol	V_{max} – Velocidad máxima
PG – Fosfatidilglicerol	VPM – vesículas de membrana plasmática
PhS – Fitoesfingosina, (4-hidroxiesfingosina)	
P_i – Fosfato inorgánico	
PI – Fosfatidilinositol	
PIPES – Fenilmetilo-sulfonilo fluorado	
Pma – ATPasa de H ⁺ de levadura	
PS – Fosfatidilserina	
PVDF – Polivinildifloruro	
PVP – Polivinilpirrolidona	
R – Dominio de regulación	
RE – Retículo endoplásmico	
RNAi – Ácido ribonucleico de interferencia	
RNA_m – Ácido ribonucleico mensajero	

RESUMEN

La ATPasa de H⁺ (EC 3.6.3.6) es una enzima transmembranal de la membrana plasmática (MP) que es clave para la célula vegetal, ya que de ella dependen los procesos de elongación celular, transporte de nutrientes, apertura y cierre de estomas y regulación de pH intra y extracelular [Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Al ser una proteína transmembranal, su actividad es susceptible de modificarse por el entorno lipídico. Al respecto, existen reportes en la literatura que indican que diferentes glicerolípidos y esteroides membranales, así como detergentes, modifican positiva o negativamente su actividad [Brauer y Tu 1989, Sandstrom y Cleland 1989, Cooke *et al* 1994, Gomès *et al* 1996, Grandmougin-Ferjani *et al* 1997]. En cuanto a los esfingolípidos, otro grupo de lípidos de membrana, hay algunas evidencias en levadura acerca del requerimiento de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena larga para el transporte de la ATPasa de H⁺ a la MP [Gaigg *et al* 2005, Gaigg *et al* 2006, Toulmay y Schneider 2007]. En cuanto a la ATPasa H⁺ de plantas, hay varios reportes en diversos tejidos vegetales que la ubican en balsas lipídicas, mismas que están enriquecidas en esfingolípidos y esteroides [Mongrand *et al* 2004, Shahollari *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Morel *et al* 2006, Laloï *et al* 2007, Lefebvre *et al* 2007]. Sin embargo, hasta el momento no hay ningún registro que indique que la ATPasa de H⁺ de la MP de plantas requiera de esfingolípidos para su función o de cómo estos lípidos podrían afectar la catálisis de esta proteína.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de esfingolípidos endógenos sobre la actividad de la enzima. Con el propósito de tener un tejido vegetal con los niveles de esfingolípidos modificados, utilizamos plantas con el gene silenciado de la serina palmitoil transferasa (SPT). Para ello, utilizamos plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas *Atlcb2a-1* (homocigota para la inserción de T-DNA Salk-061472 en el gene *lcb2a*) y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (mutante *Atlcb2a* homocigota transformada con la construcción inducible *lcb2b-hairpin*). Estas plantas se han modificado genéticamente en la expresión de la enzima SPT, la cual contiene dos subunidades: una catalítica (LCB2) y una aparentemente de función regulatoria (LCB1). Al ser expuesta a un inductor (insecticida INTREPID F2, cuyo principio activo es la metoxifenazida), la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* no sintetiza a la subunidad catalítica de la SPT y, por lo tanto, no hay actividad enzimática que provea la formación de *nov* de la 3-cetoesfinganina como precursor inicial para la síntesis de esfingolípidos complejos [Chen *et al* 2006, Dietrich *et al* 2008].

Para el análisis de la actividad enzimática de la ATPasa de H⁺, primero se estableció un protocolo de purificación de vesículas de membrana plasmática (VPM), a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* de la línea silvestre. El análisis del grado de pureza utilizando tres diferentes criterios reveló la obtención de VPM de una pureza adecuada y posteriormente se procedió a realizar el aislamiento de VPM, a partir de la línea que exhibe niveles disminuidos de

esfingolípidos endógenos (*AtIcb2b hp/AtIcb2a* expuesta a la metoxifenazida) así como de sus respectivos controles (silvestre y la línea *AtIcb2a-1* sin y con metoxifenazida). Las VPM se obtuvieron a 0, 3, 6 y 7 días posteriores a la aplicación del inductor del silenciamiento del gene *atIcb2b* en la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a*. Se ha reportado que esta línea presenta un menor contenido de bases de cadena larga totales a los 7 días de exposición al inductor [Dietrich *et al* 2008].

Se encontró que la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* a los 6 y 7 días de exposición al inductor, mostró un fenotipo similar al ya reportado [Dietrich *et al* 2008] y un incremento en la actividad de la ATPasa de H⁺ del 55% con respecto a la actividad encontrada en las líneas silvestre y *AtIcb2a-1*. En estas condiciones, la cantidad de la enzima no se modificó a nivel de la membrana plasmática; así como tampoco se encontraron diferencias en los niveles de su proteína reguladora con respecto a los controles.

Con objeto de obtener otra evidencia de que la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* presentaba una mayor actividad de la ATPasa de H⁺, se recurrió a un ensayo fisiológico de acidificación, ya que al estar la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática más activa en la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a* al sexto y séptimo día de exposición del inductor, era de esperarse que extruiría más H⁺ al exterior celular durante la elongación radicular. El ensayo mostró un aumento en el grado de acidificación por parte de la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a*, en comparación con las líneas silvestre y *AtIcb2a-1*. Este dato corrobora de manera fisiológica la activación de la ATPasa de H⁺, por efecto de la disminución en el contenido de bases de cadena larga.

De acuerdo a lo anterior, el desbalance en los niveles de bases de cadena larga, causado por el silenciamiento del gene *AtIcb2b* en la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a*, resultó en un aumento del 55% en la actividad de la ATPasa de H⁺ con respecto a las líneas silvestre y *AtIcb2a-1*, que exhiben niveles normales de esfingolípidos. Por tanto, este trabajo constituye el primer reporte que sugiere la modulación de la ATPasa de H⁺ de plantas por los esfingolípidos de su entorno.

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática (MP) separa a las células y los compartimientos celulares del medio externo, pero es está sólo una de las muchas funciones en las que se ha visto que está involucrada [van der Rest *et al* 1995]. Para poder entender las funciones que desempeña es necesario entender su estructura y componentes.

I. Evolución del modelo de la estructura de la membrana plasmática.

1. Modelo de membrana hasta antes de 1900.

El conocimiento básico de los componentes de las membranas biológicas comenzó con observaciones de las películas de los lípidos en el siglo XVIII antes de Cristo, cuando los babilonios esparcían aceites sobre el agua para la adivinación. En 1770, Benjamín Franklin experimentó sobre la propagación de ondas, esparciendo aceite de oliva en un contenedor. En 1890, Lord Raleigh, realizó estudios de interacción de aceites con el agua, logrando medir el área en la cual se distribuye un volumen conocido de aceite, así como el grosor de la película de aceite formada. Agnes Pockels desarrollo un dispositivo para medir cuidadosamente el área de una película de aceite, se comunicó con Lord Raleigh y esté le ayudo a publicar sus resultados. Casi al mismo tiempo que Lord Raleigh, Charles Ernest Overton, basándose en estudios sobre el paso de moléculas no polares a través de la membrana de una célula, publicó una hipótesis preliminar, en la cual propuso que existían similitudes entre las membranas celulares y los aceites, y que ciertas moléculas, (lípidos) atravesaban la membrana disolviéndose en el interior de esta [Edidin 2003].

2. 1917, Irving Langmuir.

En 1917, Irving Langmuir implementó y mejoró el método de Pockels y logró medir de manera más precisa el área superficial ocupada por cantidades conocidas de aceite. Langmuir (1917) propuso que las moléculas de ácidos grasos formaban una monocapa, orientándose entre ellos de manera vertical y con las colas hidrocarbonadas lejos de la parte acuosa. Langmuir calculó el área por molécula lipídica y también demostró que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos son flexibles [Edidin 2003].

3. 1925, Gorter-Grendel.

En 1925, Gorter y Grendel hicieron la extracción lipídica de eritrocitos de seis especies diferentes de mamíferos y utilizando un dispositivo similar al de Langmuir, propusieron que toda el área superficial calculada para los lípidos de un solo eritrocito podía ser acomodada como una bicapa lipídica. A pesar de que cometieron varios errores experimentales, llegaron a la conclusión correcta [Edidin 2003, Singer 2004].

4. 1935, Danielli-Davson y 1959, Robertson.

El primer modelo de membrana aceptado de la estructura de una membrana biológica fue propuesto por Danielli y Davson en 1935. El modelo consistió básicamente en un emparedado de lípidos arreglados en forma de bicapa lipídica cubierto a ambos lados exteriores por proteínas. Basándose en estudios de microscopía electrónica de transmisión, en 1959 J.D. Robertson propuso una versión modificada del modelo de Danielli y Davson, el cual denominó unidad membranal, es decir, que todas las membranas celulares tenían estructura común. Robertson veía las membranas en forma trilaminar, consistiendo la imagen en dos líneas externas oscuras que él creía eran capas de proteínas y una región interna clara que consideró como la parte interna de lípidos [Edidin 2003].

5. 1966, Benson, Leonard-Singer y Wallach-Zahler.

En 1966, Benson publicó un modelo en el cual las cadenas poli peptídicas estaban dispersas y rodeadas por las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos al interior de la membrana, produciendo subunidades lipoprotéicas discretas que, empaquetadas una contra otra, constituían la membrana. Los lípidos no estaban dispuestos en la forma clásica, ya que estaban interrumpidos por la asociación con las cadenas de proteínas. Las cabezas polares de los lípidos y los residuos polares de las proteínas estaban en contacto con el agua en las dos superficies membranales, mientras que los residuos hidrofóbicos de las proteínas estaban localizados en el interior hidrofóbico de la membrana, lejos del contacto con el agua [Singer 2004].

También en 1966, Singer e independientemente Wallach y Zahler publicaron una versión preliminar del modelo de mosaico fluido [Lenard y Singer 1966, Wallach y Zahler 1966]. En estos trabajos, se menciona que los lípidos y las proteínas están arreglados de manera independiente en el plano de la membrana y en forma de mosaico [Singer 2004].

La difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la resonancia de espín electrónico demostraron que los lípidos membranales se encontraban en movimiento en el plano de la bicapa, es decir, la membrana parecía más un fluido que un sólido. Este trabajo fue realizado principalmente por los laboratorios de McConnell y Chapman en 1969. Ellos también mencionaron que los lípidos se encontraban distribuidos de manera asimétrica, lo cual indicaba que las dos monocapas de la membrana tienen composiciones diferentes de lípidos. Por otro lado, en 1970 se demostró la difusión rotacional y lateral de las proteínas de membrana por los laboratorios de Cone y Poo, así como el Frye y Edidin [Edidin 2003].

6. 1972, Singer y Nicholson. Modelo del mosaico fluido.

Bajo toda esta evidencia, en 1972, el modelo de unidad membranal de Danielli-Davson-Robertson (DDR) fue reemplazado por el modelo actual de mosaico fluido de Singer y Nicholson. Este modelo conserva la primera estructura básica de la bicapa lipídica propuesta por Gorter y Grendel (1925) y modificada por DDR. Sin embargo, ahora las proteínas que atravesaban la

membrana (proteínas transmembranales) flotaban dentro de la bicapa lipídica a diferencia del modelo anterior, en donde las proteínas formaban capas [Singer 2004].

7. 1980, Dinámica membranal.

Para la década de 1980, la MP se consideraba altamente dinámica, los lípidos y las proteínas podían flexionarse, rotar y difundir lateralmente en un fluido de dos dimensiones, La difusión de las proteínas y los lípidos estaban restringida por el cito esqueleto o por las altas cantidades de proteína en la membrana. Los lípidos que rápidamente rodeaban a las proteínas podían afectar a su función, que era una explicación al gran número de lípidos distintos que están presentes en una sola membrana [Edidin 2003].

Sin embargo, se presentaron evidencias de que la mayoría de los lípidos membranales podían ser inmovilizados en zonas específicas y presentar tiempos translacionales mucho más largos que aquellos que se incorporaban con sondas moleculares. Así, se tenían mezclas de lípidos organizados en pequeños dominios y en el resto de la membrana había lípidos desorganizados. La existencia de estas zonas que se formaban en la MP no se explicaba fácilmente por el modelo de mosaico fluido, lo cual creó una gran controversia acerca de la existencia de llamadas balsas (lipídicas) [Jain y White 1977].

8. 1990, Balsas lipídicas y en la actualidad...

Por tanto, en la década de 1990 surgió el concepto de que en la MP estaban contenidos ciertos “parches” de lípidos cuyas propiedades físicas diferían del promedio de lípidos de la MP. Además, los dominios lipídicos resolvían ciertos problemas de tráfico vesicular, como los presentados en la distribución preferencial de proteínas en células epiteliales de mamíferos hacia la zona apical de la MP. Así, el modelo de balsa lipídica (lipid raft) proponía que, al ser distribuidos los lípidos estos se agregaban en una balsa, en donde había abundancia de colesterol y esfingolípidos [Simon e Ikonen 1997].

Al parecer, las fuerzas principales que promueven la formación de balsas lipídicas es la interacción lípido-lípido. Los esfingolípidos se asocian unos con otros a través de sus cabezas de carbohidratos y su larga cadena hidrocarbonada predominantemente saturada, mientras que los esteroides sirven para llenar los espacios que quedan entre los esfingolípidos [Simons e Ikonen 1997]. Una de las principales evidencias que hay de la existencia de balsas lipídicas son las membranas resistentes a la solubilización con detergente (DRM por sus siglas en inglés). En plantas, se ha reportado la evidencia de DRM en *Nicotiana tabacum* [Peskan *et al* 2000, Mongrand *et al* 2004, Morel *et al* 2006, Roche *et al* 2008], *Arabidopsis thaliana* [Shahollari *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Laloi *et al* 2007, Kierszniowska *et al* 2008, Lin *et al* 2008, Minami *et al* 2009], *Allium porrum* [Laloi *et al* 2007] y *Medicago truncatula* [Lefebvre *et al* 2007]. Además, en la actualidad un gran número de métodos bioquímicos, inmunológicos y biofísicos proveen evidencia de su existencia [Bhat y Panstruga 2005]. A las balsas lipídicas se les han atribuido muchos

eventos celulares como procesos de transducción de señales, secreción polarizada, transporte a través de membrana, organización del cito esqueleto, apoptosis y como puerta de entrada a organismos patógenos [Simons y Toomre 2000, Bhat y Panstruga 2005].

Además del modelo de balsas lipídicas, ya en los tiempos actuales también se han estudiado otras formas de arreglo heterogéneo de la MP, entre los cuales se encuentran las caveolas [Lommerse *et al* 2004]. Por diversos estudios, se conoce que las caveolas están implicadas en diferentes funciones celulares como son el transporte de colesterol, la endocitosis y la transducción de señales [Kurzchalia y Parton 1999, Kenworthy 2002, Lommerse *et al* 2004].

Otro tipo de estructura que proporciona heterogeneidad a la membrana plasmática es la red de actina asociada a la MP. El modelo llamado “barda del cito esqueleto” propone que el movimiento de las proteínas transmembranales está confinado a ciertas microrregiones, debido a que el cito esqueleto contiene filamentos de actina unidos a la MP que forman una barrera o barda que impide el desplazamiento de las proteínas transmembranales a otras regiones de la MP [Leitner *et al* 2000, Vereb *et al* 2003, Lommerse *et al* 2004].

II. Lípidos de la membrana plasmática de plantas.

La composición de los lípidos de la MP es característica de cada especie, tejido y del tipo de células. Está claro que las células tienen mecanismos para controlar los tipos de lípidos y su distribución no aleatoria entre los organelos celulares, así como entre las dos capas de la MP [Holthuis y Levine 2005, van-Meer 2005], ya que una distribución o metabolismo impropios puede tener serias consecuencias para las células y los organismos [Maxfield y Tabas 2005].

Por definición, los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos. Los lípidos de las membranas son macromoléculas que tienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica. Una de las propiedades más importantes de los lípidos, desde el punto de vista biológico, es su hidrofobicidad. Esta propiedad, dependiendo del tipo de lípido de que se trate, se debe a la estructura de los ácidos grasos, las bases esfingoideas o los anillos heterocíclicos. Así, los tres principales tipos de lípidos en la MP son los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides [Nelson y Cox 2006].

Una de las primeras funciones de los lípidos en las células es formar una barrera impermeable en forma de bicapa lipídica. Esta bicapa lipídica, en los seres vivos consiste de lípidos polares, principalmente glicerolípidos.

1. Glicerolípidos.

En las membranas biológicas, se encuentran dos grupos estructuralmente distintos de glicerolípidos: fosfoglicerolípidos (fosfolípidos), los cuales contienen fosfato en su grupo polar y los glucoglicerolípidos (glucolípidos) que contienen grupos carbohidratos en el grupo polar.

A. Estructura.

Los glicerolípidos son los lípidos más abundantes en las membranas de plantas, bacterias y animales. Una molécula de glicerolípidos está constituida por cuatro componentes, un ácido graso, un esqueleto al que se unen los ácidos grasos, generalmente glicerol, un fosfato y un alcohol unido al fosfato (Fig. 1) [Stryer *et al* 2003, Nelson y Cox 2006].

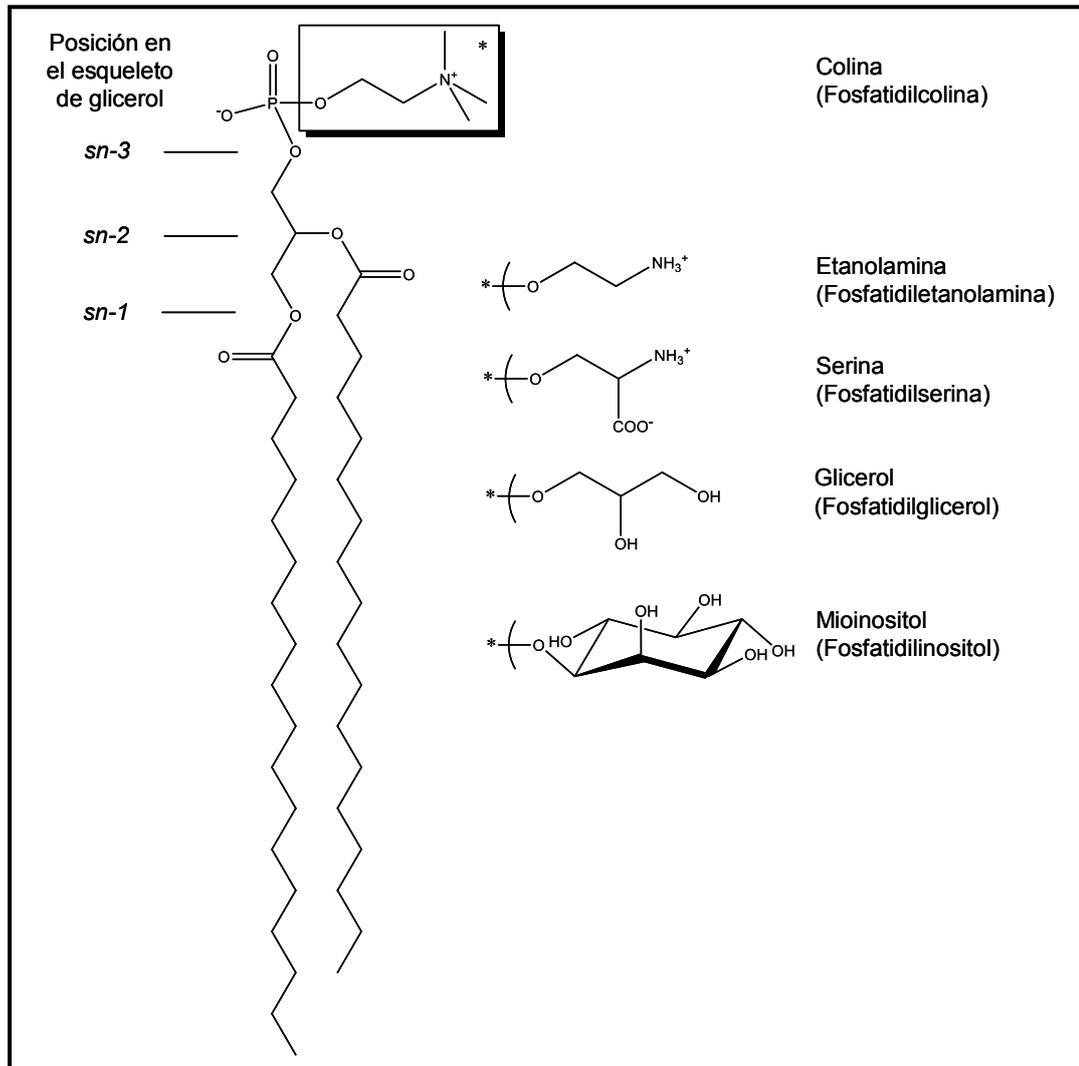


Fig. 1. Estructura de los lípidos con base en el glicerol y el fosfato. * Sustitución por los diferentes grupos mostrados [Modificado de Vance y Vance 2002].

B. Biogénesis.

El esqueleto del glicerol se deriva de la dihidroxicetona fosfato, la cual es un derivado de la glucólisis. En muchas plantas el glicerol se sintetiza directamente a partir de la dihidroxicetona fosfato por la acción de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Diferentes isoformas de esta enzima están presentes en *Arabidopsis thaliana* y se han localizado en la mitocondria y los cloroplastos. Otra ruta alternativa para la síntesis de glicerol es la conversión secuencial de la dihidroxicetona fosfato a gliceraldehído-3-fosfato por la triosa fosfato isomerasa, una desfosforilación posterior y

una reducción para obtener glicerol, puede ser fosforilado por la glicerol cinasa para producir glicerol-3-fosfato [Nelson y Cox 2006].

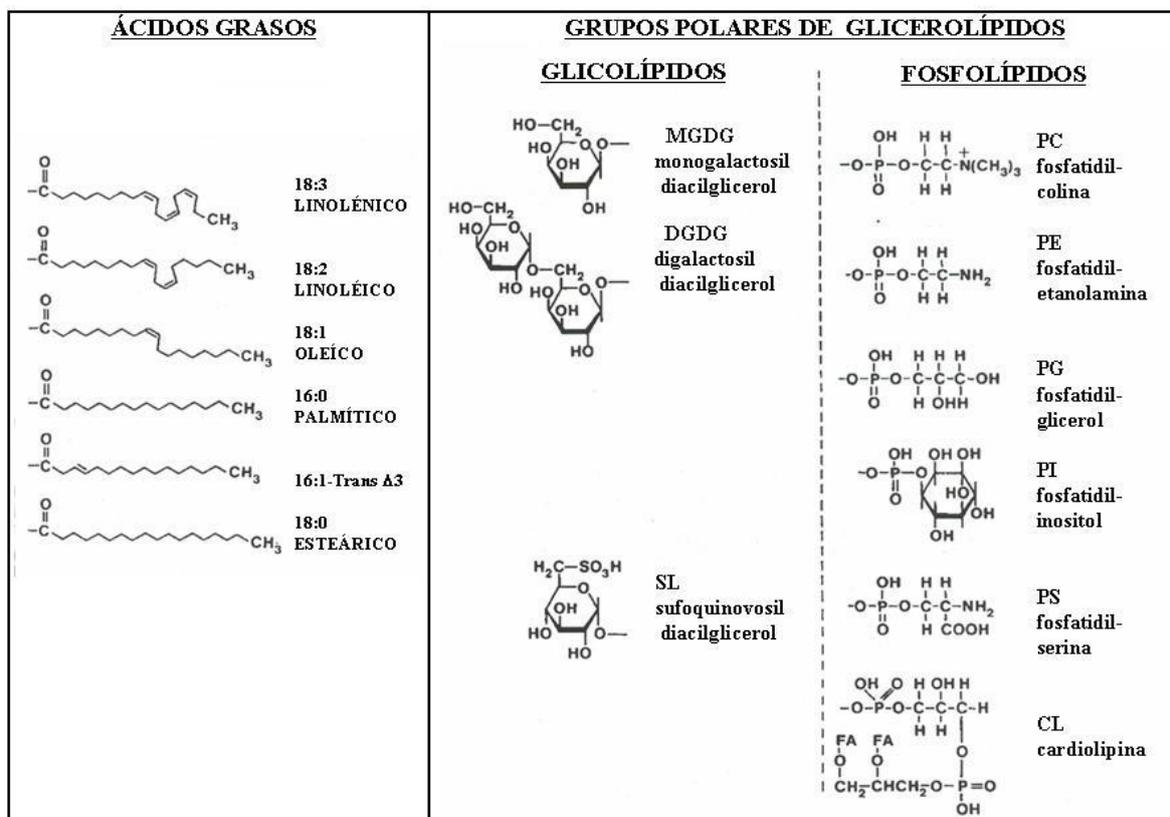


Fig. 2. Estructura de los principales ácidos grasos y grupos polares de glicerolípidos de las membranas celulares de plantas. FA: Fatty acid (Ácido graso) (Modificada de Ohlrogge y Browse 1995).

El cloroplasto es el sitio en donde mayoritariamente se lleva a cabo la biosíntesis de *novo* de los ácidos grasos en plantas. El mayor producto de los cloroplastos lo constituyen ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono, estos últimos son insaturados. Estos ácidos grasos se unen al glicero-3-fosfato en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa y la ácido lisofosfatídico aciltransferasa produciéndose finalmente ácido fosfatídico [Vance y Vance 2002, Ohlrogge y Browse 1995].

En el retículo endoplásmico (RE), el otro lugar donde se sintetizan los glicerolípidos, los ésteres de acil-CoA sirven como donadores de acilo para la acilación del glicerol-3-fosfato. Los ácidos grasos incorporados en el RE se originan en los cloroplastos, donde son liberados de los ésteres de la proteína acarreadora de acilos (ACP por sus siglas en inglés) por la acil-ACP tioesterasa y son subsecuentemente re-esterificados a Coenzima A (CoA) por las acil CoA sintetetas después de ser exportados de los cloroplastos.

Los glicerolípidos en plantas son sintetizados a partir del ácido fosfatídico siguiendo dos rutas diferentes, la ruta de diacylglicerol y la ruta del citidindifosfato-diacylglicerol (CDF-diacylglicerol). De estas dos vías se desprenden los dos tipos de lípidos predominantes en plantas, los glicerolípidos y los fosfolípidos (Fig. 2) [Ohlrogge y Browse 1995].

2. Esfingolípidos.

Los esfingolípidos son constituyentes ubicuos de las células eucariotas y han sido investigados intensivamente en mamíferos y levaduras por décadas. Se han explorado aspectos recientemente de la bioquímica de esfingolípidos en plantas. A la fecha, los progresos han llevado a cabo la determinación de la estructura y la ocurrencia de los esfingolípidos en los diferentes tejidos de la planta; en la caracterización de los pasos enzimáticos involucrados en su síntesis y recambio, además de identificar la variedad de las funciones biológicas de estos lípidos en plantas [Lynch y Dunn 2004, Markham *et al* 2006, Markham y Jaworski 2007].

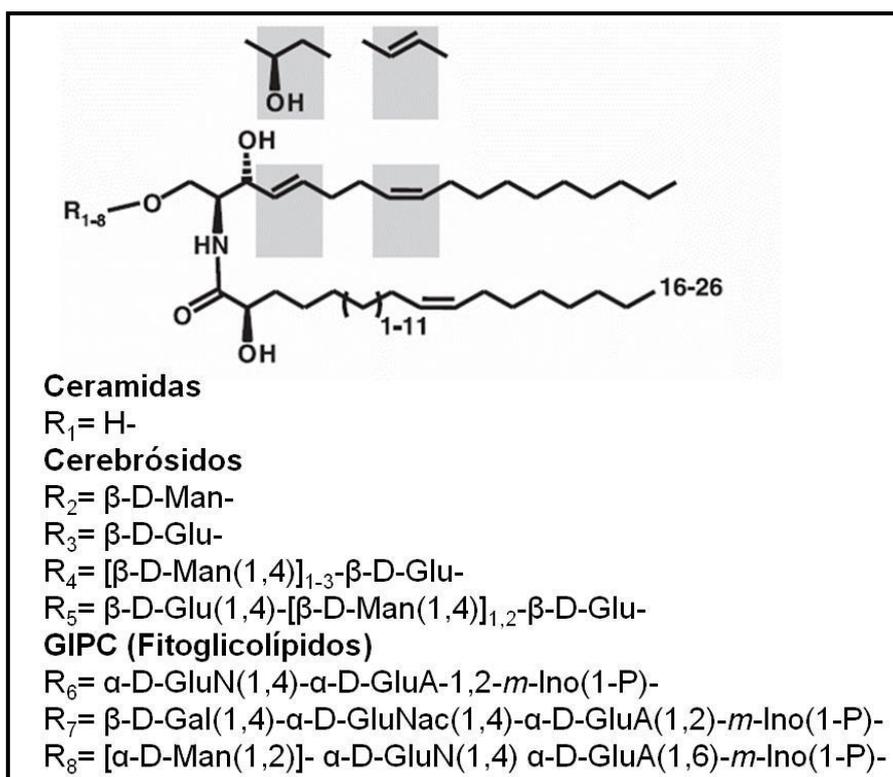


Fig. 3. Estructura de los esfingolípidos encontrados en plantas. Los esqueletos de ceramida en los esfingolípidos en plantas son altamente variables. Su base de cadena larga puede tener cuatro posibles modificaciones (mostrado con fondo gris), que son, hidroxilación o (E)-desaturación en el carbono 4, y (E)- o (Z)- desaturaciones en el carbono 8, resultando en 7 bases de cadena larga frecuentes. Estas bases de cadena larga están unidas a 10 diferentes grupos de ácidos grasos, que a su vez varían en su α -hidroxilación, el largo de la cadena y en el grado de insaturación. Los cerebrósidos se forman por glucosilación del grupo hidroxilo en el carbono uno en la ceramida (R_1) dando paso a la β -D-glucosil y la β -D-manosilceramida ($R_{2,3}$). Los derivados glucosilados pueden ser alargados por adiciones secuenciales de más de tres residuos β -1,4-glucosilo ($R_{4,5}$). Los glucosil-inositol-fosforil-ceramidas (GIPC por sus siglas en inglés) aislados de hojas de tabaco (R_{6-7}) y granos de maíz (R_8) contienen un residuo de 1-fosfo-mio-inositol unido al carbono 2. Derivados adicionales glucosilos con más galactosilos, manosilos y fucosilos han sido aislados de R_{7-8} [Tomada de Sperling y Heinz 2003].

A. Estructura.

La estructura básica de los esfingolípidos encontrados en plantas (Fig. 3) está constituida por una base de cadena larga (BCL), que es un alcohol aminado de cadena hidrocarbonada larga (2-amino-1,3-hidroxiálcano), cuyo nombre común es esfinganina, y que puede estar saturada o insaturada (entre C₄ y C₅ ó entre el C₈ y C₉), que presenta un ácido graso de 14 a 26 átomos de carbono y que se encuentra *N*-acilado al grupo amino de la BCL [Dunn *et al* 2004]. En mamíferos la BCL más abundante es la esfingosina (d18:1) con una longitud de cadena de 18 átomos de carbono y un doble enlace con estereoquímica *E* entre los carbonos 4 y 5, mientras que en la levadura la BCL predominante es la fitoesfingosina (t18:0) una forma saturada e hidroxilada en la posición 4 de la esfingosina. En plantas las BCL principales son los isómeros 8-*E* y 8-*Z* de esfingina-4,8-dienina (d18:2) y 4-hidroxi esfingina-8-enina (t18:1) aunque fitoesfingosina y dehidroesfingosina (esfinganina, d18:0) son las BCL predominantes [Coursol *et al* 2005].

Adicionalmente, cuando un grupo polar se esterifica en la posición C₁ de la BCL se forma un esfingolípidos complejo [Merrill *et al* 1997]. Los tipos de esfingolípidos complejos más abundantes en mamíferos son la esfingomielina y los gangliósidos que presentan residuos de galactosa y ácido neuramínico (siálico) en su cabeza polar, mientras que las glucosil inositol fosforilceramidas (GIPCs) prevalecen en levadura [Dunn *et al* 2004, Sperling y Heinz 2003]. Los esfingolípidos predominantes en plantas son las glucosilceramidas (GlcCers) y glicofosfoesfingolípidos complejos, los cuales exhiben variabilidad en el número y arreglo de monosacáridos anclados a la cabeza polar del inositol [Sperling y Heinz 2003] y en los ácidos grasos unidos a la esfinganina.

B. Biogénesis.

La biogénesis de esfingolípidos inicia con la condensación de un Acil-CoA (principalmente palmitoil-CoA) y L-serina para dar paso a la 3-cetoesfinganina, reacción catalizada por la serina palmitoil transferasa (EC 2.3.1.50). La actividad de la serina palmitoil transferasa (SPT) está localizada en el RE. El segundo paso de la vía es la reducción con NADPH por la *D-eritro*-esfinganina: NADP⁺3-oxidoreductasa (EC 1.1.1.102) para dar esfinganina. Esta enzima se localiza en el lado citosólico del RE. En el siguiente paso, el grupo amino de la esfinganina es acilado para dar ceramida, donde interviene la esfinganina-*N*-aciltransferasa (EC 2.3.1.24) y se ha encontrado en algunas especies vegetales la presencia de la ceramida sintasa (EC 3.5.1.23), reportada como un posible paso de reutilización en la biosíntesis de ceramida. A diferencia de la esfinganina-*N*-aciltransferasa, la ceramida sintasa presenta menor actividad (<5%) que la esfinganina-*N*-aciltransferasa, medidas ambas en los mismos tejidos. Además, dos inhibidores de la esfinganina-*N*-aciltransferasa (Fumonisina B1 y toxina AAL) no afectan la actividad de la ceramida sintasa. Estas observaciones, junto con la menor actividad y especificidad de la ceramida sintasa, indican que la biosíntesis de ceramida en tejidos vegetales se lleva a cabo predominantemente por la esfinganina-*N*-aciltransferasa y no por la ceramida sintasa, concluyendo que la ceramida sintasa

es una posible vía de salvamento de la biosíntesis de esfingolípidos [Guillas *et al* 2001, Schorling *et al* 2001].

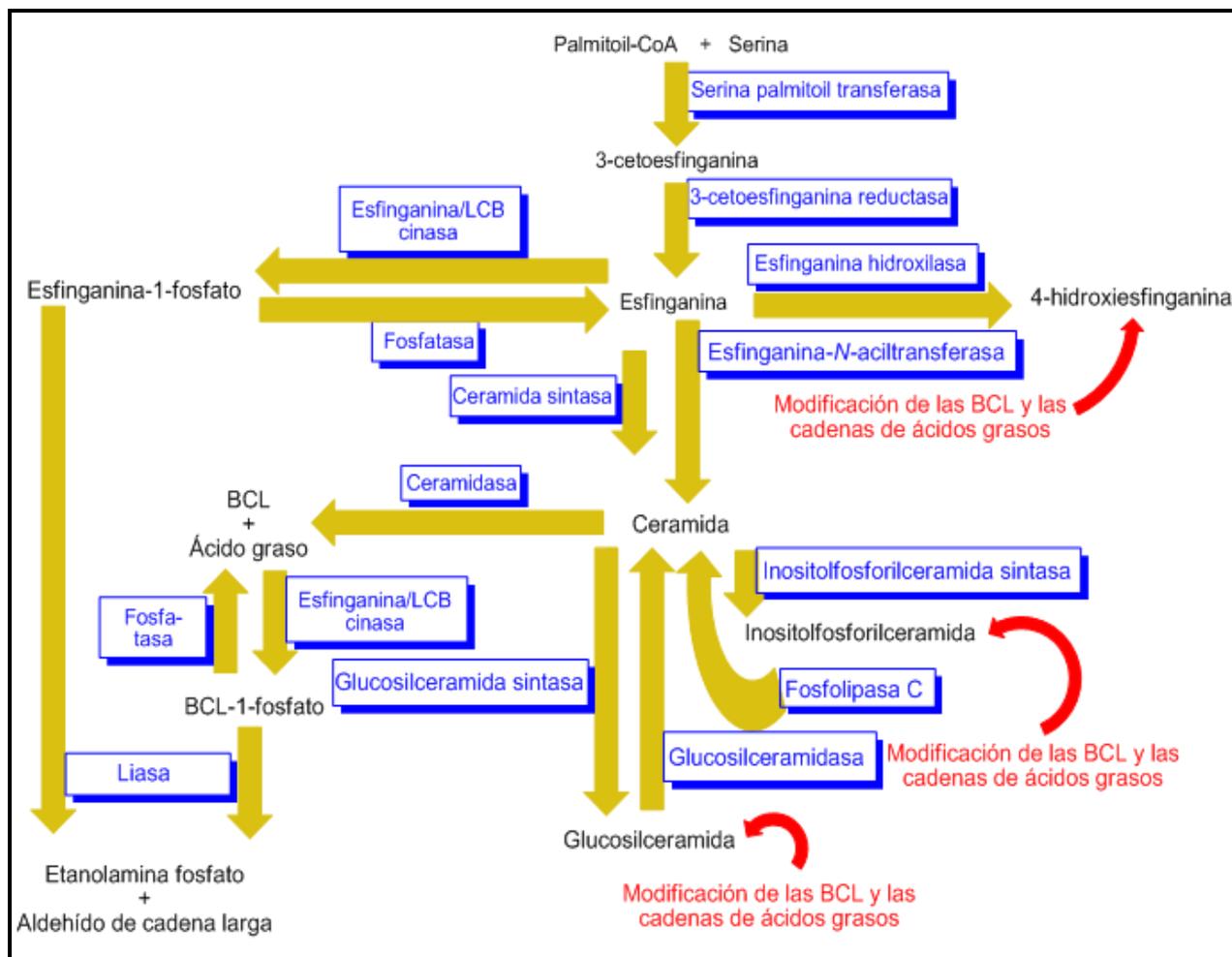


Fig. 4. Ruta de biosíntesis de esfingolípidos en plantas. Todas las reacciones enzimáticas (flechas amarillas) han sido demostradas *in vitro* a excepción de la escisión del inositolfosforilceramida por una fosfolipasa C específica, la defosforilación de una base de cadena larga fosforilada por una fosfatasa y la reacción de escisión de una base de cadena larga catalizada por una liasa. Las reacciones que participan en la desaturación e hidroxilación de las bases de cadena larga, así como la hidroxilación de grupos acilo, aparentemente ocurren después de la formación de la ceramida (flechas rojas) [Modificada de Lynch y Dunn 2004].

Una vez que se sintetiza el esqueleto de ceramida, tanto las BCL como los residuos acilaminados son modificados posteriormente por desaturaciones y/o hidroxilaciones para formar las especies moleculares comúnmente encontradas en plantas. Varios de los pasos enzimáticos requeridos para estas modificaciones se han demostrado *in vitro* usando lisados y preparaciones de membranas de plantas (Fig. 4).

C. Transporte a la membrana.

En la actualidad, nuestro conocimiento de cómo los lípidos y, más específicamente, los esfingolípidos están distribuidos dentro de las células es limitado. Una de estas limitaciones es que los lípidos carecen del tipo de señales que tienen algunas proteínas para alcanzar su destino. Más aún, las rutas del tráfico que aplican sobre los lípidos son diversas, lo que hace muy difícil trasladarlo a términos moleculares [Holthuis y Levine 2005].

Las propiedades de los lípidos (que los hacen esenciales para la estructura de la membrana) los incapacita para moverse libremente a través del citoplasma; esta restricción hace que los lípidos se tengan que mover en masa, por eventos de fusiones vesiculares o por medio de proteínas acarreadoras [Perry y Ridgway 2005].

El transporte de esfingolípidos no es al azar, pues su distribución es diferencial en el sistema membranoso de la célula, detectándose poco en mitocondria y RE y constituyendo entre el 20-35% de los lípidos de la membrana plasmática en células de mamíferos y de levadura [van- Meer y Lisman 2002].

Se han descrito dos mecanismos para el envío de la ceramida (una vez que se ha sintetizado) del RE al aparato de Golgi para su conversión en esfingolípidos complejos. El transporte no vesicular de ceramida es mediado por la proteína CERT (por “ceramide transport”). El transporte vesicular de ceramida en levadura está acoplado al envío de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol y en consecuencia no es una ruta regulada para la biosíntesis de esfingolípidos complejos.

Los esfingolípidos complejos son sintetizados en el lumen del aparato de Golgi y no tienen acceso a la cara citosólica, por lo que se sugiere que son selectivamente incluidos en membranas con movimiento anterógrado de acuerdo al modelo de maduración en cisterna, por tanto, el transporte neto anterógrado puede llevarse a cabo si se previene que los esfingolípidos dejen la cisterna en la cual ellos son sintetizados [Holthuis y Levine 2005].

D. Principales inhibidores de la biosíntesis.

La SPT es inhibida por la L-cicloserina, β -cloro-L-alanina, miriocina y por agentes anti fúngicos como la esfingofungina B y C [Zweerink *et al* 1992, Hanada 2003]. Un potente inhibidor de la esfinganina-*N*-aciltransferasa es la toxina Fumonisina B1 (FB1) de *Fusarium verticillioides*, ya que es un análogo estructural de la esfinganina [Merrill *et al* 2001, Lynch y Dunn 2004, Soriano *et al* 2005]. Otro análogo de la esfinganina, la toxina AAL, que es producida por el hongo *Alternaria alternata* es también un inhibidor de la esfinganina-*N*-aciltransferasa.

La esfingosina cinasa y la cinasa de bases de cadena larga es inhibida por la *N,N*-dimetilesfingosina [Lynch y Dunn 2004].

Las enzimas que sintetizan los esfingolípidos complejos a partir de ceramida en plantas están poco caracterizadas, en consecuencia, todavía no hay mucho conocimiento de sus posibles inhibidores.

3. Esteroles.

Estos lípidos pertenecen a la familia de los isoprenoides, ya que la conversión de farnesil difosfato a escualeno marca la conexión entre la biosíntesis de isoprenoides y la bifurcación en la ruta de biosíntesis de esteroides. Este compuesto es esencial para todas las células eucarióticas.

Los esteroides son componentes membranales y como tales regulan su fluidez y permeabilidad. Además, los esteroides también participan en el control de procesos metabólicos asociados a membrana, una función para la cual sólo unos cuantos esteroides en diversidad son requeridos. Más aún, los esteroides son precursores de una vasta serie de compuestos que están involucrados en importantes procesos celulares y de desarrollo en animales como hongos y plantas superiores [Hartmann 1998].

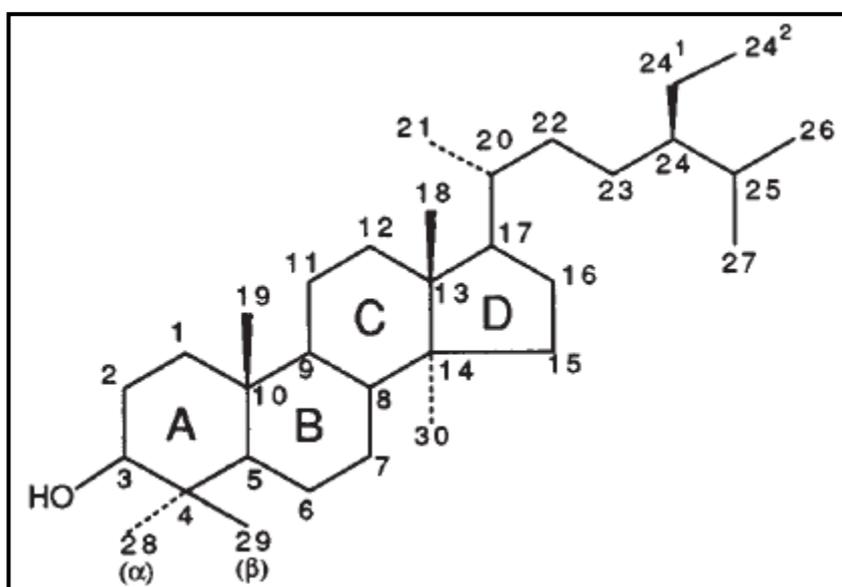


Fig. 5. Estructura básica de un esteroide con la numeración estándar de los carbonos de acuerdo a las recomendaciones de la convención IUPAC-IUB de 1989. Los carbonos C24¹ y C24² provienen de la S-adenosil-L-metionina y fueron previamente designados como C28 y C29. La estereoquímica del grupo alquilo es α . De acuerdo al sistema de nomenclatura formal, los dos metilos localizados en el C24 y el metilo en el C14 se enumeraran como C30, C31 y C32 respectivamente [Tomado de Moss 1989].

A. Estructura.

Esterol fue el nombre originalmente propuesto para describir un compuesto 3- β -monohidroxiado cuya estructura base es el sistema de anillos perhidro-1,2-ciclopentanofenantreno con sustituciones en los carbonos 10 y 13 y una cadena lateral que oscila entre 8-10 átomos de carbono [Hartmann 1998]. La nomenclatura de esteroides está basada en las recomendaciones de la IUPAC-IUB de 1989 [Moss 1989] (Fig. 5). En plantas, los esteroides están siempre presentes en mezclas, las variaciones estructurales provienen de diferentes sustituciones en la cadena lateral o el número de posiciones con doble enlace en el esqueleto tetracíclico [Nes 1977].

En muchas plantas superiores, los esteroides con grupos hidroxilo libres en la posición 3 β , también llamados esteroides libres, son los productos mayoritarios. Sin embargo, los esteroides también están presentes en conjugados con ácidos grasos como esteroides estériles ésteres o unidos en la posición β por un monosacárido, usualmente glucosa, para formar estéril glucósido [Hartmann 1998].

B. Biogénesis.

En plantas, la biosíntesis de esteroides representa una secuencia de 30 reacciones enzimáticas, todas asociadas a membranas [Nes 1977]. La ruta de biosíntesis está caracterizada por varios pasos restringidos exclusivamente a plantas, como la ciclización del óxido de escualeno a cicloartenol; la apertura del anillo 9 β , 19-ciclopropano del cicloeucalenol catalizada por la cicloeucalenol-obtusifol isomerasa. Todos los tejidos de las plantas son capaces de sintetizar sus propios esteroides. Muchas de las enzimas en la biosíntesis de escualeno están asociadas a las membranas de RE [Goldstein y Brown 1990], sin embargo, la participación de la MP en los pasos finales de biosíntesis no puede ser descartada [Hartmann y Benveniste 1987]. Los esteroides parecen ser muy estables por las evidencias que se tienen de la relación fosfolípido-esterol en las membranas senescentes [Duxbury 1991].

C. Transporte a la membrana.

Los esteroides son distribuidos a otros organelos por combinación de tráfico vesicular desde el RE hasta la MP y tráfico no vesicular mediado por proteínas, aunque este paso no está todavía bien dilucidado [Moreau 1998, Maxfield y Tabas 2005]. Los esteroides se encuentran enriquecidos en la MP, este enriquecimiento está probablemente determinado por su alta afinidad por los esfingolípidos y fosfolípidos [Holthuis y Levine 2005]. Si bien este es el principal esteroide en células animales [Nelson y Cox 2006], en levaduras lo es el ergosterol [van der Rest *et al* 1995] y en plantas los esteroides más abundantes son el campesterol, el estigmasterol y el sitoesterol [Bohn *et al* 2001].

D. Principales inhibidores de la biosíntesis.

Hay una amplia variedad de inhibidores de la vía a diferentes niveles y se pueden considerar dos principales tipos, dependiendo de sus blancos enzimáticos; los que actúan a nivel de la biosíntesis de escualeno y los que actúan a partir de la biosíntesis de cicloartenol.

El inhibidor más importante en la biosíntesis del escualeno es la lovastatina, que inhibe la HMG-CoA reductasa. Estudios de inhibidores en plantas se han llevado a cabo utilizando *N*-alquilmorfolinas y derivados de azoles que inhiben las enzimas cicloeucalenol-obtusifoliol isomerasa y la obtusifoliol 14-desmetilasa respectivamente [Rahier y Taton 1997].

III. Proteínas de la membrana plasmática.

Las proteínas participan muy activamente en los atributos funcionales de la MP [Petty 1993]. La composición proteica de membranas de orígenes diferentes varía más ampliamente que su composición lipídica, lo que refleja su especialización funcional [Nelson y Cox 2006].

Las proteínas son polímeros de aminoácidos. El mismo grupo de 20 aminoácidos es usado para la formación de todas las proteínas a través de su ordenamiento en diferentes posiciones. Las proteínas son grandes y complejas, por tanto, la gran cantidad de secuencias de aminoácidos es muy importante porque determina la estructura y función de las proteínas.

1. Tipos de proteínas asociadas a la membrana plasmática.

A. Proteínas periféricas.

Las proteínas periféricas son aquellas que están unidas a las membranas a través de interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno. La mayoría de las proteínas periféricas de la MP están unidas a la superficie de proteínas integrales, ya sea en la cara citosólica de la membrana o en la cara extracelular. También, pueden asociarse a las cabezas polares de los lípidos de la bicapa. Este tipo de proteínas pueden ser liberadas de las membranas con tratamiento relativamente suave que interfiere con la interacción electrostática o que rompe puentes de hidrógeno. Las proteínas periféricas pueden servir como reguladores de enzimas integrales y limitar su movilidad.

B. Proteínas integrales.

Las proteínas integrales pueden consistir de una simple subunidad o de grandes complejos compuestos de varias subunidades, con componentes adicionales no proteicos, como grupos prostéticos. Algunas proteínas integrales sólo tienen acceso a un lado de la MP, mientras que las proteínas transmembranales atraviesan la membrana una vez (proteínas monotópicas) o varias veces (proteínas politópicas) y tienen acceso a ambos lados de la misma [Raven *et al* 1992, Hopkins 1995, Singer 2004].

IV. Interacción lípido-proteína.

En décadas pasadas, los lípidos se consideraban impurezas a ser removidas en preparaciones purificadas de proteínas membranales. Sin embargo, este criterio ha cambiado, ya que se ha establecido que las proteínas membranales tienen un óptimo desempeño cuando están inmersas en su ambiente lipídico nativo [Gouaux y White 2001].

1. Importancia de los lípidos para la estructura y función de las proteínas de membrana.

En los últimos años, se ha sugerido que los cambios locales o temporales en la composición lipídica son potentes reguladores de los procesos celulares. Por tanto, la composición lipídica de la MP afecta claramente la estructura y la función de sus proteínas

[Dowhan *et al* 2004]. En la actualidad, hay varios ejemplos en la literatura sobre la relación de las proteínas membranales con su entorno lipídico, y qué tan necesario es éste para la función correcta de las proteínas [Lee 2004, Zhang *et al* 2005]. Por tanto, las proteínas membranales dependen de lípidos específicos desde su formación en el RE y envío posterior a su destino final, hasta su función y desempeño óptimo en el ambiente membranal [Lee *et al* 2002, Gaigg *et al* 2005, Gaigg *et al* 2006]. Lo cual sugiere que cualquier alteración en el ambiente lipídico en contacto con las proteínas vaya en detrimento de su actividad [Chung *et al* 2003, Barrantes 2004, Cohen *et al* 2005].

Así, se ha acumulado la evidencia acerca de la interacción de lípidos con proteínas en los ambientes membranales y se ha sugerido el concepto de que los lípidos son componentes integrales en la estructura de las proteínas membranales, que ayudan en su conformación, su función e inclusión en balsas lipídicas [Fantini 2003].

2. Principios generales de la interacción de los lípidos con las proteínas membranales.

Tres modos de contacto pueden ser distinguidos en las interacciones de los lípidos con las proteínas membranales. El primero es el caparazón anular de los lípidos unido a la superficie de la proteína, que se asemeja a la estructura de bicapa y media la relación entre la proteína y la bicapa lipídica [Datta 1987, Anderson y Jacobson 2002].

El segundo modo de contacto es el de las moléculas de lípidos que están inmersas en cavidades y hendiduras de la superficie proteica, frecuentemente observada por complejos proteicos multisubunitarios y ensamblajes multiméricos. Estas superficies de lípidos no anulares están típicamente presentes en interfaces de subunidades u oligómeros de proteínas.

El tercer modo lo constituyen pocos ejemplos de lípidos que se intercalan entre la proteína de la membrana o un complejo proteico membranal y que están en posiciones inusuales como por ejemplo que el grupo polar esté debajo del plano de la membrana y/o no esté perpendicular a la membrana. Estos lípidos integrales proteicos pueden tener la función de plegar y ensamblar a la proteína [Palsdottir y Hunte 2004].

3. Especificidad de la interacción lípido-proteína.

Frecuentemente, las cabezas de los lípidos no se resuelven por cristalografía de manera clara, aún a una alta resolución. Sin embargo, se ha visto que la distribución asimétrica de las cargas en las membranas determina la topología de la proteína membranal y coincide con el hecho de haber varios sitios de alta afinidad para lípidos. Los residuos que se han identificado que interaccionan con el grupo fosfodiéster en el lado negativo de la membrana son Arg > Lys > Tyr > His > Trp, Ser, Asn. Interacciones adicionales son provistas por Thr y Gln. En cuanto al lado positivo, aun cuando son ligandos con menos afinidad, se pueden enumerar a Tyr, Thr, Asn, Gln, His y Arg. Por tanto, se han tenido que hacer muchos refinamientos y deducciones en los cuales

se ha visto que el grupo fosfodiéster es el que mejor se puede visualizar en estas estructuras [Palsdottir y Hunte 2004].

Para la visualización de las cadenas laterales de los lípidos, se tienen aún más inconvenientes, ya que tal visualización es menor. Sin embargo, se ha establecido que las cadenas laterales están embebidas en hendiduras y ranuras de poca profundidad y la posición de las cadenas es estabilizada por fuerzas de van der Waals [Lange *et al* 2001]. También se ha visto que la atracción que ejerce la proteína sobre las cadenas laterales puede forzarlas a adquirir curvaturas que se desvían considerablemente de lo esperado para la concepción de fluidez, dispersión y movilidad de los componentes de la membrana plasmática.

Todas estas evidencias apoyan que la unión estrecha entre los lípidos y las superficies proteicas producen una integración sellada de la proteína a la membrana [Palsdottir y Hunte 2004].

V. La ATPasa de H⁺ de plantas y su interacción con los lípidos membranales.

La ATPasa de H⁺ se detectó por primera vez al final de la década de los setenta, aunque su existencia fue predicha antes por mediciones electrofisiológicas del potencial de membrana en *Neurospora crassa*. La ATPasa de H⁺ en plantas, acopla la hidrólisis de ATP (reacción exergónica) al transporte de protones a través de la MP (reacción endergónica, pues los protones se mueven termodinámicamente contrarios a su gradiente de concentración). Así, se crea una diferencia de pH (ΔpH) y de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) en la MP. Ambos son requeridos para el funcionamiento de transportadores secundarios, cuya actividad, por tanto, es directamente dependiente de la fuerza protón motriz [Baudouin y Boutry 1995, Morsomme y Boutry 2000].

1. Estructura y función.

La ATPasa de H⁺ comprende una subunidad catalítica de aproximadamente 100 kDa, cuya secuencia de aminoácidos se dedujo inicialmente del gene correspondiente. El análisis de la estructura secundaria predice que el polipéptido contiene 10 cruces transmembranales.

Hasta antes de que la ATPasa de H⁺ de plantas fuera cristalizada, la información de su estructura terciaria se había inferido gracias a la estructura cristalográfica de la ATPasa de Ca²⁺ con una resolución de 2.6 Å en cristales de dos dimensiones [Toyoshima *et al* 2000] y la de *Neurospora crassa* [Auer *et al* 1988] con una resolución de 8 Å. Estos datos, de acuerdo con evidencias bioquímicas, sugerían que la ATPasa de H⁺ de plantas tenía fracciones expuestas a ambos lados de la MP y que alrededor de un 70% estaba expuesta a la región citoplasmática, por tanto, una parte pequeña de la proteína está expuesta a la región extracelular. Con la publicación reciente de la estructura cristalográfica de la ATPasa de H⁺ de *A. thaliana* a una resolución de 3.6 Å [Pedersen *et al* 2007], se corroboran estos hechos, además de que dan luz sobre otros sitios involucrados en su función (Fig. 6).

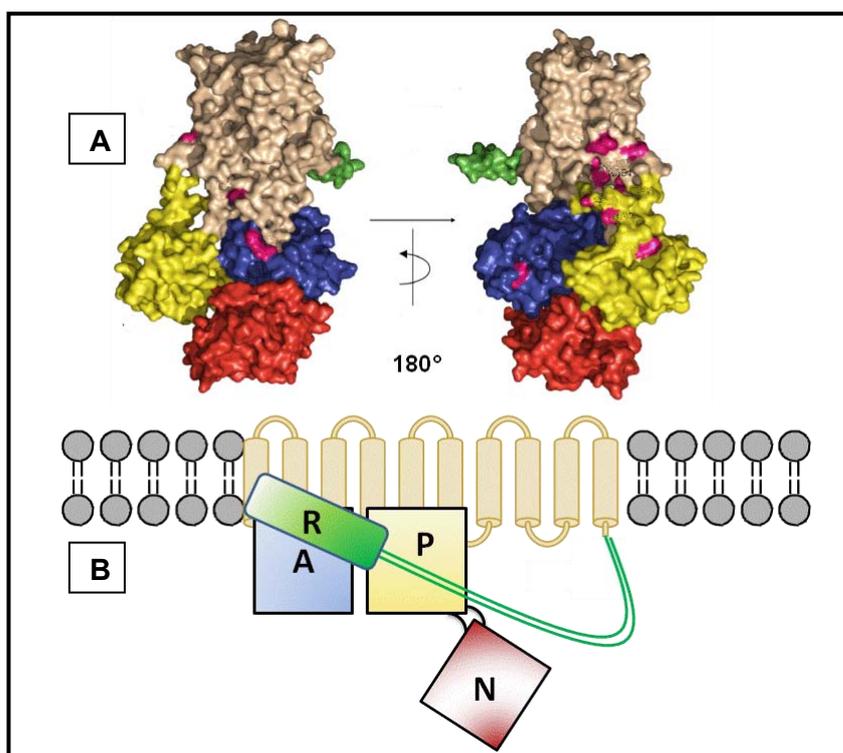


Fig. 6. Estructura cristalográfica de la ATPasa de H⁺, isoforma AHA2 de *A. thaliana*. **A.** Visualización de la ATPasa de H⁺. En café claro se muestra la región transmembranal, en azul el dominio de activación, en amarillo el dominio de fosforilación y en rojo el dominio de unión del nucleótido ATP. En verde se muestra un fragmento de la región reguladora y en rosa se muestran residuos que al ser mutados impiden la interacción de la región reguladora (carboxilo terminal) con los dominios de fosforilación y activación. **B.** Esquema de la ATPasa de H⁺ que muestra, teóricamente, la interacción de la región reguladora (en verde) con los dominios de fosforilación y activación de la ATPasa de H⁺ [Tomado de Palmgren 2001 y Pedersen et al 2007].

La estructura de la isoforma AHA2 de *A. thaliana* consiste de cuatro dominios claramente definidos: 10 cruces transmembranales nombrados como M1 a M10 y tres dominios citosólicos nombrados de acuerdo a su contraparte en la ATPasa de Ca²⁺ como el dominio de activación (A) que comprende la región amino terminal y la pequeña región citoplasmática entre los cruces transmembranales denominados M1 y M2 (residuos aminoacídicos del 12-57 y 129-233). Se ha propuesto que este dominio tiene una función de fosfatasa al momento de la liberación de PO₄³⁻ del residuo ASP329 [Serrano 1989]; el dominio de fosforilación (P) está unido a los cruces transmembranales denominados M4 y M5 y que tiene un residuo de aspártico que se fosforila durante la catálisis (residuos aminoacídicos 308-337 y 489-625), y el dominio donde se une el nucleótido ATP (N) el cual está unido directamente al dominio P y contiene al sitio de unión a ATP (residuos aminoacídicos del 338-488). Cabe señalar que el dominio de regulación (R), que comprende al carboxilo terminal en la estructura cristalográfica no logro resolverse, ya que la parte comprendida entre los residuos 858-948 no tienen una estructura definida en la forma activa de la proteína (Fig. 6).

Se ha visto que el cambio de ciertos residuos del dominio A inhibe la interacción del carboxilo terminal con la enzima donde el patrón que apareció era de un carboxilo terminal enroscándose alrededor del cuerpo de la bomba para interactuar con el dominio A en la parte superior de los segmentos M1 y M2. En esta posición, como se sugiere en la interpretación, se bloquea potencialmente la entrada de protones a los sitios transmembranales de unión y restringe la libre rotación del dominio A que es esencial para la función de transición entre el ciclo de bombeo de la enzima [Pedersen *et al* 2007].

En cuanto a la estructura cuaternaria de la proteína, se desconocía con certeza si la proteína puede formar algún tipo de arreglo oligomérico en la membrana. Los acercamientos experimentales para demostrar su estado oligomérico, con la enzima semipurificada, se hicieron por medio de cinética enzimática, entrecruzamiento químico y determinando su masa molecular [Briskin *et al* 1985, Briskin y Niesman-Reynolds 1989]. En estas primeras aproximaciones, se observó que los detergentes y lípidos que se utilizaban en la solubilización y reconstitución de la ATPasa de H⁺ propiciaban su oligomerización y por tanto, resultaba difícil determinar si fisiológicamente la ATPasa de H⁺ presentaba un arreglo oligomérico [Ramos *et al* 1994, Roberts *et al* 1995, Roberts y Beaugé 1997]. En años recientes, se determinó por tres diferentes aproximaciones experimentales, que la ATPasa de H⁺ pasa de ser un dímero, estado donde la enzima presenta baja actividad y no está fosforilada, a ser un hexámero, estado de alta actividad donde la enzima está fosforilada y unida a la proteína reguladora 14-3-3 [Kanczewska *et al* 2005]. Se encontró que, en el dímero de la ATPasa de H⁺, la región final del carboxilo terminal, que comprende 52 aminoácidos, se orienta de forma antiparalela y divergente con respecto al carboxilo terminal de la otra enzima y con una separación de 60 Å entre ambas regiones. Así, al fosforilarse la enzima e interactuar con la proteína reguladora 14-3-3 se impide que un dímero de proteína 14-3-3 interactúe con ambos carboxilos terminales de un solo dímero de ATPasa. Por tanto, al unirse el dímero de 14-3-3 a un carboxilo terminal de un dímero de ATPasa la otra parte del dímero de 14-3-3 interactuará con el carboxilo terminal de un dímero de ATPasa adyacente favoreciéndose así la formación de un hexámero (Fig. 7) [Ottmann *et al* 2007]. También se determinó que la biosíntesis de ceramida es necesaria para formar complejos oligoméricos de la ATPasa de H⁺ de levadura cuando es sintetizada en el RE [Lee *et al* 2002]. La ATPasa de H⁺ se encuentra en todos los tejidos celulares de las plantas, sólo que no se encuentra en la misma cantidad, debido a la función específica de cada grupo celular y a las características específicas de las diferentes isoformas de la enzima.

Una de las principales funciones es la elongación celular, la cual es una función fisiológica básica para el crecimiento y desarrollo de las semillas. En este caso, la ATPasa de H⁺ produce una acidificación del medio extracelular, incrementando la extensibilidad de la pared celular, permitiendo la entrada de agua y aumentando el volumen celular [Antipova *et al* 2003].

Otras funciones de la ATPasa de H^+ en la célula están relacionadas con la activación de transportadores secundarios debido a que esta enzima establece un ΔpH y un $\Delta \Psi$ entre el interior y el exterior de la MP.

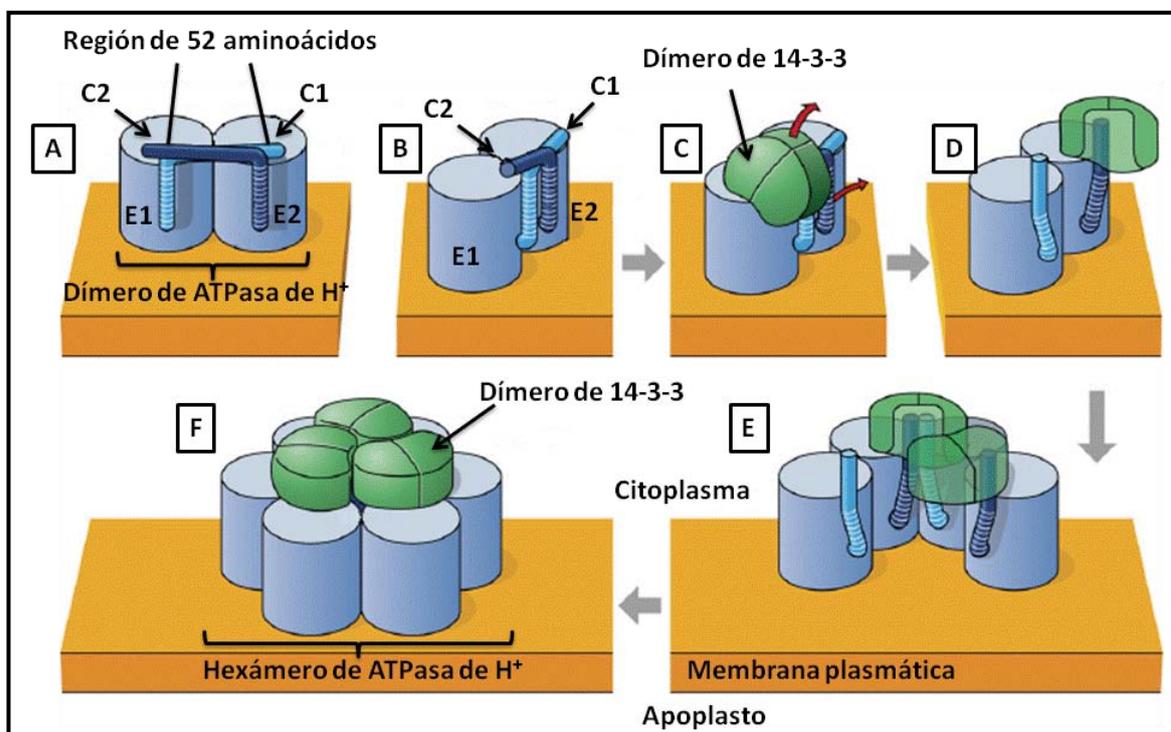


Fig. 7. Modelo propuesto para la conversión de un dímero inactivo de ATPasa a un hexámero activo por fosforilación y unión de la proteína 14-3-3. A y B. Dímero de ATPasa mostrado en el estado inactivo. Los carboxilos terminales de ambas ATPasas están en azul oscuro y azul claro. **C-E.** Después de la fosforilación de los carboxilos terminales en el penúltimo residuo de Thr, la proteína 14-3-3 (verde) se une a ellos. La unión entre la ATPasa y la proteína 14-3-3 induce cambios conformacionales (flechas rojas). En **D** se puede ver como la proteína 14-3-3 quita los contactos intermoleculares entre las regiones de los carboxilos terminales, resultando en **E**, una conjunción de dos dímeros de ATPasa. **F.** Después de la unión del tercer dímero de 14-3-3, se completa el hexámero activo. (Tomado de Ottmann et al 2007).

El floema, que sirve para transportar nutrientes a través de grandes distancias en el interior de la planta, se ha reportado con una alta concentración de la enzima por medio de inmunodetección con anticuerpos específicos contra la ATPasa de H^+ [Villalba *et al* 1991]. La supresión de la isoforma Pma4 en *Nicotiana plumbaginifolia* resultó en una incapacidad para exportar azúcares de las hojas a las raíces y hojas en desarrollo [Zhao *et al* 2000]. Gracias al bombeo de protones, la ATPasa de H^+ ayuda al cierre y apertura de estomas [Becker *et al* 1993, Kinoshita y Shimazaki 1999] y a absorber nutrientes en las raíces [Perets-Soler *et al* 1990].

Se ha demostrado que las plantas sometidas a un estrés osmótico responden activando a la ATPasa de H^+ , lo que trae en consecuencia la adaptación osmótica. Además evidencia en la literatura demuestra que la ATPasa de H^+ está implicada en varios fenómenos relacionados con la turgencia de la célula [Baudouin y Boutry 1995, Sondergaard *et al* 2004].

Tabla I. Localización anatómica de la expresión génica de diferentes isoformas de ATPasa H⁺ en 5 especies distintas de plantas. La expresión génica fue seguida por northern blot, hibridación in situ o detección histoquímica de β -glucuronidasa. La expresión génica estuvo presente (+), ausente (0) o no determinada (n.d.). Esta tabla no toma en cuenta el nivel de expresión que puede diferir entre los distintos genes. (Tomado de Arango et al 2003).

Número de acceso	Planta	Gene	Raíz	Tallo	Hoja	Flor
P20649	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AHA1	+	+	n.d.	n.d.
P19456	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AHA2	+	0	0	0
P20431	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AHA3	+	+	+	+
Q9SU58	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AHA4	+	0	0	+
Q9SAJ1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AHA9	0	0	0	+
Q43128	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AHA10	0	0	0	0
P22180	<i>Lycopersicon esculentum</i>	LHA1	+	+	+	+
AAD55399	<i>Lycopersicon esculentum</i>	LHA2	+	+	+	+
Q96578	<i>Lycopersicon esculentum</i>	LHA4	+	+	+	+
Q08435	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA1	+	+	+	+
Q42932	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA2	+	+	+	+
Q08436	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA3	+	+	+	+
Q03194	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA4	+	+	+	+
Q9SWH2	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA6	0	0	+	+
Q9SWH1	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA8	0	+	+	0
Q9SWH0	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PMA9	+	+	0	+
Q43106	<i>Phaseolus vulgaris</i>	BHA1	+	n.d.	+	n.d.
Q43271	<i>Zea mays</i>	MHA2	+	+	+	+

2. Biogénesis y expresión diferencial de isoformas.

Por evidencias en la literatura sobre la ATPasa de H⁺ de levadura, se ha visto que la biogénesis de la isoforma Pma1 empieza en el RE, donde es plegada inmediatamente después de ser sintetizada para evitar la acción proteolítica sobre ella [Chang *et al* 1993]. Posteriormente es “empaquetada” en vesículas COP II y transportada a la MP a partir del aparato de Golgi [Sze *et al* 1999, Ferreira *et al* 2001, Lefebvre 2004]. En años recientes se ha visto que la biosíntesis es dependiente de los lípidos de cadena larga [Gaigg *et al* 2005] y requiere de su inclusión en balsas lipídicas para el transporte a la membrana plasmática [Bagnat *et al* 2001]. Además, la localización subcelular de la ATPasa de H⁺ se considera exclusiva de la membrana plasmática [Arango *et al* 2003].

Se ha visto, por ensayos inmunológicos y de hibridación *in situ* de los ARNm, que las isoformas de la ATPasa de H⁺ se acumulan diferencialmente en tejidos de la planta como la raíz,

la epidermis y el floema (Tabla I), expresando diferencias en la actividad catalítica y en la regulación [Portillo 2000, Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Por ejemplo, en tabaco se ha reportado que la isoforma Pma1 se expresa en múltiples tejidos dentro de los que se encuentran incluso las células guarda de la epidermis [Sze *et al* 1999]. Las propiedades funcionales de las isoformas individuales han sido determinadas expresando genes AHA (isoformas de *A. thaliana*) en levadura. En general, las propiedades cinéticas son similares, pero varían en su afinidad por el ATP. Las isoformas AHA1 y AHA2 tienen una afinidad diez veces mayor por el ATP ($K_m = 0.15 \text{ mM}$) que la isoforma AHA3 ($K_m = 1.5 \text{ mM}$) [Palmgren y Christensen 1994].

3. Regulación.

Debido a la importancia de la ATPasa de H^+ en el crecimiento, desarrollo, defensa y mantenimiento de la homeostasis de la célula, esta enzima está regulada por varios mecanismos, dependiendo del tipo de estímulo, tejido y requerimientos celulares.

A. Expresión de los genes de la enzima.

La expresión de los distintos genes no depende de la subfamilia a la cual pertenezcan, e inclusive se ha visto que dos distintos genes de ATPasa de H^+ se expresan en el mismo tejido. Actualmente, se puede conocer información acerca de la regulación en la expresión de los genes por factores ambientales, ya sean bióticos o abióticos [<http://www.arabidopsis.org/> y <https://genevestigator.com/gv/plant.jsp>]. Se estima que la expresión de los genes de ATPasa de H^+ aumenta cuando se requiere una gran actividad de transporte. Éste es el caso cuando se somete a la planta a un estrés salino [Niu *et al* 1993, Binzel 1995], mecánico [Oufattole *et al* 2000] o de cambios de pH [Yan *et al* 1998]. La regulación de los genes al nivel de transcripción soporta la hipótesis de diferentes promotores inducibles, que en consecuencia lleva a una respuesta más adaptada para el desarrollo de la planta o por el cambio en el ambiente [Arango *et al* 2003].

B. Regulación transcripcional y traduccional.

La regulación empieza desde la transcripción. A pesar del rápido progreso en el conocimiento de las secuencias génicas de ATPasas de plantas y hongos, se conoce muy poco sobre la región promotora y los mecanismos que median la expresión a nivel genético de la ATPasa de H^+ . La ATPasa de H^+ de la MP de plantas está codificada por una familia multigénica de 5 subfamilias [Palmgren 2001, Arango 2003]. En la actualidad, con el conocimiento del genoma completo de *A. thaliana*, se sabe que en esta planta hay 12 genes que contienen a la ATPasa de H^+ , cinco de los cuales han sido caracterizados a varios niveles. En *N. plumbaginifolia* se han caracterizado nueve genes [Perez *et al* 1992, Moriau *et al* 1993, Oufattole *et al* 2000] y en *Oriza sativa* se han identificado 10 genes, de los cuales 3 han sido caracterizados [Wada *et al* 1992, Ookura *et al* 1994, Zhang *et al* 1999].

El análisis de varios transcritos de ATPasa de H⁺ en varias especies ha revelado la presencia de 128 a 358 nucleótidos que preceden al codón de inicio AUG. Normalmente, el promedio de nucleótidos antes del codón de inicio es de 40 a 80 nucleótidos en los genes de plantas. Además, un pequeño marco de lectura abierto de 3-13 codones se ha encontrado corriente arriba de la secuencia que codifica la ATPasa de H⁺, esta región es llamada uORF por sus siglas en inglés (upstream open Reading frame). Este uORF es traducido por los ribosomas, siendo algunos de éstos capaces de reiniciar el marco de lectura de la ATPasa de H⁺ a una distancia intercistronica [Lukaszewicz *et al* 1998]. Se sugiere que este marco traduccional es responsable de las cantidades de enzima que van a ser sintetizadas [Arango *et al* 2003].

C. Fosforilación y desfosforilación de la enzima.

El concepto de la región auto-inhibitoria del COO⁻ terminal surgió del estudio del efecto de la glucosa en la ATPasa de H⁺ de levadura. Ya que, cuando las células de levadura eran incubadas en glucosa, la Km para el ATP disminuía, la V_{max} se incrementaba, el pH óptimo cambiaba a uno más alcalino y la sensibilidad al vanadato se incrementaba. Estos efectos eran simulados quitando 11 residuos en la región del carboxilo terminal [Morsomme y Boutry 2000]. Se ha reportado que en la secuencia de aminoácidos del carboxilo terminal de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, hay dos puntos de regulación en este dominio. Uno, definido por los aminoácidos Arg-909 y Thr-912, que son esenciales para el cambio de V_{max} producido por la activación de la ATPasa, mientras que el otro sitio está definido por Ser-899 y Glu-901 y es necesario para el cambio de la Km [Olsson *et al* 1995, Portillo 2000]. Por tanto, bajo situaciones basales, el carboxilo terminal interactúa con el sitio catalítico de la enzima inhibiendo su actividad. La actividad de la enzima se restablece cuando hay una fosforilación por una cinasa de serina/treonina en el aminoácido Thr-948 [Olsson *et al* 1998]. Se ha reportado también que la luz azul activa la fosforilación de la ATPasa por una cinasa de serina/treonina activando el bombeo de protones e induciendo la apertura de las células guarda [Kinoshita y Shimazaki 1999]. La fosforilación es la señal para que la proteína 14-3-3 se una al carboxilo terminal y éste se separe del sitio catalítico, aumentando la actividad de la ATPasa de H⁺ [Sze *et al* 1999].

Así, la región del carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺ tiene un efecto regulatorio negativo, lo cual se ha determinado truncando sistemáticamente la región [Regenberg *et al* 1995] y como se mencionó en la parte de estructura, el carboxilo terminal en el cristal de ATPasa de la isoforma AHA2 de *A. thaliana* ejerce un efecto de enrollamiento sobre la misma proteína y bloquea sitios importantes para la entrada de protones y en la rotación del dominio A. Pero como se mencionó con anterioridad, éste no es el único lugar donde se regula la enzima, se han descubierto también puntos de regulación en la región del amino terminal, en el primero de los cuatro puntos que están embebidos en la MP y en el dominio más grande que se encuentra en el citoplasma [Portillo 2000].

D. Interacción con la proteína 14-3-3.

En años recientes se ha encontrado que las proteínas 14-3-3, un grupo de proteínas altamente conservadas en organismos eucariontes, regulan muchos blancos celulares. Las proteínas 14-3-3 fueron inicialmente descritas como proteínas ácidas y abundantes de cerebro. Su denominación se deriva del número de fracción en cromatografía DEAE en celulosa y su migración en una subsiguiente electroforesis en geles de almidón. Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia grande de proteínas homólogas codificadas por genes separados. Las proteínas 14-3-3 existen en su mayoría como dímeros cuyos monómeros tienen un peso de 30 kDa [Fu *et al* 2000]. Cada monómero contiene dominios que pueden unir a una α -hélice de una proteína blanco. Un requerimiento para que las proteínas 14-3-3 se unan es por medio de una fosforilación previa de la proteína blanco [Morsomme y Boutry 2000].

Debido a que las proteínas 14-3-3 están involucradas en interacciones proteína-proteína se ha sugerido que están involucradas en respuestas de estrés en plantas. Este papel se ha inferido del potencial para regular tanto rutas de señalización como proteínas involucradas en respuestas finales. Las proteínas 14-3-3 pueden operar en respuesta a estrés a través de muchos mecanismos. Por tanto, ellas pueden regular la actividad de proteínas individuales que tengan funciones de señalización o de defensa [Roberts 2003]. Alternativamente, pueden participar en la formación de complejos multiproteicos por su habilidad de actuar como adaptadores. También pueden regular la expresión de genes inducidos por el estrés, modificando la actividad y/o localización de factores de transcripción. Como las proteínas 14-3-3 requieren de una fosforilación previa en una secuencia específica de unión, las interacciones reguladoras están mediadas en muchos casos por la activación de rutas de señalización que resultan en una fosforilación de proteínas [Fu *et al* 2000].

La proteína 14-3-3 activa la ATPasa de H^+ por medio de su interacción con el dominio carboxilo terminal en los motivos de arginina-serina-x-Pserina-x-prolina (donde x puede ser cualquier aminoácido y Pserina es una serina fosforilada) y tirosina-treonina-valina de la ATPasa [Fuglsang *et al* 2003]. Un ejemplo de este fenómeno es el de plantas sometidas a estrés abiótico y en donde a condiciones de baja temperatura y alta osmolaridad, las proteínas 14-3-3 interactúan con el sitio auto-inhibitorio del carboxilo terminal de la ATPasa de H^+ de la MP, activando el bombeo de protones que es crucial en el sistema protector que las plantas han desarrollado contra las influencias adversas provenientes del exterior [Borch *et al* 2002, Roberts *et al* 2002].

Se ha visto también que el tratamiento de tejidos de plantas con la toxina producida por el hongo *Fusicoccum amygdali*, la cual produce una gran estimulación en la actividad de la ATPasa de H^+ , trae concomitantemente un marcado incremento en la asociación de la proteína 14-3-3 con la ATPasa de H^+ , se ha descrito que la fusicoccina estabiliza el complejo ATPasa de H^+ /14-3-3 [Olsson *et al* 1998, Schaller y Oecking 1999, Morsomme y Boutry 2000].

4. Interacción con lípidos membranales.

La ATPasa de H⁺ de la MP de plantas existe *in situ* en un ambiente lipídico. Sin embargo, se puede prever que un ambiente específico de lípidos es requerido para su óptimo desempeño. Para determinar los requerimientos lipídicos de la enzima [Cocucci y Marrè 1984, Brauer y Tu 1989] se han utilizado varios enfoques: deslipidando selectivamente la enzima [Sandstrom y Cleland 1989], modificando el ambiente lipídico (realizando una purificación de la enzima) o reconstituyendo de manera selectiva a los lípidos para ver como cada uno de los componentes del ambiente influye en su actividad [Brauer y Tu 1989]. También, se ha modificado el ambiente anfipático sometiendo a la enzima a varios detergentes, los cuales restauran o eliminan su actividad [Briskin y Poole 1983, Briskin y Niesman-Reynolds 1989].

A. Interacción con los glicerolípidos.

En la mayoría de los casos, una vez deslipidada la enzima, se ha visto que los fosfolípidos restauran parcialmente su actividad. La actividad de la ATPasa de H⁺ aparentemente se estimula por fosfolípidos en el siguiente orden decreciente: fosfatidilserina, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y fosfatidilglicerol (Tabla II). También se ha visto que los grupos polares de los lípidos como el glicerol, el inositol y serina activan muy ligeramente a la ATPasa. Se ha observado que el grado de insaturación y longitud de las cadenas de ácidos grasos está en relación con la actividad de la enzima. La actividad disminuye cuando se incrementa el tamaño de la cadena y el grado de insaturación [Kasamo 2003]. La lisofosfatidilcolina es un detergente natural producido por la fosfolipasa A₂ y se ha visto que la lisofosfatidilcolina estimula a la ATPasa de H⁺ uniéndose a sitios diferentes y provocando cambios conformacionales que llevan a estados de alta o baja afinidad por el ATP [Palmgren *et al* 1988, Gomès *et al* 1996].

B. Interacción con esteroides.

Los esteroides son el otro tipo de lípido de particular interés para el estudio de la regulación de la ATPasa de H⁺ de plantas. Se ha encontrado que en plantas la composición de esteroides es más compleja que en animales, hongos y levaduras, por lo que el estudio de la interacción lípido-proteína y en particular esteroide-ATPasa es más complicado. Se ha encontrado que en plantas los esteroides más abundantes son el campesterol, el estigmasterol, el β-sitosterol y en menor proporción el colesterol [Larsson *et al* 1990, Mongrand *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Laloi *et al* 2007, Lefebvre *et al* 2007]. Además, se ha reportado que la composición de estos esteroides es diferente entre cada tipo de planta. Por ejemplo, en avena el estigmasterol y el colesterol representan los esteroides mayoritarios, en centeno el β-sitosterol y el campesterol son encontrados en mayor cantidad, en *N. tabacum* el estigmasterol y el 24-metilcolesterol son los esteroides mayoritarios, y en callo de *A. thaliana* el β-sitosterol y el campesterol son los esteroides mayoritarios [Cooke *et al* 1991, Mongrand *et al* 2004, Borner *et al* 2005].

Tabla II. Efecto de algunos compuestos anfífilos en la actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas. En la tabla se presentan algunos compuestos anfífilos en los cuales se ha visto que tienen una influencia en la actividad de la ATPasa de H⁺ medida como la cantidad de ATP hidrolizado por mg⁻¹ de proteína por min⁻¹. Las flechas (↑) ó (↓) indican que hubo una activación o inhibición de la enzima respectivamente o (=) cuando no hubo cambio en su actividad al adicionarse el lípido o detergente correspondiente. Los ensayos en los que están descritos estos efectos se llevaron a cabo en ambientes reconstituidos. [Serrano et al. 1988, Palmgren et al. 1990, Ibarz et al. 1994 Grandmougin-Ferjani et al. 1997, Kasamo 2003].

Glicerolípidos	Esteroles	Detergentes		
		Zwitter iónicos	No iónicos	Iónicos
Ácido fosfatídico (↓)	Estigmasterol (↑)	Lisofosfatidilcolina (↑)	Nonidet P-40 (=)	Desoxicolato de sodio (=)
Fosfatidilcolina (↑)	Sitosterol (↓)	Zwittergent 3-8 (=)	Tween 20 (=)	Dodecil sulfato de sodio (=)
Fosfatidilserina (↑)	Colesterol (↓)	Zwittergent 3-10 (↑)	N-lauronilsarcosina (=)	
Fosfatidilglicerol (↑)	Campesterol (↓)	zwittergent 3-12 (↑)	Lubrol WX (↑)	
Fosfatidiletanolamina (↓)	24-Metilcolesterol (↓)	Zwittergent 3-14 (↑)	Digitonina (=)	
Fosfatidilinositol (↓)	24-Metilpolinastol (↓)	Zwittergent 3-16 (=)	Tritón X-100 (↓)	
	14 α ,24-Dimetilcolest-8-en-3 β -ol (↓)	CHAPS (=)	Brij 58 (↑)	
		CHAPSO (=)	Brij 35 (↑)	
			Octil glucósido (=)	

Más aún, la diferencia se extiende a las membranas plasmáticas de diferentes tejidos dentro de la misma planta [Sandstrom y Cleland 1989]. Por tanto, con este panorama puede ser difícil establecer un papel para un esteroles particular en la modulación de la actividad de la enzima.

Los estudios sobre modulación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas debida a esteroides se han realizado en ambientes donde se ha reconstituido a la enzima con lípidos, así como en purificaciones de MP de diferentes tejidos vegetales (Tabla II). Se ha visto en soya que el β-sitosterol y el 24-metilcolesterol inhiben a la enzima en un porcentaje que aumenta con la concentración de esteroides. El colesterol aparentemente aumenta la actividad de la enzima. El estigmasterol ejerce un efecto dual, ya que a bajas concentraciones estimula la actividad, pero a mayores concentraciones presenta una inhibición moderada. Finalmente, esteroides inusuales, como el 24-metilpolinastol y el 14 α ,24-dimetilcolest-8-en-3 β -ol disminuye su actividad independientemente de su concentración (Tabla II) [Grandmougin-Ferjani *et al* 1997]. En avena, la adición de colesterol y estigmasterol aumenta la actividad de la enzima, mientras que el campesterol y el β-sitosterol la inhiben. En arroz, la adición exógena de esteroides inhibieron la enzima, siendo el inhibidor más efectivo el estigmasterol [Cooke *et al* 1993]. Es posible que la actividad óptima de la ATPasa de H⁺ pueda tener una dependencia específica de la composición de esteroides de la membrana plasmática para sustentar el crecimiento de una planta o de un tejido en particular [Cooke *et al* 1993].

Los esteroides parecen modular la actividad de la enzima por más de un mecanismo, de los cuales hay dos hipótesis que apoyan la modulación lipídica de la ATPasa de H⁺ en plantas. De acuerdo con la primera hipótesis, cambios en la composición lipídica pueden inducir una alteración en la fluidez de la bicapa que indirectamente afectan la habilidad de la enzima para llevar a cabo los cambios conformacionales que en consecuencia tiene cambios en su actividad. La segunda hipótesis llamada “hipótesis anular” está basada en una interacción directa de los lípidos con la enzima, lo cual conlleva una alta especificidad en su interacción. Se ha propuesto que esta hipótesis describe mejor el efecto de los esteroides sobre la actividad de la enzima [Cooke y Burden 1990, Grandmougin-Ferjani *et al* 1997].

VI. Antecedentes.

Es factible que la actividad de la ATPasa de H⁺, como la de toda proteína transmembranal, esté influenciada por el ambiente lipídico, como lo indican reportes sobre el efecto de los glicerolípidos y esteroides en la actividad de la enzima. Sin embargo, no hay trabajos que señalen una influencia de los esfingolípidos sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas. Trabajo previo en nuestro laboratorio, utilizando un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos, sugirió que el decremento en ceramida y/o esfingolípidos complejos endógenos eran responsables de una disminución del 25% de la actividad de la enzima [Gutiérrez-Nájera 2005, Vázquez 2007]. Con objeto de obtener más información sobre este efecto, en el presente proyecto también se utilizó un sistema en el que la síntesis de *novo* de esfingolípidos estuviera

abatida, pero bajo un esquema diferente, usando plantas de *A. thaliana* en las que se puede inducir una disminución de su capacidad de síntesis de esfingolípidos debido a una modificación en la expresión del gene de la primera enzima de la vía de síntesis de estos lípidos. Esta enzima es la serina palmitoil transferasa (SPT), un heterodímero que contiene una subunidad reguladora (LCB1) y una subunidad catalítica (LCB2a ó LCB2b) [Chen *et al* 2006, Dietrich *et al* 2008]. Por ello, se usaron 3 líneas de *A. thaliana* que son la línea silvestre, una línea mutante *Atlcb2a-1* (mutante homocigota por inserción de T-DNA para la subunidad LCB2a) y una línea transgénica cuyo fondo genético fue la línea *Atlcb2a-1* y en la que adicionalmente se insertó un casete de expresión de RNAi, para inducir el silenciamiento del gene *AtLCB2b*. Este sistema, permite la inducción de un asa específica sobre el gene *AtLCB2b* por la aplicación de metoxifenazida. En esta línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, el gene de la subunidad *AtLCB2a* está mutado y no es funcional, pero la SPT está todavía activa debido a que se sigue expresando el gene *AtLCB2b*. Cuando la metoxifenazida se aplica, el gene *AtLCB2b* es silenciado gradualmente, lo que conlleva eventualmente a un menor nivel de proteína SPT y, por tanto, a una disminución generalizada en la vía de síntesis de esfingolípidos complejos [Dietrich *et al* 2008].

HIPÓTESIS

La actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* se modifica por diferentes niveles de esfingolípidos endógenos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en condiciones en las que la planta presenta cambios en los niveles de esfingolípidos endógenos

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer las condiciones de purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 (silvestre) y verificar la pureza en las fracciones membranales por:
 - a) Actividad de enzimas marcadoras.
 - b) Enriquecimiento de ATPasa de H⁺.
 - c) Microscopía electrónica de transmisión.
2. Establecer que los niveles de esfingolípidos afectan la actividad de la ATPasa de H⁺, utilizando líneas de *A. thaliana* que expresan diferencias en el contenido de esfingolípidos endógenos.
 - a) Medir la actividad de la ATPasa de H⁺ en VMP de hojas de *A. thaliana* silvestre y en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.
 - b) Medir la actividad de la ATPasa de H⁺ por ensayos de inmunodetección.
 - c) Explorar si hay cambios en los niveles de la proteína reguladora 14-3-3 de la ATPasa de H⁺.
3. Explorar si hay diferencias en la capacidad de acidificación de las raíces de las plantas de las líneas de *A. thaliana* que tienen niveles modificados de esfingolípidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Reactivos.

Los reactivos químicos usados en estos estudios fueron de alto grado de pureza. El anticuerpo contra la ATPasa de H⁺ de betabel fue obsequiado por el Dr. Luis E. González de la Vara (CINVESTAV, Irapuato). También, se utilizó un anticuerpo contra la isoforma 3 de *Arabidopsis thaliana* obsequiado por la Dra. Rosario Vera Estrella (IBT, Cuernavaca). Se utilizó un anticuerpo dirigido contra la proteína 14-3-3 isoforma β de humano de Santa Cruz Biotechnology. La membrana utilizada para los ensayos de Western fue de PVDF Immobilon-P con tamaño de poro de 0.45 μ m (Millipore).

II. Material biológico.

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-O (tipo silvestre), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de 10 semanas de edad (semillas proporcionadas por el grupo del Dr. E.B. Cahoon, Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry University of Nebraska-Lincoln).

Tabla III. Características de las plantas mutantes de *A. thaliana* proporcionadas por el grupo del Dr. E.B. Cahoon.

Planta tipo	Número acceso	Gene modificado	Proteína codificada por el gene	Características fenotípicas	Niveles de bases
<i>Atlcb2a-1</i>	SALK_061472	At5g23670	AtLCB2a	Normal	1.37 ± 0.11
<i>Atlcb2b</i>	SALK_061472			Normal	1.37 ± 0.11
<i>hp/Atlcb2a</i>	Modificado con un RNAi	At3g48780	AtLCB2b	Presenta clorosis a partir de los 3 días de inducción	0.88 ± 0.19

III. Germinación de semillas de *A. thaliana*.

Las semillas se colocaron en un tubo eppendorf y se les agregó 1 mL de hipoclorito de sodio (marca Cloralex® con una concentración de cloro activo del 5.25 al 5.50 % p/p) a una concentración final de 1.05 – 1.10 % (v/v estéril) y 1 μ L de Tween 20 (concentrado), posteriormente, se agitaron vigorosamente durante 20 min. A las semillas se les volvió a hacer un lavado con hipoclorito de sodio al 1.05 – 1.10 % (v/v estéril) durante 10 min. Se centrifugó en una micro centrifuga por 10 seg, al término se tomó el sobrenadante con micro pipeta y puntas estériles. Después, las semillas se enjuagaron por agitación vigorosa por un periodo de 30 seg con 1 mL de agua estéril y se centrifugó por 10 seg para eliminar el sobrenadante. Este paso se repitió 5 veces hasta que se eliminó el hipoclorito de sodio y el Tween 20. Al término de los lavados, se resuspendieron las semillas con agua estéril. Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri con medio de Gamborg B-5 suplementado con Agar al 1% (p/v) y

sacarosa al 1% (p/v) en una campana de flujo laminar. Las cajas con las semillas sembradas se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a 4°C por 48 h, posteriormente, se pasaron a una cámara de incubación a 22°C con un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Al término de tres semanas, las plántulas se trasplantaron a macetas con sustrato MetroMix 200 (Sunshine), MetroMix 400 (Sunshine), agrolita, vermiculita todas en proporción 2:2:1:1: (p:p:p:p) respectivamente.

IV. Ensayo de acidificación de raíces de *A. thaliana*.

Primero, se llevó a cabo el proceso de germinación de semillas de *A. thaliana*, en el cual, las cajas Petri donde se crecieron estas semillas fueron colocadas en forma vertical para favorecer el crecimiento de la raíz a favor de la gravedad. Después de tres semanas de germinación se trasplantaron las plántulas en una campana de flujo laminar a nuevas cajas Petri con medio Gamborg B-5 suplementado con Agar al 1% (p/v), sacarosa al 1% (p/v), y púrpura de bromocresol para una concentración final de 0.003% y ajustando a un pH final de 6.0 con HCl 1N. Esta suspensión se suplementó en su caso con intrepid F2 1:20000, el cual tiene el principio activo metoxifenazida. Se monitoreó el proceso de acidificación cualitativamente. Se observó el cambio gradual de color rojo a amarillo haciendo un registro fotográfico del medio cada 24 h durante 9 días posteriores al trasplante.

V. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de *Arabidopsis thaliana*.

1. Obtención de la fracción microsomal.

Se cosecharon las hojas de plantas de *A. thaliana* y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Se pesaron las hojas todavía congeladas y después se colocaron en un mortero. En el mortero, se añadió nitrógeno líquido y se maceraron las hojas para después añadir amortiguador de homogenización en una relación 1/3 (p/v) cuya composición fue: sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, β -mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, KCl 1 mM, PVP 0.6%, BSA 0.2% y coctel de inhibidores de proteasa (Complete, Roche) 1.6 μ g/mL. Se molieron y se filtró el homogenado por 4 capas de gasa. Se vertió en tubos de centrifuga en los cuales se centrifugaron a 15,000 g, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4°C durante 15 min. Se tomó el sobrenadante, vertiéndose esta vez en tubos para ultracentrífuga. Se centrifugó el sobrenadante a 200,000 g a 4°C durante 80 min. Una vez finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador (sorbitol 620 mM, KH_2PO_4 5 mM, pH 7.8, KCl 3.5 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM y coctel de inhibidores de proteasa Complete Roche 1.6 μ g/mL). Una vez resuspendido el botón, se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry modificado [Peterson 1977].

2. Optimización de la obtención de VMP de hojas de *A. thaliana*.

Se cargaron 3.3 mg de proteína microsomal a cada fase de acuerdo al método de partición de fases de polímeros acuosos (Fig. 8) [Briskin *et al* 1987, Larsson *et al* 1994]. La composición de polímeros y de sales, tanto de la mezcla de fases como del sistema de fases se varió con respecto a las condiciones ya establecidas en nuestro laboratorio para especies como *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris* y *Zea mays* [Carmona 2006]. Con el objeto de optimizar la purificación de VMP de hojas de *A. thaliana*, una vez vertida la proteína a los tubos con la mezcla de fases, se mezcló por inversión 25 veces y se centrifugó a 5000 g, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4°C durante 15 min. Terminada la centrifugación, se recuperó la fase superior y se vertió en tubos de ultracentrífuga. Se centrifugó entonces a 200,000 g a 4°C durante 80 min. Finalizada la centrifugación, se procedió a decantar el sobrenadante. El botón del fondo se resuspendió en amortiguador de lavado (sorbitol 350 mM, Hepes/Mes 2 mM pH 7.6, DTT 1 mM y coctel de inhibidores de proteasas Complete Roche 1.6 µg/mL) y se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry modificado [Peterson 1977].

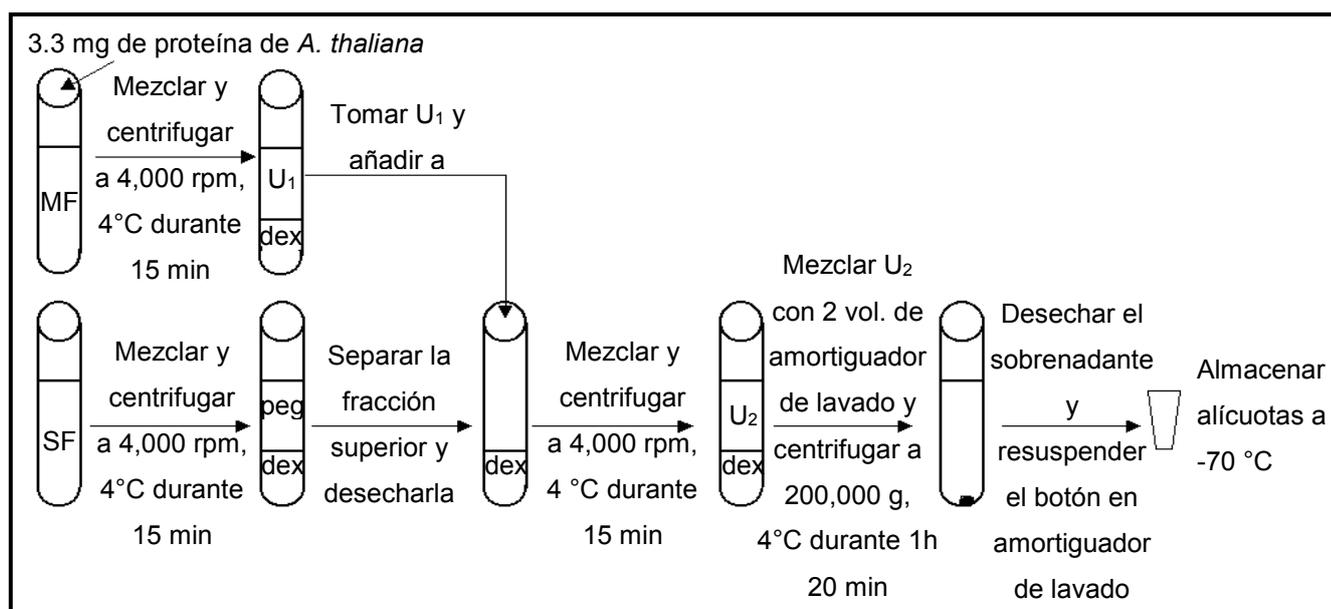


Fig. 8. Procedimiento de purificación de las VMP. MF: mezcla de fases, SF: sistema de fases, U₁: fase superior uno, U₂: fase superior dos, dex: dextran, peg: polietilenglicol.

VI. Determinación de hidrólisis de ATP.

La hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de MP se midió utilizando 150 µL de medio de hidrólisis que contenía: sacarosa 250 mM, PIPES 20 mM a pH 6.5, CCCP 7 µM, Brij 58 al 0.015% v/v, ATP 10 mM y MgCl₂ 10 mM. Se añadieron de 1 a 5 µg de proteína de membrana al medio para iniciar la reacción y se incubó por 30 min a 29°C. Una vez terminada la reacción, se detuvo la hidrólisis añadiendo 150 µL de SDS al 24% y se determinó el fosfato inorgánico liberado [según González-Romo *et al* 1992]. Brevemente después, se adicionó el reactivo B/C (ácido ascórbico al 3.4% p/v en HCl 1 N y molibdato de amonio 0.6% p/v). Tres minutos después se adicionó el

reactivo E (ácido acético 2% p/v, metarsenito de sodio 2% p/v y citrato de sodio 2% p/v). Se midieron las absorbencias a 850 nm después de 20 min de haberse iniciado la reacción con el reactivo E.

Todas las muestras se midieron por triplicado. En cada tratamiento de purificación de VMP se añadieron inhibidores de ATPasa de la membrana plasmática, de mitocondria, de la ATPasa de la membrana de vacuola y de fosfatasas (ortovanadato de sodio, azida de sodio, nitrato de potasio y molibdato de sodio). Para poder determinar la cantidad de fosfato inorgánico liberado se preparó una curva de calibración de K_2HPO_4 (utilizando una disolución patrón de 1 mM).

VII. Análisis por microscopía electrónica.

Para llevar a cabo la obtención de las micrografías electrónicas de VMP se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se centrifugaron las muestras de VMP obtenidas del tejido vegetal a una velocidad de 100,000 g. Los botones obtenidos fueron cubiertos con glutaraldehído al 3% (v/v) en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 a 4°C durante 2 h.
2. Se enjuagaron las muestras y se les añadió tetróxido de osmio al 1% a 4°C durante 2 h.
3. Las muestras se deshidratan.
4. Se realizó una infiltración con óxido de propileno y se incubaron por un período entre 24-36 h.
5. Las muestras se embebieron en Epon a 60°C durante 48 h.
6. Se realizaron cortes de 100 nm de grosor en el Ultramicrotomo Reicher, los cuales se recolectaron en rejillas de cobre con una malla de tamaño 200.
7. Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron en el microscopio electrónico Jeol 1200 EXII a 60 kV.

VIII. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes [Schägger y von Jagow 1987].

Se prepararon los geles de acrilamida-bisacrilamida de 10% T – 6% C. La composición de los geles (concentrador y separador) y los amortiguadores para electroforesis se muestran en las Tablas IV y V respectivamente.

Tabla IV. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS [según Schägger y von Jagow 1987].

Reactivos	Gel separador (vol. en μL)	Gel concentrador (vol. en μL)
Acrilamida-bisacrilamida	1632 ¹	225 ²
Amortiguador del gel ³	1632	421
Glicerol (anhidro)	660	-
H ₂ O bidestilada	991	1038
Persulfato de amonio ⁴	16.5	14
TEMED ⁵	1.65	1.4
Cantidad Total (μL)	4933.15	1700

¹ Esta parte del gel se preparó con disolución patrón de 30 %T – 3 %C para la separación de la proteína 14-3-3 y con una disolución patrón de 30 %T – 6 %C para la separación de la ATPasa de H⁺.

² Esta parte del gel sólo se preparó con la disolución patrón de 30 %T – 3 %C.

³ Ver Tabla V.

⁴ Solución patrón al 10% (p/v)

⁵ Disolución comercial sin diluir.

Tabla V. Soluciones para geles.

Tipo de amortiguador	Reactivo	Concentración
Amortiguador del cátodo	Tris (Trizma base)	12.1 g/L
	Tricina	11.93 g/L
	SDS	1 g/L
Amortiguador del ánodo	Tris (Trizma base)	24.23 g/L
	HCl (para ajustar a pH 8.9)	1 M
Amortiguador del gel	Tris (Trizma Base)	181.71 g/500mL
	HCl	40.3 mL/500 mL
	SDS	1.5 g/500 mL
Amortiguador de digestión	Tris (Trizma Base)	100 mM
	Azul de bromofenol	0.6%
	β -mercaptoetanol	4%
	SDS	10%

IX. Electrotransferencia de proteínas a partir de geles de poliacrilamida-SDS a membranas de PVDF.

Se usó la técnica de inmunotransferencia o réplica en Western [Aebersold *et al* 1986, Beisiegel 1986, Matsudaira 1987]. Después de la separación electroforética de proteínas, el gel a transferir se mantuvo en agitación rotatoria suave durante 15 min en 25 mL de disolución

amortiguadora de transferencia (Tris 25 mM, metanol 20% v/v, SDS 0.1% p/v). Posteriormente, se ensambló el casete de la siguiente forma: se colocó sobre una rejilla del casete una esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia, sobre la cual se colocó una capa de papel filtro humedecido en la misma disolución, el gel se acomodó sobre filtro y sobre el mismo se acomodó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), del mismo tamaño que el gel, previamente humedecida en metanol y disolución amortiguadora de transferencia.

Sobre la membrana de PVDF se colocó otra capa de papel filtro humedecido con el amortiguador de transferencia y, finalmente, se colocó otra esponja saturada con el buffer de transferencia, se cerró el casete y se introdujo en la cámara de electrotransferencia. La transferencia se llevó a cabo durante 2 h 30 min a temperatura ambiente. Al término de la transferencia se removió la membrana de PVDF y se colocó en 20 mL de TTBS (NaCl 0.5 M, Tween 0.05% v/v y Tris/HCl 20 mM pH 7.5), manteniéndose en agitación rotatoria por 5 min a temperatura ambiente; este paso se repitió una vez más, cuidando de cambiar la disolución de TTBS. Se realizó un tercer lavado, esta vez utilizando 20 mL de disolución de TBS (NaCl 0.5 M y Tris/HCl 20 mM a pH 7.5), manteniéndose en agitación rotatoria, durante 5 min a temperatura ambiente.

X. Inmunodetección de la ATPasa de H⁺.

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas desde un gel desnaturante se le realizó la saturación de sitios inespecíficos. Para ello, se añadieron a la membrana 20 mL de una disolución al 5% p/v de leche descremada en polvo (Svelty) disuelta en TBS y se mantuvo en agitación rotatoria a temperatura ambiente por 1 h. Al término se realizaron dos lavados de 5 min cada uno con una solución de TTBS y un último lavado con TBS. Para detectar a la ATPasa de H⁺ con el anticuerpo proporcionado por el Dr. Luis González de la Vara, la membrana de PVDF se incubó durante toda la noche a 4°C en una disolución de TBS con leche al 2% y el anticuerpo diluido 1:4000 v/v. Para detectar a la ATPasa de H⁺ con el anticuerpo AHA3, la membrana de PVDF se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación rotatoria en una disolución de TBS con leche al 2% y el anticuerpo diluido 1:1000 v/v. Al término de la incubación se realizaron nuevamente los lavados con TTBS y TBS. Después de los lavados, se incubó con el segundo anticuerpo anti IgG (H+L)-AP de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad) en una dilución 1:1000 v/v en TBS. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en reposo con leche descremada en polvo al 5% p/v. Nuevamente se realizaron lavados con TTBS y TBS. La banda de reacción del anticuerpo se reveló con una disolución para desarrollar color (NBT 0.03% p/v en DMF al 70% v/v, BCIP 0.015% p/v disuelto en DMF, NaHCO₃ 0.1 M y MgCl₂ 1 mM a pH 9.8). Se mantuvo en agitación rotatoria hasta que la banda de proteína fue visible. La reacción se detuvo con agua desionizada.

RESULTADOS

En nuestro laboratorio se ha encontrado que cuando se aplica metoxifenazida a la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* desde las 24 h, ya hay una disminución del 40% en el nivel de transcrito *AtLCB2b*, comparado con el de la silvestre y el de la línea mutante *Atlcb2a-1*, que se usaron como controles. Este nivel de transcrito se mantuvo constante a lo largo de por lo menos 4 días posteriores a la aplicación del inductor (insecticida Intrepid F2 que contiene metoxifenazida) [Carmona 2007]. En estas condiciones de tratamiento se utilizaron las plantas silenciadas.

Tomando en cuenta el marco anterior y las condiciones antes mencionadas, el objetivo de este trabajo fue modificar el contenido de esfingolípidos endógenos en la membrana plasmática de las líneas de *Arabidopsis thaliana* mencionadas, para estudiar sus efectos en la actividad de la ATPasa de H⁺. Para ello, se necesitaba de fracciones purificadas de membrana plasmática y de la medición de la actividad de la enzima en estas fracciones membranales.

I. Purificación de VMP de hojas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-O (tipo silvestre)

Para tener una fracción purificada de membrana plasmática (MP), el primer paso fue establecer las condiciones para la obtención de MP con pureza adecuada, evaluada de acuerdo a tres parámetros: determinación de la actividad de enzimas marcadoras, detección de la ATPasa de H⁺ de la MP por inmunoréplica y tinción de vesículas de membrana plasmática (VMP) en microscopía electrónica.

Con base en datos previos de nuestro laboratorio sobre aislamiento y purificación de VMP en otros tejidos vegetales como hojas de *Nicotiana tabacum* y de *Phaseolus vulgaris* [Carmona 2006], así como de embriones de *Zea mays* [Sánchez-Nieto *et al* 1997], la metodología que se siguió para el aislamiento y purificación de las VMP de hojas de *Arabidopsis thaliana* se presenta de forma esquemática en la Fig. 8 (Materiales y Métodos).

Estas metodologías usaban una concentración de polímeros óptima para dextran (Dex) y polietileno glicol (PEG) de 6.2% p/p, con una concentración de sales de KH₂PO₄ 5mM y KCl 3.5 mM para extraer VMP en la fracción U₂. En la literatura había sido reportado una concentración de Dex y PEG de 6.2% (p/p), de KH₂PO₄ 5 mM y KCl 3 mM para la extracción de VMP en la fracción U₂. Sin embargo, en esta técnica se recomienda establecer las condiciones de purificación para cada tipo de tejido [Larsson *et al* 1994].

En nuestro caso, se decidió probar inicialmente cuatro concentraciones diferentes de polímeros que fueron 6.0%, 6.2%, 6.5% y 6.7% p/p, tanto de Dex como de PEG, con una concentración de KH₂PO₄ 5 mM y KCl 3 mM en todos los casos. Inicialmente, sólo se variaron las concentraciones de polímeros, debido a que se ha reportado que es el factor más importante para la extracción de VMP [Ahuja 2000].

Se determinó el rendimiento relativo de proteína con respecto a la fracción microsomal de todas las fracciones [según Briskin *et al* 1987], desde las fracciones inferiores L₁ y L₂ (Lower

phase) a las fracciones U₁ y U₂ (Upper phase). También, se determinó la actividad de enzimas marcadoras de las membranas más abundantes en los tejidos subcelulares que son la membrana plasmática, la de tonoplasto y la mitocondrial. Para ello, se midió la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺ como marcadora de membrana plasmática, de la ATPasa de H⁺ de tonoplasto y de la ATPasa mitocondrial, usando inhibidores clásicos de estas enzimas como son el Na₃VO₄, KNO₃ y la Na₃N respectivamente.

Inicialmente, las concentraciones de polímeros que produjeron mayor rendimiento y actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática fueron 6.2% y 6.5% en la fracción U₂. Sin embargo, estas condiciones producían preparaciones con un rendimiento muy bajo (0.00095 mg de proteína/g tej. y 0.00171 mg de proteína/g tej. respectivamente) y considerando que se ha reportado que las sales son un factor importante en la cantidad de VMP obtenida en la fase superior, se cambiaron las concentraciones originales de KH₂PO₄ (5 mM) y KCl (3 mM) removiendo el KCl y variando el KH₂PO₄ a 0 mM y 5 mM. Las mejores condiciones resultaron ser 6.2% y 6.5% de polímero y la ausencia de sales, obteniéndose en la preparación resultante una inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por Na₃VO₄ del 69.3% y del 66.6%, correspondientes a una actividad de la ATPasa de H⁺ de 166.7 nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹ y 115 nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹, respectivamente. Estas actividades fueron similares a las reportadas en nuestro laboratorio para las hojas de *Phaseolus vulgaris* (160 nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) [Carmona 2006]. Desafortunadamente, el rendimiento obtenido fue de 0.006 mg de proteína/g tej. y de 0.007 mg de proteína/g tej., para las concentraciones de 6.2% y 6.5% de polímeros, respectivamente. Un rendimiento de 5 a 8 veces más bajo en comparación con el reportado en nuestro laboratorio para hojas de *P. vulgaris* (0.05 mg de proteína/g tej.) y para *N. tabacum* (0.03 mg proteína/g tej.) [Carmona 2006].

Se consideró entonces probar una concentración de polímero de 6.2% p/p, KH₂PO₄ 5 mM a pH 7.8 y sin KCl para la extracción de VMP en la fracción U₁ de *Arabidopsis thaliana*. Se determinó nuevamente el rendimiento relativo de proteína en el homogenado, en la fracción microsomal y vesículas de membrana plasmática [Briskin *et al* 1987]. Este rendimiento fue de 28.50 ± 5.3 mg de proteína/g tej. para el homogenado, 2.23 ± 0.90 mg de proteína/g tej. para la fracción microsomal y de 0.03 ± 0.02 mg de proteína/g tej. para las vesículas de membrana plasmática (Tabla VI). Por tanto, estas condiciones fueron las mejores obtenidas y las que se mantuvieron en preparaciones posteriores.

Tabla VI.- Purificación de vesículas de membrana plasmática de hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestre. Se utilizaron 5 µg de proteína membranal para determinar las actividades específicas de enzimas marcadoras en homogenado (HMO), fracción microsomal (FM) y fracciones U1 de vesículas de membrana plasmática (VMP), utilizando un reparto de fases de 6.2% DEX/6.2% PEG, KH₂PO₄ 5 mM a 4°C. Se muestran los resultados de cinco determinaciones de actividad realizadas con dos preparaciones independientes ± desviación estándar.

Parámetro	Fracción					
	HMO	FM		VMP		
	Cantidad ^a	Cantidad ^a	E ^b	Cantidad ^a	E ^b	E ^c
Rendimiento (mg proteína / g. tej.)	28.50 ± 5.30	2.23 ± 0.90		0.03 ± 0.02		
ATPasa-Mg ²⁺ total ^d (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)	45.4 ± 3.8	45.0 ± 13.9	1.0	211.0 ± 65.4	4.6	4.7
ATPasa-H ⁺ van ^e (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)	37.9 ± 3.7	17.4 ± 2.2	0.5	109.5 ± 9.7	2.9	6.3
ATPasa ^f (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)	6.7 ± 1.5	26.5 ± 8.3	4.0	102.0 ± 23.6	15.2	3.8
ATPasa MIT ^g (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)	5.5 ± 6.4	0.6 ± 0.4	0.1	1.0 ± 0.1	0.2	1.7
ATPasa TON ^h (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)	9.5 ± 1.9	0.9 ± 0.9	0.1	3.7 ± 5.1	0.4	4.1
Fosfatasas ⁱ (nmoles mg ⁻¹ min ⁻¹)	40.5 ± 3.5	12.6 ± 3.8	0.3	20.6 ± 5.3	0.5	1.6

^a Magnitud del valor experimental en las unidades indicadas.

^b Enriquecimiento relativo a las actividades específicas del homogenado.

^c Enriquecimiento relativo a las actividades específicas de la fracción microsomal.

^d Hidrólisis total de ATP dependiente de Mg²⁺.

^e Hidrólisis de ATP sensible a vanadato.

^f Hidrólisis de ATP insensible a inhibidores.

^g Hidrólisis de ATP sensible a NaN₃.

^h Hidrólisis de ATP sensible a KNO₃.

ⁱ Hidrólisis de ATP sensible a Na₃MoO₄.

1. Pureza de la preparación de VMP. Determinación de la actividad de enzimas marcadoras.

En la fracción purificada de vesículas de membrana plasmática (VMP) se determinó la actividad de enzimas marcadoras de las membranas más abundantes en tejidos vegetales y que podrían estar presentes en nuestra preparación: la membrana plasmática, la membrana de la vacuola (tonoplasto) y la membrana mitocondrial (Tabla VI, Fig. 9).

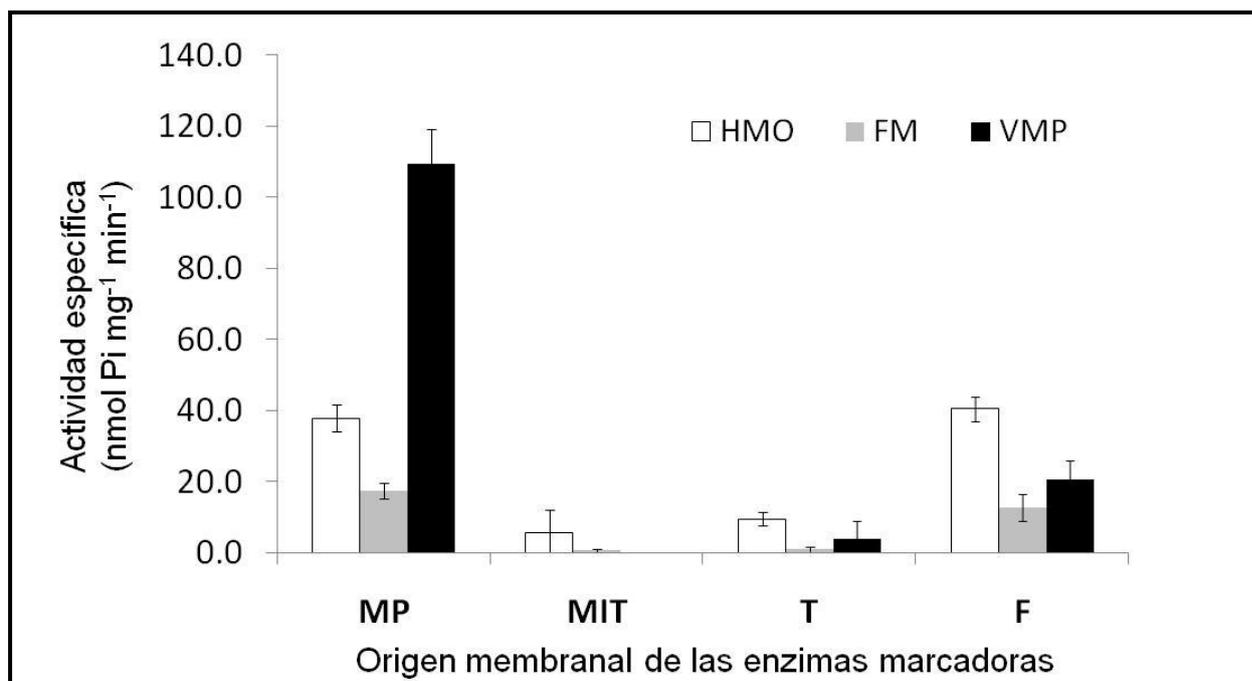


Fig. 9. Evaluación de la purificación de vesículas de membrana plasmática de hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre según la actividad específica de enzimas marcadoras de diferentes endomembranas. La actividad se midió en las condiciones experimentales de la Tabla VI. F: Fosfatasas; FM: fracción microsomal; HMO: homogenado; MIT: ATPasa de mitocondria; MP: ATPasa de membrana plasmática; T: ATPasa de tonoplasto, VMP: vesículas de membrana plasmática. Se muestran los resultados de cinco determinaciones realizadas con dos preparaciones independientes. Las barras indican el promedio \pm desviación estándar.

Para ello, se midió la actividad de la ATPasa de H⁺ como marcadora de membrana plasmática, la ATPasa de H⁺ de tonoplasto, la ATPasa mitocondrial y la de fosfatasas usando inhibidores específicos de estas enzimas como son el Na₃VO₄, KNO₃, Na₃N y Na₃MoO₄, respectivamente. Como se puede ver en la Fig. 9, la preparación de VMP (Fracción U₁) presentó un enriquecimiento de la actividad enzimática de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática con respecto al homogenado de hasta 2.9 veces y de 6.3 veces con respecto a la fracción microsomal. Además, el enriquecimiento en la actividad de la ATPasa de H⁺ fue consistente con la disminución de la actividad de las otras enzimas marcadoras a través de los distintos pasos de purificación. Si bien, también se detectó un ligero enriquecimiento de la actividad de fosfatasas (1.6 veces) en la

fracción de VMP, la actividad de esta enzima fue cuantitativamente menor que la enzima marcadora de la membrana plasmática.

2. Pureza de la preparación de VMP. Enriquecimiento de la ATPasa de H⁺.

Otra manera de estimar el grado de pureza de las preparaciones membranales fue detectando a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por inmunoréplica utilizando un anticuerpo específico. El anticuerpo utilizado estaba dirigido contra la isoforma AHA3 de *Arabidopsis thaliana*. Se encontró un enriquecimiento de esta enzima en las fracciones de membrana plasmática comparadas con el homogenado y la fracción microsomal como puede observarse en la Fig. 10. La preparación de VMP presentó un enriquecimiento de aproximadamente el doble con respecto al homogenado y la fracción microsomal.

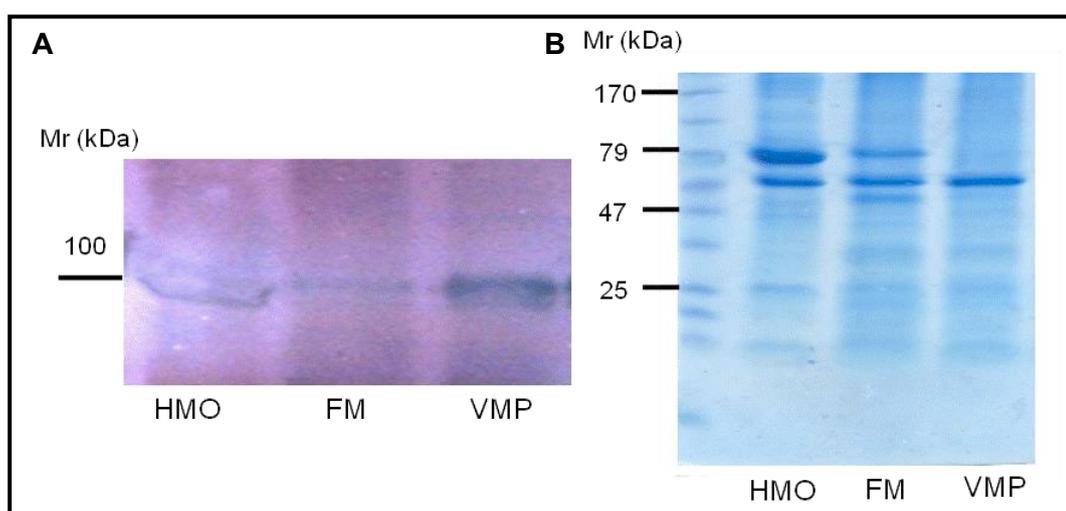


Fig. 10. Estimación del enriquecimiento de membrana plasmática en las distintas fases de purificación de las vesículas de membrana plasmática a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Las fracciones subcelulares mostradas: Homogenado (HMO), fracción microsomal (FM) y vesículas de membrana plasmática (VMP) fueron obtenidas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos y a la Tabla IV, Fig. 7. Se cargaron 40 μ g de proteína membranar por carril en un gel SDS-PAGE que luego fue transferido a una membrana de PVDF. En el proceso del Western se usó como primer anticuerpo un anticuerpo contra la isoforma 3 ATPasa de H⁺ de *Arabidopsis thaliana*. **A.** Inmunoréplica. **B.** Gel teñido con azul de Coomassie.

3. Ultraestructura de las vesículas de membrana plasmática.

Un parámetro adicional de pureza de las vesículas de membrana plasmática fue el análisis de su ultraestructura vista por microscopia electrónica de transmisión. Una vez aisladas la FM y las VMP a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, se obtuvieron cortes que fueron teñidos con acetato de uranilo. Las micrografías electrónicas se muestran en la Fig. 11 A. Puede observarse que las estructuras obtenidas en la FM de la preparación mostraron un patrón y tamaño heterogéneo de entre 140 – 420 nm de diámetro con un material electrodenso abundante. Las VMP mostraron un patrón y tamaño homogéneo entre 60 – 280 nm con poco material electrodenso en comparación con la FM, implicando un enriquecimiento de VMP con respecto a la

FM. En los casos de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, también decidimos evaluar la ultraestructura de las preparaciones membranales (Fig. 11 B).

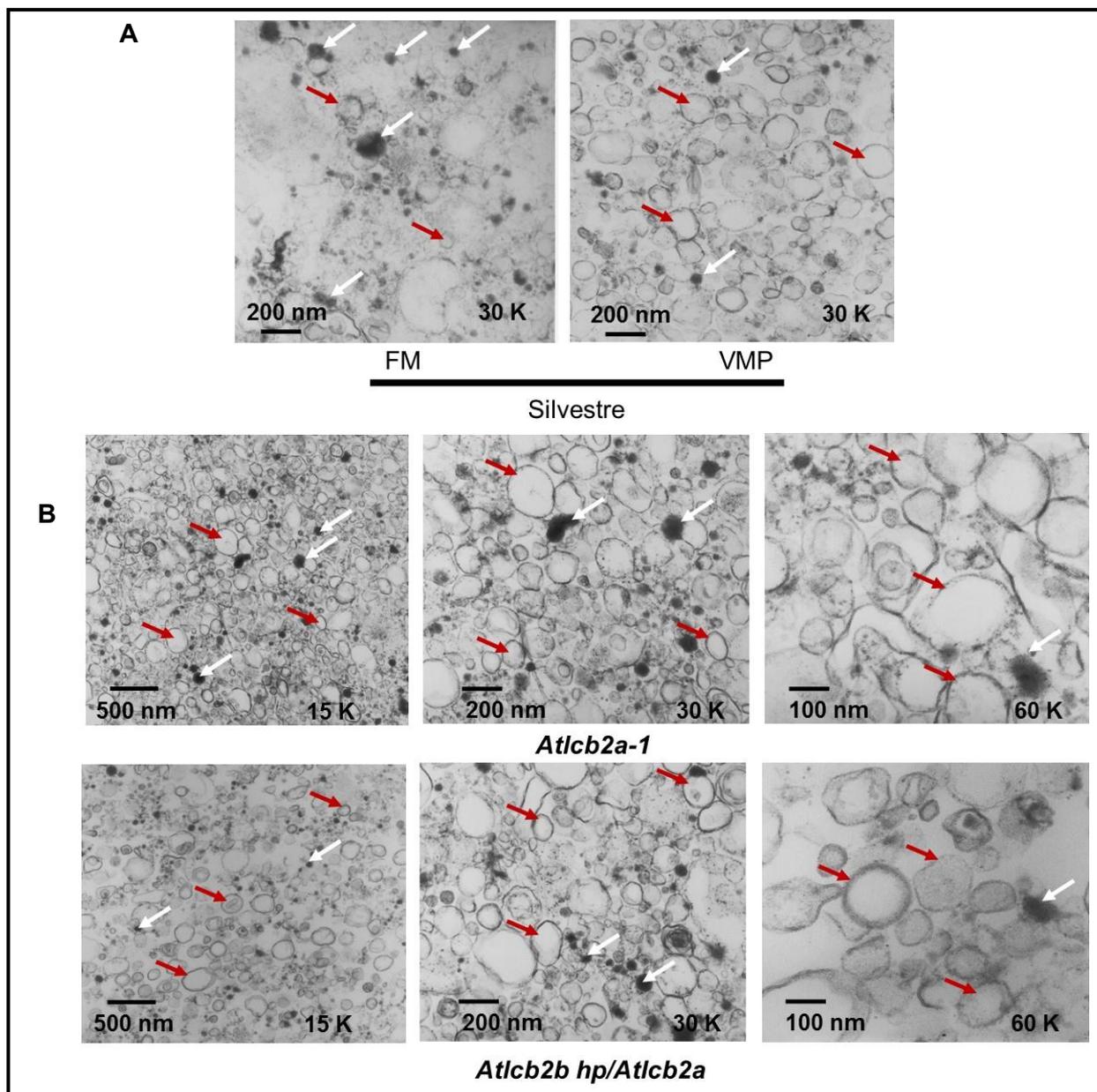


Fig. 11. Ultraestructura de las VMP provenientes de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Micrografías electrónicas de transmisión de: **A.** la fracción microsomal (FM) y las vesículas de membrana plasmática (VMP) provenientes de hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre. **B.** VMP provenientes de hojas de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con diferente magnificación. Las flechas blancas indican la presencia de material electrodenso y las flechas rojas indican la presencia de estructuras vesiculares. Las fracciones membranales fueron purificadas como se menciona en la Tabla VI y en la Fig. 9.

En ambos casos se observó la presencia de estructuras vesiculares con morfología y tamaño entre 60 – 240 nm similares a las encontradas en la fracción purificada de VMP a partir de silvestre. Además, como se puede ver en estas dos líneas, a mayor nivel de magnificación, la MP está claramente delineada presentando estructuras más o menos esféricas como ya ha sido

reportado para las VMP en otras especies vegetales [Sánchez-Nieto *et al* 1997, Mongrand *et al* 2004, Carmona 2006, Lefebvre *et al* 2007]. Con estos resultados podemos decir que la pureza de la preparación membranal es adecuada en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* estudiadas y es confiable para las determinaciones posteriores.

II. Efecto de la modificación de esfingolípidos endógenos sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ en hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

1. Actividad de la ATPasa de H⁺ en VMP de hojas de *Arabidopsis thaliana* en la línea silvestre y en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que expresan contenidos diferentes de ceramidas/esfingolípidos complejos.

Una vez optimizadas las condiciones de purificación de VMP a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, se aislaron VMP de hojas de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en ausencia y presencia del insecticida Intrepid que contiene metoxifenazida, inductor del silenciamiento del gene *atlcb2b* en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, esperando que tras la aplicación de la metoxifenazida, esta línea expresará niveles disminuidos de la serina palmitoil transferasa (SPT) como se mencionó anteriormente. Con objeto de verificar esto, en nuestro laboratorio se realizó una evaluación semicuantitativa de los transcritos de la SPT en diferentes tiempos después de la exposición al inductor, encontrando que los niveles disminuían hasta un 40% a partir de las 24 h después de exposición al inductor en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* y se mantenían en ese nivel hasta cuatro días después de la exposición al Intrepid [Carmona 2007]. De acuerdo a esto, se evaluaron cuatro tiempos diferentes: 0, 3, 6 y 7 días posteriores a la aplicación de la metoxifenazida ya que los datos de cuantificación de bases de cadena larga endógenas totales (precursores de esfingolípidos) se han medido a ese tiempo [Dietrich *et al* 2008].

El fenotipo de las hojas expuestas a la metoxifenazida (inductor) se puede observar en la Fig. 12, en la cual, se ve que en la silvestre y la línea *Atlcb2a-1* no presentan cambios en las hojas a lo largo del periodo de exposición al inductor, en cambio, en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, hasta los 6 días posteriores a la aplicación del inductor, se puede observar puntos cloróticos en las hojas, acentuándose este efecto en las plantas que estuvieron expuestas por 7 días (Fig. 12). Estos resultados son consistentes con los reportados anteriormente por el grupo del Dr. Cahoon, quienes reportaron la presencia de clorosis, seguida de necrosis en las plantas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a los 7 días de exposición al inductor [Dietrich *et al* 2008].

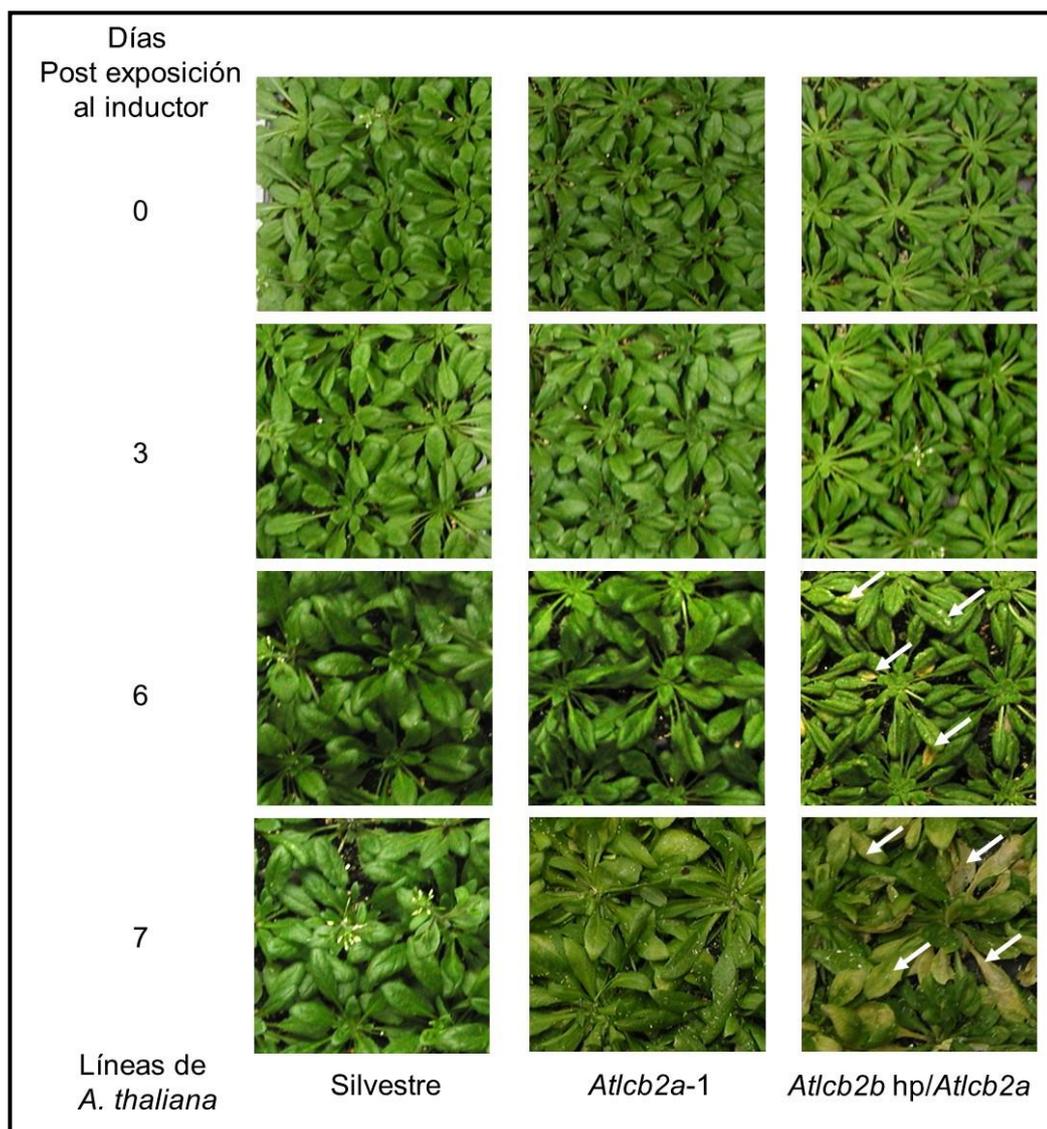


Fig. 12. Fenotipo de las plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuestas al inductor. Se presentan las líneas de *Arabidopsis thaliana* de 8 semanas de edad, expuestas por 0, 3, 6 y 7 días al inductor (metoxifenazida), según se indica. La presencia de puntos cloróticos se indica con flechas blancas. Fotos representativas de 3 lotes de plantas cosechadas independientemente para silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a los 0, 3, 6 y 7 días de exposición al inductor.

Para evaluar el efecto de la supresión inducible del gene *AtLCB2b* sobre la actividad de la ATPasa de H^+ , se determinó la actividad total de la ATPasa, la actividad de la ATPasa de H^+ sensible a Na_3VO_4 y la actividad de la ATPasa de H^+ insensible a inhibidores a los 0, 3, 6 y 7 días posteriores a la exposición al inductor. Como condiciones clásicas para medir la actividad de la ATPasa de H^+ son inhibirla con vanadato y, considerando que las otras enzimas que contribuyen a la hidrólisis de ATP son tanto fosfatasa como la ATPasa de tonoplasto, era conveniente inhibir a estas últimas para dejar a la ATPasa de H^+ activa en el transcurso del ensayo de hidrólisis de ATP.

Tabla VII. Actividad de la ATPasa de H⁺ de VMP de hojas de *Arabidopsis thaliana* con modificación en el contenido de los niveles de esfingolípidos endógenos totales. Los ensayos de hidrólisis de ATP se hicieron con 5 µg de proteína membranal. Se presenta la actividad de ATPasa total, la actividad de ATPasa sensible a Na₃VO₄ y la actividad de ATPasa insensible a inhibidores. Los valores están expresados como promedio ± error estándar. Las determinaciones de actividad provienen de tres lotes de plantas crecidas independientemente y que generaron cuatro preparaciones membranales independientes. Las plantas fueron expuestas a metoxifenazida por 0, 3, 6 y 7 días.

Días Post-inducción	Vesículas de membrana plasmática	Silvestre	<i>Atlcb2a-1</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>
0	Hidrólisis total de ATP (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	167.4 ± 14.4	157.8 ± 16.7	171.0 ± 15.4
	Actividad de ATPasa de H ⁺ sensible a Na ₃ VO ₄ (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹) / (% de inhibición por Na ₃ VO ₄)	88.4 ± 10.0 (58.7 ± 2.7)	93.2 ± 11.9 (58.9 ± 3.1)	112.8 ± 12.9 (61.8 ± 1.3)
	Actividad de ATPasa de H ⁺ insensible a inhibidores (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	115.5 ± 13.1	98.5 ± 14.9	118.8 ± 16.0
3	Hidrólisis total de ATP (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	119.1 ± 28.9	165.1 ± 18.3	153.9 ± 16.7
	Actividad de ATPasa de H ⁺ sensible a Na ₃ VO ₄ (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹) / (% de inhibición por Na ₃ VO ₄)	85.1 ± 22.3 (71.3 ± 4.2)	114.8 ± 11.9 (58.0 ± 2.1)	101.0 ± 12.9 (58.5 ± 1.3)
	Actividad de ATPasa de H ⁺ insensible a inhibidores (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	72.3 ± 27.8	118.8 ± 17.6	121.5 ± 15.0
6	Hidrólisis total de ATP (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	175.7 ± 28.9	111.3 ± 15.4	286.4 ± 18.3
	Actividad de ATPasa de H ⁺ sensible a Na ₃ VO ₄ (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹) / (% de inhibición por Na ₃ VO ₄)	111.6 ± 22.3 (63.4 ± 1.3)	80.1 ± 11.1 (63.5 ± 2.4)	161.8 ± 14.1 (62.1 ± 1.6)
	Actividad de ATPasa de H ⁺ insensible a inhibidores (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	114.6 ± 27.8	79.9 ± 14.9	208.8 ± 17.6
7	Hidrólisis total de ATP (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)		207 ± 15.4	260.2 ± 49.3
	Actividad de ATPasa de H ⁺ sensible a Na ₃ VO ₄ (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹) / (% de inhibición por Na ₃ VO ₄)		81.7 ± 1.8 (39.6 ± 3.2)	77.9 ± 2.9 (30.8 ± 4.7)
	Actividad de ATPasa de H ⁺ insensible a inhibidores (nmol de Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)		101.3 ± 7.4	204.0 ± 49.4

Así, como se muestra en la Tabla VII y la Fig.13, se puede observar que la actividad de la ATPasa insensible a inhibidores se mantuvo sin variación en la silvestre a los 0, 3, 6 y 7 días en los que se midió la actividad de hidrólisis de ATP. La línea *Atlcb2a-1* tampoco tuvo variaciones significativas a lo largo de los cuatro diferentes tiempos en los cuales se midió la actividad de ATPasa y, como se puede ver (Tabla VII, Fig. 13), su actividad fue similar a la línea silvestre en las tres formas de actividad que se midió, desde la actividad total, la actividad insensible a Na_3VO_4 y la insensible a inhibidores. En la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* se mantuvo el mismo comportamiento en los dos primeros tiempos (0 y 3 días), cuando se ve que la actividad de ATPasa de H^+ fue igual que en la silvestre y en la línea *Atlcb2a-1*. Sin embargo, al sexto día de exposición al inductor en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a-1*, la actividad de la ATPasa de H^+ medida como insensible al Na_3MoO_4 y KNO_3 se incrementó un 55%, nivel que se mantuvo en el séptimo día de exposición al inductor (Tabla VII, Fig. 13). Con respecto al día 7, lo que se observa es una actividad anómala en la línea silenciada. Muy probablemente se debe a un deterioro generalizado y de muerte manifiesta de la plantas, las cuales ya no podrían tener unas membranas con funciones y componentes intactos.

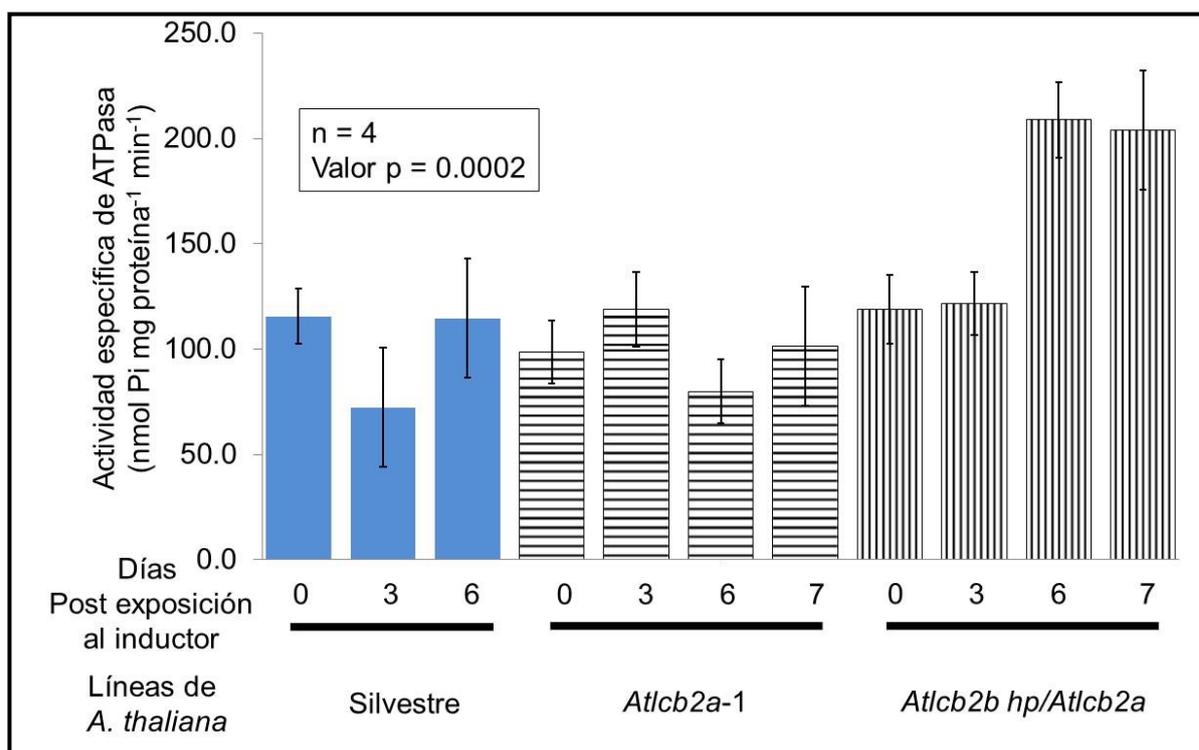


Fig. 13. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sobre la actividad de la ATPasa de H^+ insensible a inhibidores de la membrana plasmática a diferentes tiempos de exposición al inductor. La actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática fue medida por hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores de fosfatasa y de ATPasa de tonoplasto en VMP obtenidas de plantas tratadas y sin tratar con el inductor del silenciamiento del gene *AtLCB2b* de la SPT en diferentes días. Se muestran los resultados de tres cosechas diferentes con cuatro preparaciones membranales independientes. Los valores están expresados como promedio \pm error estándar. Los ensayos de hidrólisis de ATP se hicieron con 5 μg de proteína membranal.

Para saber si los resultados obtenidos mostraban diferencias significativas entre la silvestre y las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, se hizo un análisis de varianza de una vía. En este análisis se tomaron las medias de la actividad de la ATPasa insensible a inhibidores correspondientes a las tres líneas de plantas a los 3 y 4 diferentes tiempos seleccionados. En este análisis de varianza de una vía se obtuvo un valor $p = 0.0002$, lo que nos decía que al menos una de las medias de las muestras variaba significativamente de las demás, pero no nos decía que muestra. Por lo tanto, se realizó una prueba post-hoc llamada prueba de DUNCAN, la cual hace una comparación múltiple entre las medias [Hintza 2007], así se determinaría cuál o cuáles de las medias muestrales eran diferentes a las demás.

Así, con un nivel de confianza del 95%, esta prueba indicó que las líneas silvestre en los tres diferentes tiempos a los cuales fue expuesta al inductor no mostraba diferencia entre sí, además, la línea *Atlcb2a-1* en los cuatro diferentes tiempos en los cuales se analizó, tampoco mostró diferencias significativas entre cada una de las condiciones en las cuales se llevó a cabo el ensayo. En cambio, mientras que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* no mostraba diferencias significativas en los dos primeros tiempos, a los 6 y 7 días de exposición al inductor (Tabla VII, Fig. 13) si mostró diferencias significativas con respecto a la silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

2. Niveles de la ATPasa de H⁺ y proteína 14-3-3 en preparaciones de VMP de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana*.

El aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática encontrado en la línea con silenciamiento del gene *AtLCB2b* podría explicarse por una mayor cantidad de ATPasa de H⁺ en la membrana, por lo cual exploramos por inmunoréplica, si había cambios de esta enzima en las preparaciones membranales. En el experimento de la Fig. 14 se estimó la cantidad de ATPasa de H⁺ utilizando dos diferentes anticuerpos contra la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de plantas. En la Fig. 14 A se utilizó un anticuerpo de ATPasa de H⁺ de betabel y en la Fig. 14 C se utilizó un anticuerpo contra la ATPasa de *Arabidopsis thaliana* isoforma 3 (AHA3). Como se puede ver en la Fig. 14 A utilizando el anticuerpo contra la ATPasa de betabel, se observó una banda fina con peso molecular de 100 kDa que corresponde al reportado para la ATPasa de H⁺ de plantas y no mostró diferencias aparentes entre las distintas líneas como se observó en el análisis densitométrico de cuatro inmunorélicas (datos no mostrados). A estos análisis densitométricos, se hizo un análisis de varianza de una vía entre las tres líneas de plantas a 3 diferentes tiempos, en los cuales se midió la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. En este análisis de varianza de una vía, se obtuvo un valor $p = 0.3937$ y un nivel de confianza del 95%, indicando con ello que ninguna de las muestras variaba significativamente de las demás en la cantidad de la ATPasa de H⁺ presente en la membrana plasmática. El control de cargado correspondiente no presentó diferencias en intensidad, evidenciando que había cantidades similares de proteína en todas las muestras comparadas (Fig.

14 B). En la Fig. 14 C, se presenta la inmunoréplica correspondiente a la línea silvestre a los tres diferentes tiempos de exposición al inductor que fueron 0, 3 y 6 días, revelando con el anticuerpo contra la isoforma 3 de la ATPasa de H⁺ de *Arabidopsis thaliana*. Se puede observar que no hay cambios en la intensidad de las bandas correspondientes

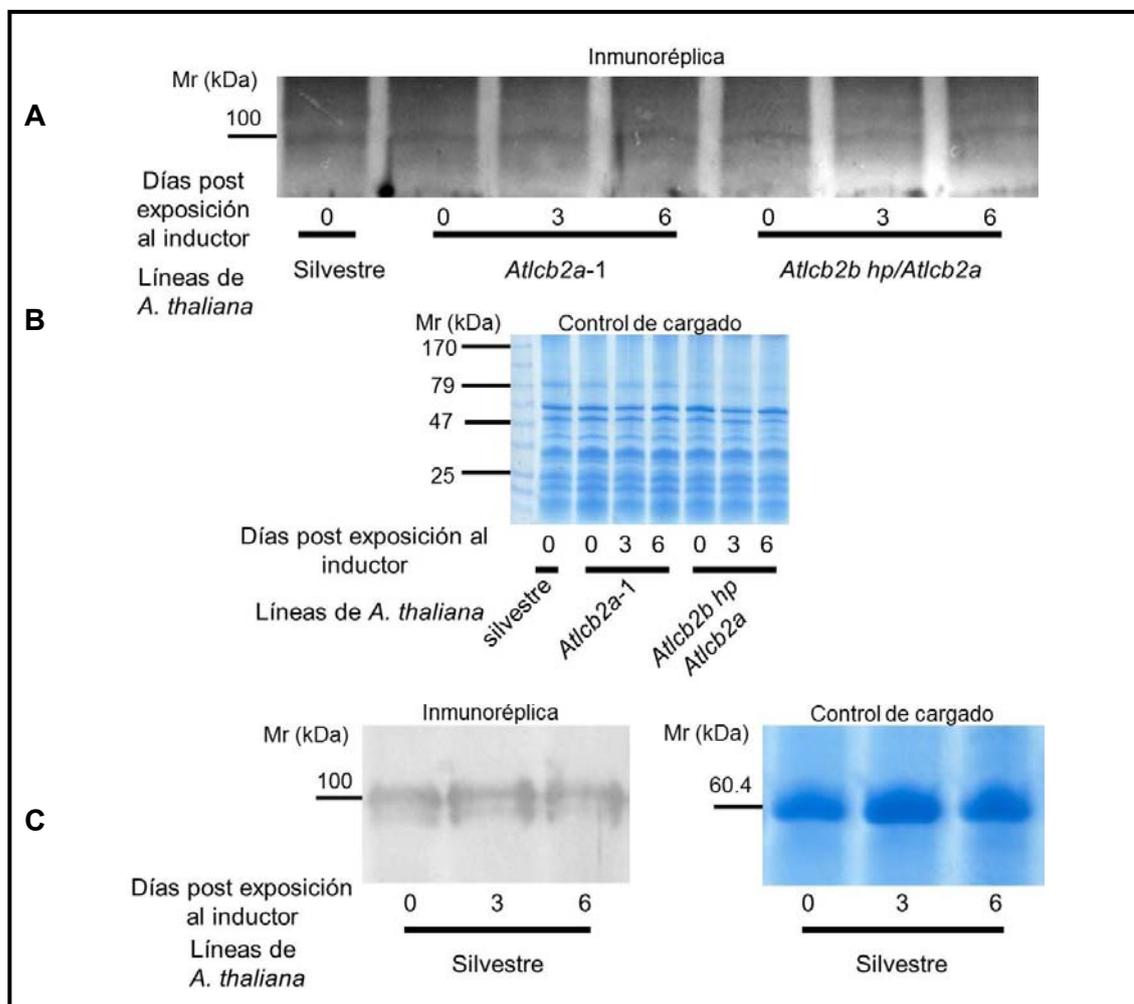


Fig. 14. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT sobre la cantidad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en *Arabidopsis thaliana* silvestre y de las líneas mutantes a diferentes tiempos de exposición al inductor. Las VMP se aislaron de las plantas de las líneas de *Arabidopsis* indicadas y se separaron electroforéticamente aplicando 40 µg de proteína membranal por carril. Posteriormente, las proteínas se transfirieron según el protocolo de réplica en Western. **A.** Se presenta la inmunoréplica de las preparaciones membranales de silvestre sin exposición al inductor y de las líneas *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* a 3 diferentes tiempos de exposición al inductor. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra la ATPasa de H⁺ de betabel. **B.** Gel teñido con azul de Coomassie. **C.** Inmunoréplica de las preparaciones membranales de silvestre a 3 diferentes tiempos de exposición al inductor. Se utilizó un anticuerpo contra la ATPasa de *Arabidopsis thaliana* isoforma 3 (AHA3). Se muestra el resultado representativo de 4 inmunorélicas provenientes de 3 lotes de plantas cosechadas independientemente con 4 preparaciones membranales diferentes.

A un peso de 100 kDa, la banda reactiva al anticuerpo de betabel era la misma que la que reaccionaba con el anticuerpo homólogo y que no hay diferencias apreciables en la cantidad de proteína entre estos tres diferentes tiempos de exposición al inductor. En el control de cargado correspondiente a esta inmunoréplica, no se apreció diferencia en la intensidad de las bandas.

Otra posibilidad para explicar el aumento de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor por 6 y 7 días era que la proteína reguladora 14-3-3, que ha sido reportada como un regulador importante de la actividad de la ATPasa de H⁺ en plantas [Kinoshita y Shimazaki 1999, Schaller y Oecking 1999, Morsomme y Boutry 2000, Fuglsang *et al* 2003] estuviera aumentada en la membrana plasmática de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* posiblemente debido a un decremento en la biosíntesis de esfingolípidos totales, por tanto, se decidió estimar si los niveles de esta proteína variaban en las preparaciones membranales.

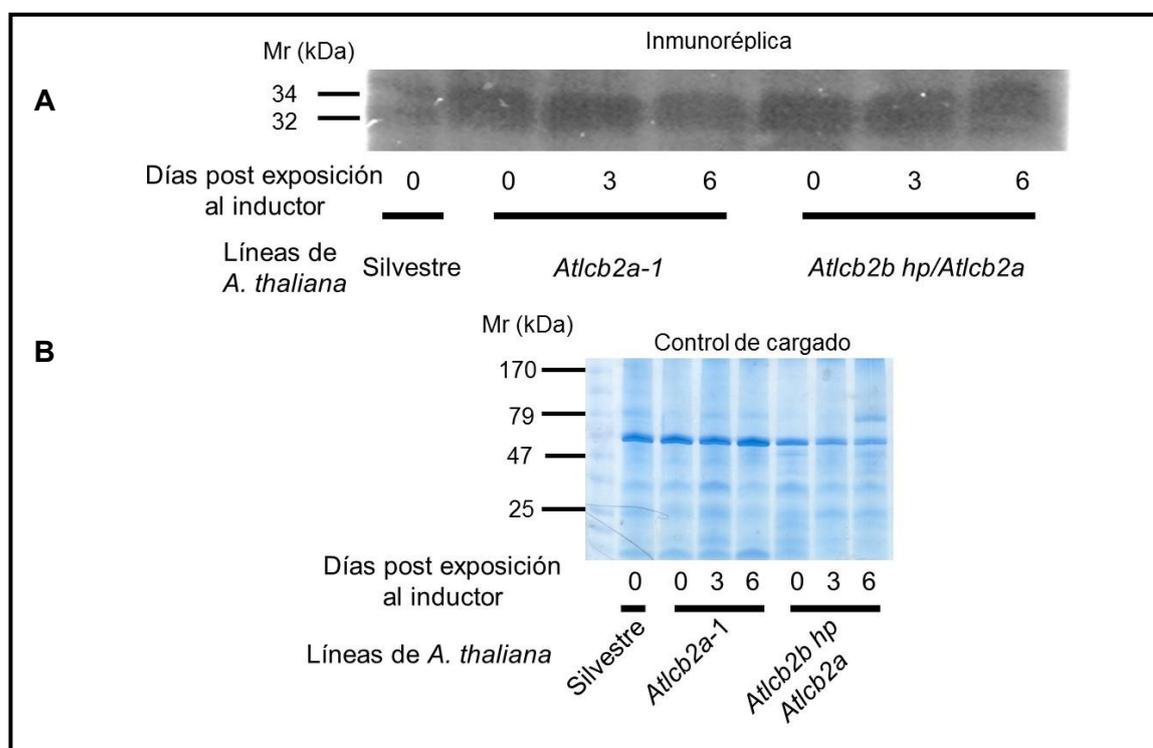


Fig. 15. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sobre la cantidad de proteína 14-3-3 en la membrana plasmática. Inmunoréplica de VMP de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* a diferentes tiempos de exposición al inductor. Se cargaron 40 μ g de proteína membranal por carril. **A.** Se presenta la inmunoréplica de las preparaciones membranales de silvestre sin exposición al inductor y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 3 diferentes tiempos de exposición al inductor. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra la proteína 14-3-3 isoforma β de humano. **B.** Gel teñido con azul de Coomassie. Se muestra el resultado representativo de 4 inmunorélicas de 3 lotes de plantas cosechadas independientemente con 4 preparaciones membranales diferentes.

En la Fig. 15 A se presenta la inmunoréplica contra la proteína 14-3-3, detectándose dos bandas con un peso molecular de aproximadamente 32 y 34 kDa cercanos al peso molecular

reportado de la proteína reguladora 14-3-3 que es de 30 kDa. Como se puede ver en la Fig. 15 A la intensidad de las bandas de 30 kDa no varían apreciablemente entre las muestras expuestas a diferentes tiempos al inductor del silenciamiento del gene *AtLCB2b* de la SPT en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Se hizo un análisis densitométrico a partir de cuatro inmunoréplicas (datos no mostrados), y posteriormente se hizo un análisis de varianza de una vía entre las tres líneas de plantas en 3 diferentes tiempos. En este análisis de varianza de una vía, se obtuvo un valor $p = 0.0233$ y un nivel de confianza del 95%, indicando que la línea *Atlcb2a-1* al día 0 de exposición al inductor y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a los 3 días de exposición al inductor, variaban significativamente de las demás en la cantidad de la proteína reguladora 14-3-3 presente en las preparaciones membranales. El control de cargado, no presentó diferencias en la intensidad de las bandas, lo cual nos indicó que había cantidades similares de proteína en todas las muestras comparadas (Fig. 15 B).

III. Valoración de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por un parámetro fisiológico en las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*.

Con el objeto de obtener una evidencia fisiológica indicativa de la que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* presentaba una mayor actividad de ATPasa de H⁺, se recurrió a un ensayo de acidificación para las raíces de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, ya que al estar la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática más activa en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en el sexto y séptimo día de exposición al inductor, era de esperarse que bombearía más H⁺ al exterior celular durante el crecimiento radicular. Se ha reportado que, en tejidos con elongación celular, la ATPasa de H⁺ participa activamente [Samuels *et al* 1992, Jone *et al* 1995, Jahn *et al* 1998]. Así, se hicieron los ensayos usando el medio sólido de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* suplementado con el colorante púrpura de bromocresol como indicador del cambio de pH [Merlot *et al* 2007].

Como se puede ver en la Fig. 16, se hizo un análisis fotográfico a los 0, 2, 4 y 7 días de crecimiento a los cuales se exponían plántulas de *Arabidopsis thaliana* al medio con indicador de pH, en condiciones en las que las plántulas se ponían en ausencia o presencia del inductor. En cada tratamiento se presenta en el lado izquierdo a la línea *Atlcb2a-1* y en lado derecho a la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Todas las condiciones en el lado izquierdo de la Fig. 16 son todas en ausencia del inductor y las de la derecha en su presencia. En el tiempo cero, sin inductor, cuando recién han sido colocadas las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, se observó una coloración roja intensa del medio. Al segundo día, se ve una ligera acidificación indicada por la presencia de un halo de color amarillo cercano a las raíces de cada una de las líneas. Al cuarto día, este halo amarillo se notó más extenso, sin embargo, no hay diferencias apreciables en el tamaño del halo entre una línea y otra, por lo que están acidificando de manera similar el medio en el cual se encuentran. Al séptimo día del ensayo, la acidificación está ya extendida a todo el agar y no se apreciaron diferencias en el grado de acidificación entre las dos líneas.

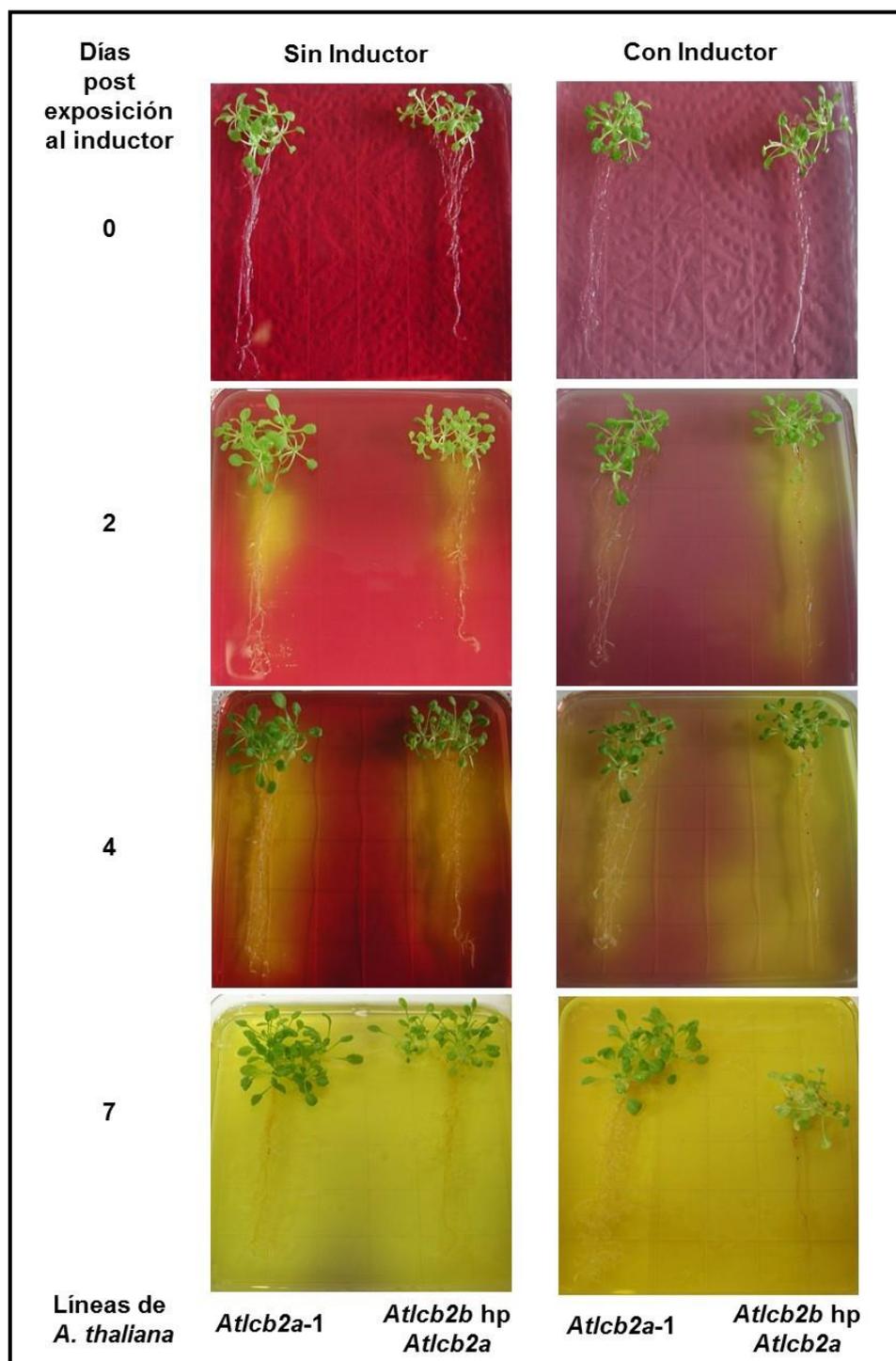


Fig. 16. Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT sobre acidificación del sistema de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Visualización de la acidificación del medio alrededor del sistema de raíces de plántulas de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de 3 a 4 semanas de edad usando un ensayo colorimétrico basado en la sensibilidad del colorante púrpura de bromocresol al cambio de pH. Se pusieron 5 plántulas por línea de *Arabidopsis thaliana*. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares.

En las plántulas expuestas al inductor (todo el lado derecho de la Fig. 16), igual que en la columna anterior, del lado izquierdo se muestra la línea *Atlcb2a-1* y del lado derecho la línea

Atlcb2b hp/Atlcb2a. En este panel se puede apreciar que al tiempo cero el agar se ve ligeramente blanco, pero este cambio en la coloración es debido a la presencia del inductor y no a un cambio de pH la comparación en exactamente la misma condición de fondo con el mismo color es la que se puede hacer entre el control que son las plántulas de la línea *lcb2a-1* y las plántulas con la horquilla de RNA. Ya que ambos tipos de plantas están crecidas en el mismo medio y con el mismo fondo, la comparación es totalmente válida. Al segundo día de ensayo, se puede ver la acidificación del medio por la presencia del halo amarillo cerca de las raíces de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*. En este segundo día, se puede observar que no hay una mayor acidificación por parte de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en comparación con la línea *Atlcb2a-1*. Al cuarto día del ensayo, se aprecia una diferencia en la extensión del halo entre la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Se puede ver además, que el grado de acidificación es mayor que incluso al mismo tiempo en el panel sin inductor al compararse con ambas líneas. Al séptimo día del ensayo, se puede apreciar que la acidificación está completamente extendida en la caja Petri y ya no hay diferencias apreciables en la acidificación entre las dos líneas. Sin embargo, se puede observar a este tiempo (7 días) que hay aparición de hojas cloróticas en las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, además de que su crecimiento fue menor en comparación con la línea *Atlcb2a-1*.

DISCUSIÓN

La ATPasa de H⁺ (EC 3.6.3.6) es una enzima transmembranal de la membrana plasmática (MP) que es clave para la célula vegetal, ya que de ella dependen los procesos de elongación celular, transporte de nutrientes, apertura y cierre de estomas y regulación del pH intra y extracelular [Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Al ser una proteína transmembranal, su actividad es susceptible de modificarse por el entorno lipídico. Al respecto, existen reportes en la literatura que indican que diferentes glicerolípidos y esteroides membranales, así como detergentes, modifican positiva o negativamente su actividad (ver Tabla I) [Brauer y Tu 1989, Sandstrom y Cleland 1989, Cooke *et al* 1994, Gomès *et al* 1996, Grandmougin-Ferjani *et al* 1997]. En cuanto a los esfingolípidos, otro grupo de lípidos de membrana muy abundantes en las plantas, hay algunas evidencias en levadura acerca del requerimiento de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena muy larga para el transporte de la ATPasa de H⁺ hasta la MP [Gaigg *et al* 2005, Gaigg *et al* 2006, Toulmay y Schneiter 2007]. Varios reportes ubican consistentemente a la ATPasa de H⁺ de diversos tejidos vegetales en balsas lipídicas, las cuales están enriquecidas en esfingolípidos y esteroides [Mongrand *et al* 2004, Shahollari *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Lefebvre *et al* 2007]. Sin embargo, hasta el momento, no hay ningún trabajo que indique que la ATPasa de plantas requiera de esfingolípidos para su función, o cómo este tipo de lípidos pueda afectar su actividad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de esfingolípidos celulares sobre la actividad de la enzima, utilizando como estrategia experimental la disminución de la biosíntesis de *novo* de esfingolípidos endógenos totales en una línea de *Arabidopsis thaliana* (línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*), en la que se puede inducir un menor contenido de esfingolípidos complejos totales y sus precursores.

I. Purificación de VMP de hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre.

El primer objetivo de esta tesis consistió en obtener vesículas de membrana plasmática (VMP) de una pureza adecuada a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana*, ya que a partir de estas preparaciones membranales se evaluaría el efecto del cambio en el entorno lipídico membranal sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP. El motivo de partir de una fracción enriquecida en VMP obedeció a que existen otras ATPasas en diferentes endomembranas como son la ATPasa de Ca²⁺ que se encuentra en el retículo endoplásmico y las ATPasas de H⁺ del tonoplasto en la vacuola, el aparato de Golgi, la mitocondria y el cloroplasto (por ejemplo). Ya que la actividad de la enzima fue determinada por su capacidad de hidrólisis de ATP, era necesario contar con preparaciones enriquecidas en VMP de buena calidad, para que la actividad enzimática determinada proviniera de la ATPasa de H⁺ de la MP.

El sistema de partición de fases de dos polímeros acuosos [Larsson *et al* 1994] se ha usado en el laboratorio para la purificación de VMP provenientes de diferentes tejidos y especies

vegetales [Sánchez-Nieto *et al* 1997, Gutiérrez 2005, Carmona 2006]. Así, en el presente trabajo, establecimos las condiciones para el aislamiento de VMP a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* utilizando este sistema. Con objeto de evaluar la calidad de las VMP obtenidas de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* empleadas en este estudio se utilizaron los siguientes criterios de pureza: actividad de enzimas marcadoras, inmunodetección de la ATPasa de H⁺ de la MP y análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión.

La actividad de enzimas marcadoras se midió a través de la hidrólisis de ATP y empleando inhibidores específicos de estas actividades como está ampliamente documentado en la literatura [Briskin *et al* 1987, Larsson *et al* 1994, Mongrand *et al* 2004]. El parámetro para evaluar el enriquecimiento de la MP fue la actividad de la ATPasa de H⁺, misma que fue medida por dos condiciones: una en la que se añade el Na₃VO₄ para inhibir específicamente a la enzima y otra en la que se añaden los inhibidores de otras enzimas que también hidrolizan ATP, como la ATPasa del tonoplasto (en la vacuola) y las fosfatasas. Se encontró que las VMP obtenidas a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre, presentaron una pureza adecuada, ya que la preparación mostró un enriquecimiento de 2.9 veces con respecto al homogenado y de 6.3 veces con respecto a la fracción microsomal en la ATPasa de H⁺ sensible a vanadato (Na₃VO₄). Este enriquecimiento es similar a los enriquecimientos reportados en hojas de *Hordeum vulgare* [Briskin *et al* 1987], *Nicotiana tabacum* [Briskin *et al* 1987, Mongrand *et al* 2004, Carmona 2006] y *Phaseolus vulgaris* [Carmona 2006] (Tabla VI, Fig. 9). En el caso de la actividad de ATPasa de H⁺ de la MP, medida como hidrólisis de ATP insensible a inhibidores, se observó un enriquecimiento 15.2 veces con respecto al homogenado y de 3.8 veces con respecto a la fracción microsomal. Si bien, éste fue un valor bajo considerando que se esperaba un enriquecimiento similar al encontrado con la ATPasa sensible a vanadato (6.3 veces), cabe destacar que el valor promedio de actividad fue de 102 ± 23.6 nmol Pi mg proteína⁻¹ min⁻¹ (promedio \pm desviación estándar), que es semejante al de la ATPasa sensible a vanadato que fue de 109 ± 9.7 nmol Pi mg proteína⁻¹ min⁻¹ (promedio \pm desviación estándar), indicando que es una forma confiable de medir la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Con respecto a la actividad de las otras enzimas marcadoras, en las preparaciones de VMP se detectó baja actividad de la ATPasa mitocondrial, la ATPasa de tonoplasto y de fosfatasas, lo cual indicó que en estas preparaciones de VMP hay bajos niveles de membranas mitocondriales y de tonoplasto. Resultado acorde con lo reportado para preparaciones de VMP de otras especies vegetales obtenidas por la misma técnica [Briskin *et al* 1987, Carmona 2006].

Por la naturaleza de nuestro objetivo de trabajo y considerando que no trabajamos con una enzima purificada, resultaba indispensable contar con una preparación de VMP de una pureza adecuada para poder determinar el efecto del entorno lipídico sobre la ATPasa de H⁺, sin que se viera enmascarado por la actividad de otras enzimas que hidrolizaran ATP. Por tanto, nos apoyamos en otros criterios de evaluación de pureza de las VMP. Uno de ellos fue el ensayo de

inmunoréplica utilizando un anticuerpo específico contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática mismo que ha sido usado en otros sistemas vegetales [Borner *et al* 2005, Carmona 2006]. El resultado reveló un enriquecimiento de la ATPasa de H⁺ del doble en las fracciones de VMP comparadas con las fracciones del homogenado y la fracción microsomal, resultado que es similar a lo reportado por Borner *et al* (2005) y Carmona (2006).

Finalmente, el otro criterio en el que nos apoyamos fue el análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión, mismo que reveló un enriquecimiento de formaciones vesiculares en las preparaciones de VMP en las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* estudiadas. Estas estructuras, como ya se describió en la sección de resultados, presentaban patrones similares a los de otros tejidos vegetales reportados en la literatura cuya morfología reflejaba una buena pureza [Sánchez-Nieto *et al* 1997, Mongrand *et al* 2004, Carmona 2006, Lefebvre *et al* 2007]. Por tanto, es una evidencia adicional que confirma el enriquecimiento en las preparaciones de VMP obtenidas.

Considerando la actividad de enzimas marcadoras, la detección por anticuerpos y el análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión, podemos afirmar que la preparación de las VMP tuvo una pureza adecuada.

Además, el presente estudio de purificación de VMP de *Arabidopsis thaliana* supera en número a los parámetros de evaluación de pureza utilizados en la literatura para la obtención de preparaciones análogas [Briskin *et al* 1987, Larsson *et al* 1994, Sánchez-Nieto *et al* 1997, Mongrand *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Lefebvre *et al* 2007].

II. Efecto de la modificación del contenido de esfingolípidos endógenos sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

Desde los primeros reportes en los que se sugería que la ATPasa de H⁺ era una enzima integral de la MP que requería de lípidos para mantener su actividad [DuPont y Leonard 1980], hasta los reportes en los que se incluye a la ATPasa de H⁺ como una enzima residente en balsas lipídicas [Mongrand *et al* 2004, Shahollari *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Morel *et al* 2006, Laloi *et al* 2007, Lefebvre *et al* 2007] y por las evidencias que se encontraron en nuestro laboratorio de que al modificar los niveles de esfingolípidos endógenos, la actividad de esta enzima disminuía [Gutiérrez 2005, Vázquez 2007], resulta claro que es importante estudiar el ambiente lipídico de la ATPasa de H⁺ y como éste contribuye a su actividad. Por tanto, se exploró si la modificación del ambiente lipídico, específicamente el ambiente de esfingolípidos, tenía un efecto sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ en las VMP purificadas.

1. Fenotipo de las hojas de *Arabidopsis thaliana* en la línea silvestre y en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que expresan contenidos diferentes de esfingolípidos complejos y sus precursores.

Se utilizó una línea de *Arabidopsis thaliana* denominada *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, que al ser expuesta a la metoxifenazida nos permite contar con una planta con los niveles de esfingolípidos totales disminuidos y a partir de este material se hizo la obtención de preparaciones de VMP y observar el efecto que tiene la disminución de esfingolípidos totales sobre la ATPasa de H⁺.

En el presente trabajo se pudo observar que las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* no presentaron lesión alguna a lo largo de la exposición con el inductor. En la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* se pudo observar la aparición de manchas cloróticas a los 6 días de exposición al inductor. A los 7 días de exposición al inductor (sólo un día después) estos pequeños puntos cloróticos se hicieron extensivos a la hoja completa (Fig. 12). Este comportamiento de senescencia gradual en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* se ha explicado por una disminución de esfingolípidos complejos totales que llevan al deterioro membranal y celular, lo cual compromete la viabilidad celular de las plantas [Chen *et al* 2006, Dietrich *et al* 2008]. Es importante mencionar que el fenotipo mostrado por la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en nuestro laboratorio fue similar al reportado por Dietrich *et al* (2008). En éste reporte se observó que, al inducirse el silenciamiento del gene *AtLCB2b* en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* e inhibirse parcialmente la biosíntesis de esfingolípidos totales se presentaba, a los 5-7 días posteriores a la inducción, una clorosis extensiva en las hojas, seguida del desarrollo de lesiones necróticas y, eventualmente, la muerte de las plantas. Este fenotipo no se observó en respuesta a la aplicación de la metoxifenazida en las plantas silvestres o las plantas *Atlcb2a-1* [Dietrich *et al* 2008].

2. Actividad de la ATPasa de H⁺ en VMP de hojas de *Arabidopsis thaliana* en la línea silvestre y en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que expresan contenidos diferentes de esfingolípidos complejos y sus precursores.

Una vez que se obtuvieron plantas adultas de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* éstas fueron expuestas a la metoxifenazida por 0, 3, 6 y 7 días. A partir de estas condiciones se hizo el aislamiento de VMP y en estas preparaciones se determinó la actividad total de ATPasa, la actividad de la ATPasa de H⁺ en su modalidad sensible a Na₃VO₄, así como en la de insensible a inhibidores.

No se encontró variación significativa entre los valores promedio de actividad en la línea silvestre y *Atlcb2a-1* a los diferentes tiempos en los cuales se midió la actividad de ATPasa total, sensible a Na₃VO₄ ó insensible a inhibidores (Tabla VII, Fig. 13), lo que corrobora también que el inductor no tienen ningún efecto sobre estas líneas, de acuerdo a lo reportado por Dietrich *et al* (2008). Sin embargo, al sexto día de exposición al inductor, la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tuvo un incremento significativo en su actividad del 55% ($p = 0.0002$, α del 95%) y con respecto al día 7, lo que se observa es una actividad anómala en la línea

silenciada. Muy probablemente se debe a un deterioro generalizado y de muerte manifiesta de la planta, las cuales ya no podrían tener unas membranas con funciones y componentes intactos. se mantuvo similar al séptimo día de exposición al inductor (Tabla VII, Fig. 13).

Coincidentemente, como ha sido reportado por Dietrich *et al* (2008) después de 7 días, los niveles de esfingolípidos totales reportados en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* disminuían un 36% con respecto a la línea *Atlcb2a-1*. Basándonos en estos datos previamente reportados por Dietrich *et al* (2008) podemos sugerir que el aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ está asociado con la disminución de esfingolípidos totales.

3. Contenido de la ATPasa de H⁺ y de la proteína 14-3-3 en preparaciones de VMP de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana*.

Una menor actividad enzimática puede deberse a un menor nivel de enzima en cualquier sistema. Adicionalmente, reportes en la literatura con respecto a la ATPasa de H⁺ de la MP de levadura, se encontró que la inhibición de la biosíntesis de ceramidas de cadenas de ácidos grasos muy largas (26 átomos de carbono), modificaba el envío y la estabilidad de la ATPasa en la MP, así como su asociación a balsas lipídicas en la MP de la levadura [Gaigg *et al* 2005, Gaigg *et al* 2006]. Para explorar si el aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ estaba relacionado con un aumento del contenido de la enzima en la MP se hizo su inmunodetección en las VMP.

El análisis densitométrico de las bandas de 100 kDa de cuatro diferentes inmunorélicas para las muestras de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* en los diferentes tiempos (0, 3 y 6 días) de exposición al inductor reveló que no había diferencia entre los niveles de las bandas de 100 kDa reactivas al anticuerpo.

Las explicaciones probables de este resultado pueden ser: 1) La ATPasa de H⁺ es una de las enzimas con una vida media larga (\approx 11 h) en la membrana plasmática, así como muy abundante (25 %) en la superficie celular [Toulmay y Schneiter 2007], por lo que, probablemente, es difícil detectar algún cambio en el contenido de esta enzima en las preparaciones membranales. 2) Por el empleo de un anticuerpo heterólogo de betabel y un anticuerpo sólo contra la isoforma AHA3 en las inmunodetecciones, es probable que no detectara la presencia de todas las diferentes isoformas en hojas de *Arabidopsis thaliana* (AHA1, AHA2, AHA3 y la AHA11) [Alexandersson *et al* 2004, Alsterfjord *et al* 2004]. 3) Y que, el cambio en la actividad en la ATPasa de H⁺ asociada a los niveles de esfingolípidos endógenos totales se deba a un mecanismo que afecta la regulación de la actividad de la enzima (fosforilación, interacción con proteínas reguladoras por ejemplo RIN 4) y que no modifican los niveles de la enzima.

Considerando que uno de los mecanismos de regulación por los que la ATPasa de H⁺ aumenta su actividad es mediante la unión de la proteína 14-3-3 a su carboxilo terminal, el aumento en la actividad mostrada en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* podía deberse a una mayor cantidad de la proteína 14-3-3 asociada a la enzima. Por lo tanto, decidimos determinar la cantidad de la proteína 14-3-3 en nuestras preparaciones de VMP por inmunorélica. Nuestro

estudio mostró que la cantidad de proteína reguladora 14-3-3 no se afectó significativamente ($p = 0.0233$) en los tiempos 0 y 6 días en los cuales se realizó el ensayo en las preparaciones membranales provenientes de las diferentes líneas. Cabe señalar que, en los tiempos en los cuales hay una diferencia en la cantidad de proteína 14-3-3 (*Atlcb2a-1* a 0 días y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 3 días) estimada por densitometría no hubo correlación con los niveles de actividad en la ATPasa de H^+ . Sin embargo, el resultado debe tomarse con reserva, ya que el anticuerpo heterólogo que estamos usando podría reconocer sólo alguna(s) de la(s) isoforma(s) de la proteína 14-3-3 presente(s) en hojas de *Arabidopsis thaliana*, ya que existen varias como la GF14épsilon, GF14lambda, GF14omega, GF14chi, GF14phi, GF14nu y GF14upsilon [Alsterfjord *et al* 2004] de las 13 isoformas que se han detectado [Rosenquist *et al* 2001, Paul *et al* 2005]. Adicionalmente, hay que considerar que la proteína 14-3-3 puede estar asociada a otras proteínas de la MP [Paul *et al* 2005] Por tanto, nuestra forma de detectarla(s) no permitiría distinguir cuánta(s) o cual(es) de las isoformas estaría(n) unida(s) exclusivamente a la ATPasa de H^+ .

Con todas las salvedades anteriores, las inmunoréplicas donde se utilizó el anticuerpo contra la proteína 14-3-3 sugieren que los niveles de esta proteína no se modifican por el efecto del contenido de esfingolípidos endógenos, por lo cual se propone que la proteína 14-3-3 no es responsable del aumento en la actividad de la enzima en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a los 6 y 7 días de exposición al inductor.

III. Ensayo fisiológico de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

Con objeto de apoyar las observaciones del incremento en la actividad de la ATPasa de H^+ en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, se hizo un ensayo fisiológico con plántulas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Este ensayo consistió en estimar la acidificación producida por las raíces en crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, ya que se ha visto que en este proceso es necesaria la actividad de bombeo de H^+ mediada por la actividad de la ATPasa de H^+ , para promover la entrada de nutrientes en las raíces [Samuels *et al* 1992, Jones *et al* 1995, Jahn *et al* 1998].

En este trabajo se encontró que las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con exposición al inductor mostraron una mayor acidificación del medio comparada con la línea *Atlcb2a-1* (Fig. 16), indicando una mayor actividad de la ATPasa de H^+ en la MP de raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, resultado que es consistente con el aumento que se había observado en la actividad de la ATPasa de H^+ , de las hojas de la planta adulta de la misma línea.

La mayor acidificación encontrada puede deberse a la ATPasa de H^+ que en esta línea tenía una mayor actividad posiblemente asociada, como ya se ha discutido anteriormente, a cambios en el ambiente lipídico de la ATPasa de H^+ relacionados a la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos.

Se debe tomar en cuenta, en este punto, que la mayor acidificación observada provino de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de raíz, mientras que en el caso de las VMP, en las

que fue encontrada la actividad incrementada de la ATPasa de H⁺, estas se aislaron de las hojas de la planta. Es relevante por ello considerar que la ATPasa de H⁺ tiene isoformas específicas de tejido y, en *Nicotiana*, se ha demostrado que las isoformas pueden tener propiedades diferenciales cinéticas y de regulación [Arango *et al* 2003]. Más sin embargo, es factible que las isoformas de *Arabidopsis* que se expresan en hojas (AHA1, AHA2, AHA3 y AHA11) [Alsterfjord *et al* 2004] no difieran mucho de nuestros experimentos de las que se expresan en raíz (AHA1, AHA2 y AHA4) [<https://geneinvestigator.com/gv/plant.jsp>]. Esto podría deberse a que respondieran de manera similar al cambio en el ambiente de esfingolípidos. Sin embargo, no hay reportes donde se estudie la dependencia de las isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por los lípidos. Pero, si hay estudios acerca de la presencia de la ATPasa de H⁺ en balsas lipídicas obtenidas de diferentes tejidos como raíz, cotiledones y callos de *Arabidopsis thaliana* (hojas) (AHA1, AHA2, AHA4, AHA6, AHA8, AHA9 y AHA11) [Shahollari *et al* 2004, Borner *et al* 2005], de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* [Morel *et al* 2006] y de raíces de *Medicago truncatula* [Lefebvre *et al* 2007]. De acuerdo a lo anterior, es probable que las diferentes isoformas presentes diferencialmente en esos tejidos estén sujetas a la modulación por parte de esfingolípidos para su actividad. De ahí que resulte interesante la asociación entre una mayor acidificación en las raíces de plántulas y una activación de la ATPasa de H⁺ en las hojas de *Arabidopsis thaliana* con niveles disminuidos de esfingolípidos en ambas condiciones. Sugiriendo que la inhibición en la biosíntesis de esfingolípidos, en nuestro caso, afecta tanto a la ATPasa de H⁺ de hojas como también a la ATPasa de H⁺ en las raíces de *Arabidopsis thaliana*. Este resultado apoya la hipótesis de que el ambiente de esfingolípidos en el cual se encuentra la enzima es determinante para su función y que esto es una característica que puede afectar a la ATPasa de H⁺ de todas las especies vegetales.

IV. Modelo de la interacción esfingolípido proteína.

Para interpretar y explicar el resultado del aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ observado en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tras la inducción del silenciamiento de la SPT en el presente trabajo, es procedente referirse a los datos previos en nuestro laboratorio, mismos que indicaban que la adición de la FB1 aumentaba el contenido de esfinganina en 10 veces en la membrana plasmática [Gutiérrez 2005], asociado a la inhibición de la SAT por la FB1 [Merrill *et al* 2001, Soriano *et al* 2005], e inhibía a la ATPasa de H⁺ en un 25%. Esta inhibición era revertida por la adición de una ceramida de cadena corta (ceramida C₆) [Gutiérrez 2005].

La liberación de la inhibición de la actividad de la ATPasa de H⁺ por la adición de la ceramida de 6 carbonos sugería fuertemente que las ceramidas o los esfingolípidos complejos eran necesarios para la actividad de la enzima. Hay que recordar que en este sistema de embriones de maíz, se tenía una inhibición de la síntesis de esfingolípidos complejos, ya que no puede haber formación de sus precursores, la ceramida, debido a la inhibición de la SAT por la FB1, pero si se producida un mayor contenido de esfinganina en la membrana plasmática, debida

a que la inhibición de la SAT no permite la utilización de sus sustratos, las BCL. El modelo de *Arabidopsis thaliana* que se utilizó en este trabajo es similar al de embriones de maíz en unos aspectos y es diferente en otros. En *Arabidopsis thaliana* se manifestó una activación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a los 6 y 7 días posteriores a la inducción del silenciamiento total de la SPT) y en este modelo la síntesis de esfingolípidos complejos también está inhibida, pero en un sitio diferente de la vía (la SPT), lo cual reduce o evita la formación de BCL. Esta diferencia es fundamental para explicar porque en ambos modelos (maíz y *Arabidopsis thaliana*) en los que está inhibida la síntesis de esfingolípidos complejos y ceramida (maíz) se tiene una inhibición de la ATPasa de H⁺, mientras que en el otro, se tiene un aumento de la actividad de la enzima (*Arabidopsis thaliana* línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*). La diferencia pues, radica en los contenidos de esfingolípidos endógenos totales, los cuales, en maíz están disminuídos al igual que en *Arabidopsis thaliana*, pero en maíz las BCL están aumentadas, mientras que en el segundo están disminuidas debido a que las enzimas respectivas cuya actividad está reducida, tiene como sustrato las BCL (la SAT en maíz) o bien como productos (la SPT en *Arabidopsis thaliana*) respectivamente.

Estas evidencias experimentales en conjunto sugieren que los esfingolípidos endógenos totales están perturbando el entorno lipídico óptimo de la ATPasa de H⁺.

Por evidencias en la literatura podemos considerar que, otros dos lípidos que también pueden modular la actividad de la ATPasa de H⁺ son los esteroides [Simmonds *et al* 1982, Cooke y Burden 1990, Grandmougin-Ferjani *et al* 1997, Lee 2004] y las ceramidas/esfingolípidos complejos [Gutiérrez 2005, Vázquez 2007]. El modelo que se propone (Fig. 17) sobre la modulación de los esfingolípidos sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ se basa en que la ATPasa de H⁺ es susceptible de cambiar su actividad dependiendo del tipo de lípidos que la rodean, como lo han demostrado estudios realizados utilizando diferentes glicerolípidos y esteroides (Tabla II) [Serrano *et al* 1989, Palmgren *et al* 1990, Grandmougin-Ferjani *et al* 1997, Kasamo 2003]. Adicionalmente, en años recientes se ha comenzado a configurar un modelo de la membrana plasmática de células vegetales que contempla la presencia de dominios particulares llamados balsas lipídicas, las cuales están enriquecidas en esfingolípidos y esteroides. El hecho de que la ATPasa de H⁺ se haya localizado en estas estructuras [Mongrand *et al* 2004, Shahollari *et al* 2004, Borner *et al* 2005, Morel *et al* 2006, Laloi *et al* 2007, Lefebvre *et al* 2007] sugiere fuertemente que los lípidos podrían estar influyendo en la actividad de la enzima. El papel de los esfingolípidos en la actividad de la enzima se enmarca en el contexto de la teoría del lípido anular o hipótesis anular, basada en los efectos e interacciones de las proteínas membranales con los lípidos. Esta hipótesis describe adecuadamente el efecto de los esteroides sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ [Simmonds *et al* 1982, Cooke y Burden 1990, Grandmougin-Ferjani *et al* 1997, Lee 2004].

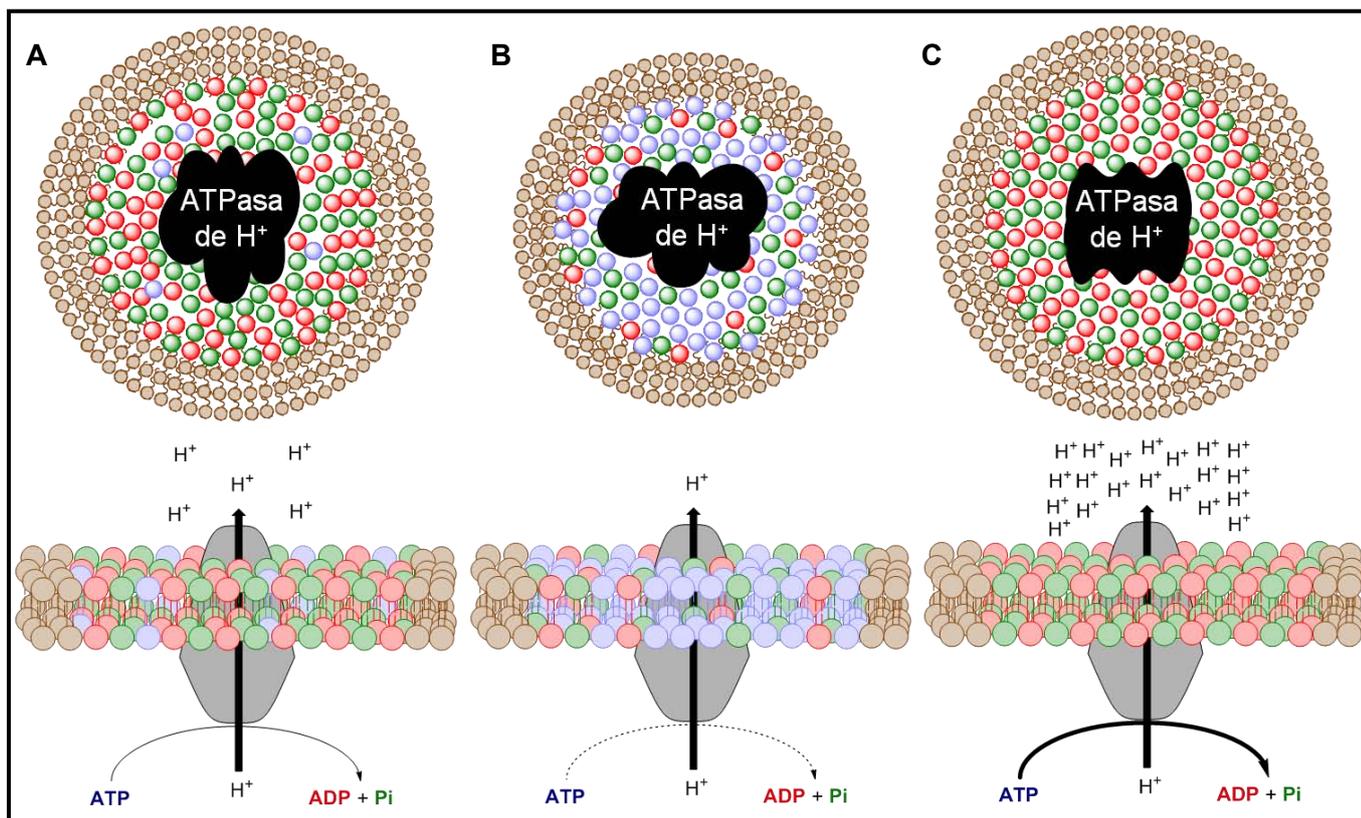


Fig. 17. Modelo que explica el efecto de esfingolípidos complejos y sus precursores en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. A partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y de algunos más, disponibles en la literatura, se presenta el modelo siguiente en el que tres condiciones del entorno lipídico afectan la conformación catalítica de la ATPasa de H⁺, lo cual se traduce en cambios en su actividad. El panel A representa la condición en la que la ATPasa de H⁺ se encuentra en la MP con niveles regulares endógenos de BCL libres (*Arabidopsis thaliana* silvestre, ó líneas *Atlcb2a-1* ó *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor o embriones de maíz sin FB1) y en la que la enzima tiene una actividad fisiológica normal. En el panel B, la enzima se encuentra en la MP en un entorno lipídico en el que hay un gran incremento en los niveles endógenos de BCL, cuyo efecto es la inhibición de la enzima debido al desplazamiento o perturbación de la interacción entre la enzima y las ceramidas/esfingolípidos complejos/esteroles, que son necesarios para la actividad; este efecto se manifiesta como una disminución en la actividad hidrolítica de ATP. En el panel C, la enzima se muestra en la MP cuando hay una disminución en los niveles de BCL modificando el entorno lipídico de la enzima, favoreciéndose la interacción de la ATPasa de H⁺ con las ceramidas/esfingolípidos complejos/esteroles, repercutiendo en un aumento de la actividad de la enzima, que se manifiesta en incrementos en la actividad hidrolítica del ATP y en la extrusión de protones al exterior celular, como fue observado. Modelo de la interacción esfingolípidos ATPasa de H⁺ de la MP de plantas. glicerolípidos, esteroles, ceramidas y/o esfingolípidos complejos, BCL.

Todos estos resultados indican que la esfinganina puede tener un efecto inhibitorio ya sea directo o indirecto, sobre la actividad de la enzima. El único efecto que no es fácil de explicar es el

que se observó en los embriones de maíz, en los que la adición de esfinganina exógena a los embriones no produjo ningún efecto en la actividad de la enzima en la VMP. Una explicación posible para esto es que la esfinganina exógenamente añadida siga una distribución especial por vías de tráfico vesicular que no la hacen accesible a todos los sitios membranales.

En conjunto, el fenómeno que estamos describiendo sugiere que cuando hay una alteración en la biosíntesis de esfingolípidos complejos totales hay una modificación en la actividad de la enzima. Cuando aumentan los niveles de estas BCL, la actividad de la ATPasa disminuye (caso maíz), pero cuando disminuye la cantidad de esfingolípidos endógenos totales, la actividad de la ATPasa de H⁺ aumenta (caso *Arabidopsis thaliana*). Por lo que sabemos de la literatura sobre la influencia estructural de algunos glicerolípidos sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ [Kasamo 2003], pudiese ser que los esfingolípidos endógenos totales están influyendo en las distintas afinidades y características estructurales del ambiente lipídico nativo de la ATPasa de H⁺ y podría estar modificando en los esfingolípidos endógenos totales cambiando a la composición lipídica que rodean a la ATPasa o bien cambiando el tipo de empaquetamiento que tienen estos lípidos en la membrana plasmática. Esto último sucede con la ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (SERCA). Una P-ATPasa muy relacionada en estructura con la ATPasa de H⁺ de plantas [Palmgren 2001]. Estudios que se han llevado a cabo en la SERCA han observado que, cuando se ha reconstituido a la SERCA y se modifica el ambiente lipídico hay un aumento o disminución en su actividad [Nakamura y Onishi 1975, Tang *et al* 2006].

En resumen, los resultados del presente trabajo sugieren que el metabolismo de esfingolípidos tiene una influencia en los niveles de actividad de la enzima a través de los niveles de esfingolípidos.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se establecieron las condiciones experimentales para la obtención de VMP a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* de pureza adecuada.
2. Se encontró un aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* del 55% con respecto a las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* a los 6 y 7 días posteriores al silenciamiento de la SPT.
3. No se detectó cambio en la cantidad de la ATPasa de H⁺ ni en los niveles de la proteína 14-3-3 en las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* donde la actividad de ATPasa de H⁺ estaba estimulada.
4. Se encontró una mayor acidificación en las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a los 4 y 7 días posteriores al silenciamiento de la SPT, lo cual es consistente con el aumento de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

CONCLUSIÓN GENERAL

Por las evidencias mostradas a lo largo de este trabajo, es factible pensar que los esfingolípidos modulan la actividad de la ATPasa de H^+ ya sea por su interacción directa con la enzima o a través de modificaciones en el entorno membranal y, por tanto, este sea un nuevo mecanismo muy particular por el cual la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es regulada mediante fluctuaciones en el metabolismo de lípidos y, en particular, por modificaciones en el metabolismo de esfingolípidos.

Lo anterior sugiere que cambios en el metabolismo de esfingolípidos afectan la estructura membranal y en consecuencia la actividad de enzimas como la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

Por todo lo anterior, las evidencias que aporta este trabajo sugieren que la hipótesis de la que se partió para llevar a cabo este trabajo es factible, sin embargo, hacen falta experimentos adicionales para demostrarla a cabalidad.

PERSPECTIVAS

Con el objeto de caracterizar el efecto encontrado en este trabajo, en el que reportamos un incremento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en vesículas obtenidas de una línea con disminución en la síntesis de esfingolípidos, se propone:

1. Utilizar otro marcador de membrana plasmática como la Glucan sintasa II, para verificar la pureza de las preparaciones.
2. Cuantificar los niveles de bases de cadena larga, ceramidas y esfingolípidos complejos en las membranas plasmáticas de las plantas de *Arabidopsis thaliana* a los 7 días posteriores a la inducción del silenciamiento de la SPT.
3. Detectar a la ATPasa de H⁺ con diferentes anticuerpos dirigidos a las diferentes isoformas.
4. Medir la actividad de la ATPasa de H⁺ de vesículas de membrana plasmática de las raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la línea silenciada.
5. Caracterizar cinéticamente a la ATPasa de H⁺ de la línea silenciada a los 6 días posteriores a la inducción del silenciamiento de la SPT.
6. Marcar a la ATPasa de H⁺ con una etiqueta de histidinas y a un esfingolípidos con marcaje radiactivo.
7. Cuantificar en el ensayo de acidificación los cambios del colorante en el medio de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, H.K., Tanaka, T., Duke, S.O., Porter, J.K., Wray, E.M., Hodges, L., Sessions, A.E., Wang, E., Merrill, A.H. Jr., y Riley, R.T. Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipids metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 106 (1994) 1085-1093.
2. Aebersol, R.H., Teplow, D.B., Hood, L.E. y Kent, S.B.H. Electroblothing onto activated glass. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4229-4238.
3. Ahuja, A. *Handbook of bioseparations.* (2000) Academic Press. New York. Vol. 2 pp. 329-364.
4. Alsterfjord, M., Sehnke, P.C., Arkell, A., Larsson, H., Svennelid, F., Rosenquist, M., Ferl, R.J., Sommarin, M. y Larsson, C. Plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: Evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol.* 45 (2004) 1202-1210.
5. Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V.V. y Slayman, C.W. Biogenesis and function of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203 (2000) 155-160.
6. Antipova, O.V., Bartova, L.M., Kalashnikova, T.S., Obroucheva, N.V., Voblikova, V.D. y Muromtsev, G.S. Fusicoccin-induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 41 (2003) 157-164.
7. Arango, M., Gévaudant, F., Oufattole, M. y Boutry, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of the gene subfamilies. *Planta* 216 (2003) 355-365.
8. Auer, M., Scarborough, G.A. y Kuhlbrandt, W. Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature* 392 (1988) 840-843.
9. Bagnat, M., Chang, A. y Simons, K. Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires rafts association for surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 4129-4138.
10. Baudouin, M. y Boutry, M. The plasma membrane H⁺-ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108 (1995) 1-6.
11. Barrantes, F. J. Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res. Rev.* 47 (2004) 71-95.
12. Becker, D., Zeilinger, C., Lohse, G., Depta, H. y Hedrich, R. Identification and biochemical characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 190 (1993) 44-50.
13. Beisiegel, U. Protein Blotting. *Electrophoresis* 7 (1986) 1-18.
14. Bhat, R.A. y Panstruga, R. Lipid rafts in plants. *Planta* 223 (2005) 5-19.
15. Binzel, M.L. NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato. *Physiol. Plant.* 94 (1995) 722-728.

16. Bohn, M., Heinz, E. y Lüthje, S. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 387 (2001) 35-40.
17. Borch, J., Bych, K., Roepstorff, P., Palmgren, M.G., y Fuglsang, A.T. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 411-415.
18. Borner, G.H.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., MacAskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H. Lilley, K.S. y Dupree, P. Analysis of detergent resistant membranes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137 (2005) 104-116.
19. Brauer, D. y Tu, S.I. Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol.* 89 (1989) 867-874.
20. Briskin, D.P., Leonard, R.T., y Hodges, T.K. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148 (1987) 542-568.
21. Briskin, D.P. y Niesman-Reynolds, I. Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.* 90 (1989) 394-397.
22. Briskin, D.P. y Poole, R.J. Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate. *Plant Physiol.* 71 (1983) 507-512.
23. Briskin, D.P., Thornely, W.R. y Rotti-Rotti, J.L. Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol.* 78 (1985) 642-644.
24. Carde, J.P. Electron microscopy of plant cell membranes. *Methods Enzymol.* 148 (1987) 599-622.
25. Carmona, L. Aislamiento y caracterización de membranas resistentes a detergente (DRM en diferentes especies vegetales. Tesis de Maestría (2006) Fac. Química, UNAM.
26. Carmona, L. Perturbaciones en la biosíntesis de esfingolípidos y sus efectos en microdominios de la membrana plasmática de plantas. Tesis de Doctorado (en proceso) Fac. Química, UNAM.
27. Chang, A., Rose, M.D. y Slayman, C.W. Folding and intracellular transport of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase: effects of mutations in KAR2 and SEC65. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 5808-5812.
28. Chen, M., Han, G., Dietrich, C.R., Dunn, T.M. y Cahoon, E.B. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of Serine Palmitoyltransferase. *Plant Cell.* 18 (2006) 3576-3593.
29. Chung, J.H., Lester, R.L. y Dickson, R.C. Sphingolipid requirement for generation of a functional V₁ component of the vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 28872-28881.
30. Cocucci, M.C. y Marrè, E. Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate-inhibited, Mg²⁺-ATPase from radish microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 771 (1984) 42-52.

31. Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D.M., Ebel, C., le-Maire, M. y Karlish, S.J.D. Purification of Na⁺, K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16610-16618.
32. Cooke, D.T. y Burden, R.S. Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol. Plant.* 78 (1990) 153-159.
33. Cooke, D.T., Burden, R.S., James, C.S., Seco, T. y Sierra B. Influence of sterol on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (1994) 769-773.
34. Cooke, D.T., Munkonge, F.M., Burden, R.S. y James, C.S. Fluidity and lipid composition of oat and rye shoots plasma membranes: Effect of lipid perturbation by xenobiotics. *Biochim. Biophys. Acta* 106 (1991) 156-162.
35. Cooke, D.T., Ros, R., Burden, R.S. y James, C.S. A comparison of the influence of sterols on the specific activity of the H⁺-ATPases in isolated plasma membrane vesicles from oat, rye and rice shoots. *Physiol. Plant.* 88 (1993) 397-402.
36. Dietrich, C.R., Han, G., Chen, M., Berg, R.H., Dunn, T.M. y Cahoon, E.B. 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 (2008) 284-298.
37. Dowhan, W., Mileykovskaya, E. y Bogdanov, M. Diversity and versatility of lipid-protein interaction revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 19-39.
38. Duncan, D.B. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11 (1955) 1-42.
39. DuPont, F.M. y Leonard, R.T. Solubilization and partial purification of the adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. *Plant Physiol.* 65 (1980) 931-938.
40. Duxbury, C.L. Alterations in membrane protein conformation in response to senescence-related changes. *Phytochemistry* 30 (1991) 63-68.
41. Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 414-418.
42. Fantini, J. How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *Cell Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1027-1032.
43. Ferreira, T., Brett-Mason, A. y Slayman, C.W. The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29613-29616.
44. Fu, H., Subramanian, R. y Masters, S.C. 14-3-3 Proteins: Structure function and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40 (2000) 617-647.

45. Fuglsang, A.T., Borch, J., Bych, K., Jahn, T.P., Roepstorff, P. y Palmgren, M.G. The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42266-42272.
46. Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L y Schneiter, R. Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase of the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22515-22522.
47. Gaigg, B., Toulmay, A. y Schneiter, R. Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids *per se* are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 34135-34145.
48. Goldstein J.L. y Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343 (1990) 425-430.
49. Gomès, E., Venema, K., Simon-Plas, F., Milat, M.L., Palmgren, M.G. y Blein, J.P. 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 (1996) 48-52.
50. González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. y Gavilanes-Ruíz, M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal. Biochem.* 200 (1992) 235-238.
51. Gouaux, E. y White, S.H. Membranes. Lipids lost, lipids regained. *Struc. Biol.* 11 (2001) 393-396.
52. Grandmougin-Ferjani, A., Schuller-Muller, I. y Hartmann, M.A. Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol.* 113 (1997) 163-174.
53. Guillas, I., Kirchman, P.A., Chuard, R., Pfefferli, M., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M. y Conzelmann, A. C26-Co-A-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J.* 20 (2001) 2655-2665.
54. Gutiérrez, N.N. Interacción de la Fumonisina B1 con la membrana plasmática: efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado (2005) Fac. Química, UNAM.
55. Hanada, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1632 (2003) 16-30.
56. Hannun, Y.A. y Obeid, L.M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25847-25850.
57. Hartmann, M-A. Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 170-175.

58. Hartmann, M-A. y Benveniste, P. Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis. *Methods Enzymol.* 148 (1987) 632–650.
59. Hernández, A., Cooke, D.T. y Clarkson, D.T. Effects of abnormal-sterol accumulation on *Ustilago maydis* plasma membrane H⁺-ATPase stoichiometry and polypeptide pattern. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 412-415.
60. Hintze, J. NCSS and GESS. NCSS, LLC. (2007) Kaysville, Utah. WWW.NCSS.COM
61. Holthuis, J.C.M. y Levine, J.P. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 209-220.
62. Hopkins, W. G. *Introduction to Plant Physiology*. 1ª edición. (1995) John Wiley & Sons. New York. pp. 1-20, 285-309.
63. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. y Sandhoff, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485 (2000) 63-99.
64. Jahn, T., Baluska, F., Michalke, W., Harper, J.F. y Volkmann, D. Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiol Plant* 104 (1998) 311–316.
65. Jain, M.K. y White, H. Long range order in biomembranes. *Adv. Lipid Res.* 15 (1977) 1-60.
66. Jones D.L., Shaff, J.E. y Kochian, L.V. Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoloniferum* L. 1. Inhibition of tip growth by aluminium. *Planta* 197 (1995) 672–80.
67. Kanczewka, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J.L. y Boutry, M. Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 11675-11680.
68. Kasamo, K. Regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *J. Plant Res.* 116 (2003) 517-523.
69. Kenworthy, A. Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 435-438.
70. Kinoshita, T. y Shimazaki, K.I. Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 18 (1999) 5548-5558
71. Kurzchalia, T.V. y Parton, R.G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 424-431.
72. Laloi, M., Perret, A-M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M-N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J-M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M-A. y Moreau, P. 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 (2007) 461-472.

73. Lanfermeijer, F.C., Venema, K. y Palmgren, M.C. Purification of a histidine-tagged plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast. *Protein Express. Purif.* 12 (1998) 29-37.
74. Lange, C., Nett, J.H., Trumpower, B.L. y Hunte, C. Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure. *EMBO J.* 20 (2001) 6591–6600.
75. Larsson, C., Sommarin, M. y Widell, S. Isolation of highly purified plant plasma membrane separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* 228 (1994) 451-469.
76. Larsson, C., Møller, I.M. y Widell, S. Introduction to plant plasma membrane. Its molecular composition and organization. Pp. 1-15 Springer-Verlag, Berlin. 1990.
77. Lee, A.G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1666 (2004) 62-87.
78. Lee, M.C.S., Hamamoto, S. y Schekman, R. Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22395-22401.
79. Lefebvre, B., Batoko, H., Duby, G. y Boutry, M. Targeting of a *Nicotiana plumbaginifolia* H⁺-ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. *Plant Cell* 16 (2004) 1772-1789.
80. Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M-A., Michaelson, L.V., Carde, J.P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J-J. y Mongrand, S. 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 (2007) 402-418.
81. Leitner, D.M., Brown, F.L.H. y Wilson, K.R. Regulation of protein mobility in cell membrane: a dynamic corral model. *Biophys. J.* 78 (2000) 125-135.
82. Lenard, J. y Singer, S.J. Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56 (1966) 1828-1835.
83. Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H. y Greenberg, J.T. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* 17 (2003) 2636-2641.
84. Lommerse, P.H.M., Spaink, H.P. y Schmidt, T. *In vivo* plasma membrane organization: results of biophysical approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 119-131.
85. Lukaszewicz, M., Jérouvelle, B. y Boutry, M. Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane H⁺-ATPase gene. *Plant J.* 14 (1998) 413–423.

86. Lynch, D.V. y Dunn, T.M. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist* 161 (2004) 677-702.
87. Lynch, D.V. Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods Enzymol.* 311 (2000) 130-149.
88. Markham, J.E., Li, J., Cahoon, E.B. y Jaworski, J.G. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 22684-22694.
89. Markham, J.E. y Jaworski, J.G. 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 (2007) 1304-1314.
90. Matsudaira, P. Sequence from picomole of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10035-10038.
91. Maxfield, F.R. y Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438 (2005) 612-621.
92. Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Müller, A., Giraudat, J. y Leung, J. Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J.* 26 (2007) 3216-3226.
93. Merrill, A.H.Jr., Cameron-Sullards, M., Wang, E., Voss, K.A. y Riley, R.T. Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 283-289.
94. Merrill, A.H.Jr., Schmelz, E.-M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A. y Wang, E. Symposium Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142 (1997) 208-225.
95. Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P. Hartmann, M.A., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. y Bessoule, J.J. Lipid rafts in higher plants cells. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36277-36286.
96. Moreau, P., Hartmann, M.-A., Perret, A.-M., Sturbois-Balcerzak, B. y Cassagne, C. Transport of sterols to the plasma membrane of leek seedlings. *Plant Physiol.* 117 (1998) 931-937.
97. Moriau, L., Bogaerts, P., Jonniaux, J.L. y Boutry, M. Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺-ATPase gene subfamily in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.* 21 (1993) 955-963.
98. Morsomme, P. y Boutry, M. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465 (2000) 1-16.

99. Moss, G.P. The nomenclature of steroids: recommendations by the IUPAC–IUB joint commission on biochemical nomenclature. *Eur. J. Biochem.* 186 (1989) 429–458.
100. Nakamura, M. y Onishi, S. Organization of lipids in sarcoplasmic reticulum membrane and Ca^{2+} -dependent ATPase activity. *J. Biochem. (Tokyo)* 78 (1975) 1039-1045.
101. Nelson, D.L. y Cox, M.M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*. 4ª edición. (2006) Omega. Barcelona. pp 348-357.
102. Nes, W.R. The biochemistry of plant sterols. *Adv. Lipid Res.* 15 (1977) 233-324.
103. Niu, X., Narasimhan, M.L., Salzman, R.A., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. NaCl regulation of plasma membrane H^+ -ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol.* 103 (1993) 713–718.
104. Ohlrogge, J. y Browse, J. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7 (1995) 957-970.
105. Olsson, A., Svennelid, F., Ek, B., Sommarin, M. y Larsson, C. A phosphothreonin residue at the C-terminal end of the plasma membrane H^+ -ATPase protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol.* 118 (1998) 551-555.
106. Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J-L. y Oecking, C. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H^+ -ATPase by combining X-Ray Crystallography and Electron Cryomicroscopy. *Mol. Cell* 25 (2007) 427-440.
107. Ookura, T., Wada, M., Sakakibara, Y., Jeong, K.H., Maruta, I., Kawamura, Y. y Kasamo, K. Identification and characterization of a family of genes of the plasma membrane H^+ -ATPase of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol.* 35 (1994) 1251–1256.
108. Ouffatole, M., Arango, M. y Boutry, M. Identification and expression analysis of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes encoding isoforms of a plasma membrane H^+ -ATPase, one of which is induced by mechanical stress. *Planta* 210 (2000) 715–722.
109. Palmgren, M.G. Plant plasma membrane H^+ -ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001) 817-845.
110. Palmgren, M.G. y Christensen, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H^+ ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3027-3033.
111. Palsdottir, H. y Hunte, C. Lipids in membrana protein structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1666 (2004) 2-18.
112. Parets-Soler, A., Pardo, J.M. y Serrano, R. Immunocytolocalization of plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* 93 (1990) 1654-1658.
113. Paul, A.L., Sehnke, P.C. y Ferl, R. Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* seem to be driven by client interaction. *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 1735-1743.

114. Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M.G. and Nissen, P. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*. 450 (2007) 1111-1115.
115. Perez, C., Michelet, B., Ferrant, V., Bogaerts, P. y Boutry, M. Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1204–1211.
116. Perry, R. J. y Ridgway, N. D. Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1734 (2005) 220-234.
117. Peskan, T., Westermann, M. y Oelmüller, R. Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6989-6995.
118. Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346-356.
119. Petty, R.H. *Molecular Biology of Plants. Structure and Function*. 1ª edición. (1993) Plenum Press. New York. pp. 7-49.
120. Portillo F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 31-42.
121. Qiu, Q-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K.S. y Zhu, J-K. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/K⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *PNAS*, 99 (2002) 8436-8441.
122. Rahier, A. y Taton, M. Fungicides as tools in studying postsqualene sterol synthesis in plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 57 (1997) 1–27.
123. Ramos, R.S., Caldeira, M.T., Arruda, P. y de-Meis, L. The two Km's for ATP of corn-root H⁺-ATPase and the use of glucose-6-phosphate and hexokinase as an ATP-regenerating system. *Plant Physiol.* 105 (1994) 250-253.
124. Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichorn, S.E. *Biology of Plants*. 5ª edition (1992) Worth Publisher. New York. Pp. 18, 19, 55-57.
125. Regenber, B., Villalba, J.M., Lanfermeijer, F.C. y Palmgren, M.G. C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁺ ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plasma membrane. *Plant Cell* 7 (1995) 1655-1666.
126. Robert, G. y Beaugé, L. Complex ATP-activation kinetics of plant H⁺-transporting ATPase may or may not require two substrate sites. *Eur. J. Biochem* 246 (1997) 228-232.
127. Roberts, M.R. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signaling. *TRENDS Plant Sci.* 8 (2003) 218-223.
128. Roberts, M.R. y Bowles, D.J. Fusicocin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* 119 (1999) 1243-1250.

129. Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C. y Sommarin, M. Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiol.* 127 (2001) 142-149.
130. Ryppö, A., Vapaavuori, E.M., Rikala, R., y Sutinen M.L. Fatty acid composition of microsomal phospholipids and H⁺-ATPase activity in the roots of Scots pine seedlings grown at different root temperatures during flushing. *J. Exp. Bot.* 45 (1994) 1533-1539.
131. Samuels, A.L., Fernando, M. y Glass, A.D.M. Immunofluorescent localization of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K nutrition. *Plant Physiol.* 99 (1992) 1509–1514.
132. Sánchez-Nieto, S., Gómez-Puyou, M.T., Rodríguez-Sotres, R., Carballo, A. y Gavilanes-Ruíz, M., Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 1413 (1997) 175-187.
133. Sandstrom, R.P. y Cleland, R.E. Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol.* 90 (1989) 1524-1531.
134. Schaller, A., y Oecking, C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense in tomato plants. *Plant Cell* 11 (1999) 263-272.
135. Schorling, S., Vallée, B., Barz, W.P., Riezman, H. y Oesterhelt, D. Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 3417-3427.
136. Serrano, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 61-94.
137. Shahollari, B., Peskan-Berghöfer, T. y Oelmüller, R. Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant.* 122 (2004) 397-403.
138. Simmonds, A.C., East, J.M., Jones, O.T., Rooney, E.K., McWhirter, J. y Lee, A.G. Annular and non-annular binding sites on the (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 693 (1982) 398-406.
139. Simons, K. y Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (1997) 569-572.
140. Simons, K. y Toomre, D. Lipid rafts a signaling transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31-39.
141. Singer, S.J. Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev. Physiol.* 66 (2004) 1-27.
142. Sondergaard, T.E., Schulz, A. y Palmgren, M.G. Energization of transport processes in plants. Role of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 136 (2004) 2475-2482.

143. Soriano, J.M., González, L. y Catalá, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 345-356.
144. Sperling, P. y Heinz, E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1632 (2003) 1-15.
145. Stryer L., Berg J.M. y Tymoczko J.L., *Bioquímica* 5ª edición. (2003) Reverté. Barcelona. pp. 319-343.
146. Sze, H., Li, X. y Palmgren, M.G. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11 (1999) 677-689.
147. Tang, D., Dean, W. L., Borchman, D y Peterson, C. A. The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity. *Cell Calcium* 39 (2006) 209-216.
148. Toulmay, A. y Schneiter, R. Lipid dependent surface transport of the proton pumping ATPase: A model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie* 89 (2007) 249-254.
149. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. y Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405 (2000) 647-655.
150. van-Blitterswijk, W.J., Van-Der-Luit, A.H., Veldman, R.J., Verheij, M. y Borst, J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* 369 (2003) 199-211.
151. van-der-Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W.N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 304-322.
152. Vance, D. E. y Vance, J. E. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th edition (2002). Elsevier Science, B.V. New York.
153. van-Meer, G. Cellular lipidomics. *EMBO J.* 24 (2005) 3159-3165.
154. van-Meer, G. y Lisman, Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25855-25858.
155. Vázquez, C.A. Mecanismo de inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por disminución de ceramidas endógenas en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura (2007) Fac. Química, UNAM.
156. Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, J., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T.A. y Damjanovich, S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2003) 8053-8058.
157. Villalba, J.M. Lützelshwab, M. y Serrano, R. Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves. *Planta* 185 (1991) 458-461.

-
158. Wada, M., Takano, M. y Kasamo, K. Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 99 (1992) 794–795.
 159. Wallach, D.F.H. y Zahler, P.H. Protein conformations in cellular membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56 (1966) 1552-1559.
 160. Wright, B.S., Snow, J.W., O'Brien, T.C. y Lynch, D.V. Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Arch. Biochem. Biophys.* 415 (2003) 184-192.
 161. Yan, F., Feuerle, R., Schäffer, S., Fortmeier, H. y Schubert, S. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiol.* 117 (1998) 311–319.
 162. Zhang, J.S., Xie, C., Li, Z.Y. y Chen, S.Y. Expression of plasma membrane H⁺-ATPase gene in response to salt stress in a rice salt-tolerant mutant and its original variety. *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 1006–1011.
 163. Zhang, W., Campbell, H. A., King, S. C. y Dowhan, W. Phospholipids as determinants of membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 26032-26038
 164. Zhao, R., Dielen, V., Kinet, J.M. y Boutry, M. Co-suppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell* 12 (2000) 535-546.
 165. Zweerink, M. M., Edison, A. M., Wells, G. B., Pinto, W. y Lester, R. L. Characterization of a novel, potent , and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 25032-25038.