



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
I Z T A C A L A

"PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE  
LA ATPasa-F1 MITOCONDRIAL DE *Amaranthus  
hypocondriacus* CULTIVADO EN STRESS  
SALINO".

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A:  
**JOSEFINA VAZQUEZ MEDRANO**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX. 1992



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE  
BIOQUIMICA DE LA UNIDAD DE BIOLOGIA VEGETAL, BAJO  
LA ASESORIA DEL M.en C., SERGIO GONZALEZ MORENO.

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero de bovino
DMCD	Diclohexil-carbodiimida
DTT	Ditriotreitol
EGTA	Acido tetraacético-etilenglicol
Hepes	Acido etanosulfónico-N-2-hidroxiethylpiperazina
NEM	N-Etil-maleimida
SDS	Dodecil sulfato de sodio

## INDICE

	Pag.
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
ANTECEDENTES .....	4
OBJETIVOS .....	9
METODOLOGIA .....	10
RESULTADOS Y DISCUSION .....	15
CONCLUSIONES .....	38
BIBLIOGRAFIA .....	39

## RESUMEN

La estimulación de las AlPasas de plantas crecidas en exceso de sales tiene relevancia por la posible función en la activación del transporte iónico a través de la membrana para expulsar o compartamentalizar iones. Por otra parte existen algunas evidencias de que plantas cultivadas en exceso de sales estimulan las vías de obtención de energía como la respiración y fosforilación oxidativa. En el presente trabajo se evaluó el efecto del NaCl en la actividad de AlPasa-F<sub>1</sub> de mitocondrias de amaranto *in vivo* e *in vitro*, purificada por solubilización en cloroformo, filtración en gel y cromatografía de intercambio, y se caracterizó la enzima purificada. Observando que la Km de la enzima purificada disminuye por efecto del NaCl tanto *in vitro* como *in vivo*, pero la Vmax no se modifica en ninguna condición. La mayor afinidad de la enzima por el sustrato, ocasionada por el NaCl podría estar relacionada con un mayor aporte energético para contrarrestar el efecto de la sal en la planta.

## INTRODUCCION

Las membranas biológicas juegan un papel importante en la regulación celular modulando procesos fisiológicos; algunas de ellas llevan a cabo transducción energética mediante un complejo sistema enzimático denominado  $H^+$ -ATPasa; este complejo utiliza un transporte electrónico para inducir una distribución asimétrica de  $H^+$  a ambos lados de la membrana, transformando la energía electroquímica de oxidorreducción en una fuerza protonmotriz para producir ATP, (23) gracias al cual se realizan las reacciones endergónicas de la célula.

Otras ATPasas, incapaces de sintetizar ATP, producen un flujo protónico que utilizan para transportar iones o solutos a través de la membrana.

Existen numerosos estudios referentes a los efectos negativos de la salinidad en plantas. Está demostrado que el NaCl disminuye la germinación y el desarrollo (4). Los efectos tóxicos ocasionados por el exceso de sales están siendo descritos, pero aun se desconoce mucho acerca de las alteraciones bioquímicas que el exceso de sales produce. Recientemente, se han realizado estudios sobre la actividad de las ATPasas en plantas, para tratar de determinar que papel juegan en la adaptación de la planta al stress salino. La estimulación de las ATPasas de plantas en exceso de sales tiene relevancia por la posible función en la activación del transporte iónico a través de la membrana para expulsar o compartamentalizar iones (8). A este respecto las ATPasas más estudiadas han sido la de plasmalema y tonoplasto (19, 22, 35), pero existe poca información para mitocondria (36).

Ya que las distintas ATPasas tienen un origen común y han permanecido casi invariables durante la evolución (33), el efecto iónico puede ser similar entre ellas.

Por otra parte, existen aunque muy pocas, evidencias de que plantas cultivadas en exceso de sales estimulan las vías de obtención de energía, como la respiración y fosforilación oxidativa (20). Pero la mayor parte de referencias a este respecto reportan una inhibición en la respiración y fosforilación oxidativa (14).

En este trabajo se evalúa el efecto del NaCl en la ATPasa de mitocondrias de amaranto, que es una especie tolerante a a la salinidad (1).

## ANTECEDENTES

### ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS ATPasas.

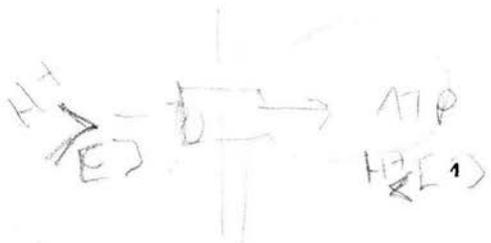
Debido a que un gradiente protónico solo puede formarse a través de una barrera de permeabilidad como la bicapa lipídica, las enzimas que utilizan el gradiente electroquímico se encuentran asociadas siempre a la membrana. Las  $H^+$ -ATPasas bacterianas se localizan en la membrana plasmática, mientras que en las plantas además de formar parte de esta estructura, se encuentran en membranas tilacoides del cloroplasto y al igual que en levaduras y tejidos animales, en las membranas internas de las mitocondrias. La orientación de las  $H^+$ -ATPasas en bacterias, cloroplastos y mitocondrias es diferente, pero en todos los casos la dirección del gradiente protónico y el sitio de síntesis de ATP está siempre al lado contrario al de mayor concentración de  $H^+$ . En el caso de la ATPasa de mitocondria esta se encuentra dirigida hacia la matriz (34).

\* La energía que se libera en el proceso del transporte protónico a través de la membrana está termodinámicamente favorecida y es la fuerza utilizada por las  $H^+$ -ATPasas para sintetizar el ATP (23).

Todas las ATPasas protónicas contienen un componente denominado  $F_0$ , que es el encargado de la captura y transporte de  $H^+$  a través de la membrana y un segundo componente denominado  $F_1$  que es el componente catalítico, constituido por cinco subunidades polipeptídicas, donde se realiza la síntesis e hidrólisis de ATP. (11)

El proceso de transducción de energía puede dividirse en 3 etapas:

① La primera consiste en el paso del gradiente protónico generado por la cadena de transporte de electrones, por un canal localizado en



el interior de la membrana y que constituye el segmento estructural  $F_0$ . La segunda etapa comprende la transformación de la energía del gradiente o quimiosmótica en energía conformacional del segmento  $F_1$  de la enzima localizado fuera de la membrana y del lado contrario de ésta, en el cual se genera el gradiente. La tercera y última etapa comprende el proceso catalítico propiamente dicho en el que se produce la deshidratación del ADP y el fosfato y la formación de ATP (32).

De acuerdo a la Teoría de Margulis (33), las ATPasas de células eucariotas se originaron probablemente por endosimbiosis intracelulares de procariontas, hace 1 500 millones de años. Las subunidades funcionalmente responsables de la actividad catalítica están presentes desde las ATPasas más primitivas, a estas se han adicionado otras subunidades que incrementan la eficiencia (33).

El segmento  $F_1$  está formado por cinco subunidades diferentes, 3 copias  $\alpha$ , 3  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tienen función estructural y catalítica, las subunidades restantes tienen solamente función estructural uniendo al complejo  $\alpha\beta$  con el factor  $F_0$  (Fig.A).

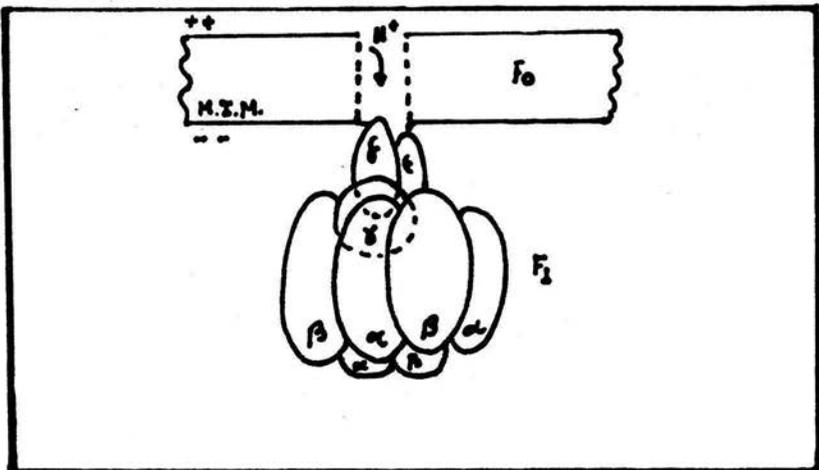


Fig.A.- Factores  $F_0$  y  $F_1$  de la ATPasa.

Evolución  
de la  
de la  
ATPasa.

## AISLAMIENTO

070 - plantaciones  
por tipo de cultivo

Las moléculas de ATPasa más estudiadas son la de mamífero, tanto de mitocondria como de membrana plasmática (3,4,37), por lo que están bien caracterizadas. Los reportes sobre estas enzimas en plantas son más recientes, existiendo mayor información de ATPasa de membrana plasmática (18), cloroplasto (6) y de vacuola (34,36). En relación a las ATPasas mitocondriales de plantas, recientemente se ha obtenido información sobre sus características estructurales y funcionales, esto debido, entre otras causas, a la dificultad del aislamiento y purificación, además de la poca estabilidad de la enzima.

Se ha purificado parcialmente  $F_1$  de mitocondrias de cotiledones de chícharo (14) y endospermo de haba (38), utilizando precipitación con sulfato de amonio, pero esta técnica afecta la actividad de  $F_1$ , por lo que se ha intentado incluir ATP y glicerol en el medio de extracción para mantener estable la enzima; sin embargo el glicerol interfiere en los procesos de caracterización, por lo que es necesario retirarlo después de la extracción, con los inconvenientes del caso. En reportes posteriores se ha utilizado cloroformo para la extracción, en mitocondrias de papa, avena y maíz (17,30).

La partícula  $F_1$  precipitada con sulfato de amonio (al 30-50 % de saturación), registra una actividad de  $2 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$ , con 25 % de glicerol en el medio de extracción la actividad aumenta a  $8-9 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$  (35).  $F_1$  solubilizada en cloroformo registra una actividad de  $15 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$  (30), por lo que al parecer este método es recomendable.

## SALINIDAD

Las plantas difieren grandemente en cuanto a la tolerancia a medios salinos, por lo que se ha propuesto una división de plantas halófilas y no halófilas dependiendo de la resistencia o sensibilidad a sales en el medio, aunque existe un rango de tolerancia intermedio (13).

La disminución en el desarrollo de plantas sensibles expuestas a exceso de sales se conoce desde hace tiempo; se sabe que la baja productividad puede ser ocasionada por un déficit hídrico, por efectos tóxicos de los iones en exceso o a la desviación energética hacia procesos distintos al crecimiento, como podrían ser el transporte de iones (26).

Las estrategias que utilizan las plantas que se desarrollan en ambientes salinos, para contrarrestar los efectos adversos ocasionados por el elevado potencial osmótico externo, incluyen:

- Control de la absorción iónica. La característica de selectividad propia de la membrana plasmática permite la absorción diferencial de sustancias del medio externo. A través de la absorción controlada de iones y el transporte de estos, algunas plantas pueden impedir el exceso iónico en el citoplasma. Como parte de estos mecanismos se ha observado la expulsión de sales a través de glándulas salinas (16).

- Compartimentalización de iones. Característico de halófitas las plantas generan turgencia celular manteniendo una alta concentración interna de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Al parecer estos niveles altos pueden ser tolerados por la planta gracias a que las concentraciones de estos iones en el citoplasma son relativamente bajas comparadas con las de

vacuola, y a que la síntesis de solutos orgánicos contribuyen al potencial osmótico del citoplasma. (13)

- Síntesis de solutos orgánicos. La producción de solutos orgánicos neutros como glicina, betaina, prolina, sacarosa, etc. puede impedir el déficit hídrico; este proceso puede ser muy costoso para la economía celular pues implica la utilización de una buena porción de fotosintatos (8).

#### ATPasas y NaCl.

La estimulación iónica de las ATPasas de plantas ha cobrado importancia por la participación que estas tienen en el transporte iónico a través de las membranas. A este respecto la mayor información obtenida se refiere a ATPasas de plasmalema y tonoplasto (19, 22, 34), por su asociación directa con estos procesos, pero existe menos información para organelos como la mitocondria o el cloroplasto (36).

No obstante, debido a que la ATPasa mitocondrial esta involucrada en la producción de energía en forma de ATP, se podría pensar en que juega algún papel en los mecanismos de adaptación a sales.

Existen reportes en maíz y chícharo, tratados con sales en los cuales se incrementa la respiración y fosforilación oxidativa (19), otros autores reportan que en avena el NaCl inhibe la ATPasa y estimula la respiración (14).

Se ha propuesto una posible relación entre la respiración estimulada por sales, que algunos autores reportan, y los mecanismos de transporte iónico de plantas en estres salino, apoyados en ensayos con discos de zanahoria; en discos de betabel se observa un incremento en los niveles de ATP que se correlaciona con el flujo iónico (29).

Utilizando la teoría de control de flujo, se ha determinado la contribución de cada una de las enzimas que participan en la respiración, observándose un incremento en la influencia de la ATPasa sobre la vía, en plantas de alfalfa expuestas a NaCl (28).

#### OBJETIVOS

Objetivo general.- Evaluar el efecto del NaCl *in vivo* e *in vitro* en el componente F<sub>1</sub> de mitocondrias de amaranto.

Objetivos Particulares.-

- Aislar y purificar el componente F<sub>1</sub>.
- Caracterizar la enzima purificada.

## METODOLOGIA

En el siguiente diagrama se resumen los pasos metodológicos del presente trabajo:

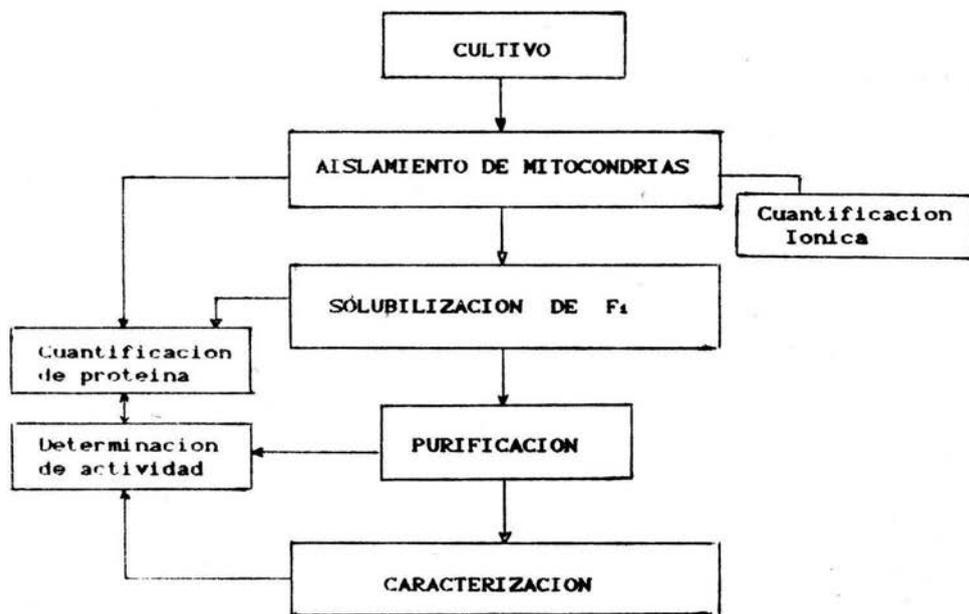


Figura B.- Secuencia metodológica.

### Cultivo de Plantas.

Se desinfectaron semillas de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* con hipoclorito de sodio al 2 %, durante 30 minutos y se hidrataron durante 24 horas. Posteriormente se colocaron en rejillas metálicas de 24 X 27 cm con abertura de malla de 1 mm en una cámara de germinación con flujo de agua continuo donde permanecieron durante 72 hrs.

Transcurrido este lapso los bastidores se trasladaron a recipientes de plástico conteniendo 1.5 L de solución nutritiva Hoagland (9), para constituir el lote control y otras con el mismo volumen de solución nutritiva adicionada con NaCl 100 mM. El medio se renovó al tercer día para evitar contaminación.

Los cultivos hidropónicos se mantuvieron durante 5 días en una cámara entre 18 - 20°C, en oscuridad.

### Aislamiento de mitocondrias.

A los cinco días de tratamiento se cosecharon los germinados, de lotes control y salinizados, se desecharon las raíces y los hipocotilos se lavaron con agua corriente y después con agua destilada. Aproximadamente 800 gr de tejido se separaron en porciones de 100 gr para el aislamiento de mitocondrias por el método modificado de Randall, como sigue:

Se homogenizaron 100 gr de tejido en licuadora a máxima velocidad durante 6 segundos en 100 ml de buffer conteniendo 250 mM Manitol, 6 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 % BSA, 50 mM HEPES pH 7.5.

El homogenizado así obtenido se filtró a través de ocho capas de gasa y se ajustó el pH a 7.5. Se centrifugó a 1 000 X g durante 10 minutos desechándose la pastilla, el sobrenadante se centrifugó a

12000 X g durante 12 minutos. La pastilla así obtenida que contenía las mitocondrias se resuspendió en buffer A (250 mM sacarosa, 1 mM EGTA 1 mM ATP, 10 mM de Tris-HCl pH 7.5) y se centrifugó a 9000 X g durante 12 minutos. La pastilla conteniendo las mitocondrias se resuspendió en 1 ml de buffer A. Todo el proceso se realizó a 4°C.

#### Solubilización de F<sub>1</sub> en Cloroformo.

Se juntaron los paquetes de mitocondrias del total de tejido (aproximadamente 30 mg de proteína en 8 ml) y se mezclaron con dos volúmenes de cloroformo, agitando la mezcla vigorosamente durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 12000 X g durante 2 minutos.

La fase acuosa superior se retiró y centrifugó a 100 000 X g durante 90 minutos. El sobrenadante así obtenido contenía F<sub>1</sub>.

#### Purificación.

Las partículas de F<sub>1</sub> solubilizadas corrieron a través de una columna de Sephadex G-200 de 60 X 1.5 cm, equilibrada en buffer A con un flujo de 3 ml/ hr. Se colectaron fracciones de 3 ml a las cuales se determinó proteína a 280 nm; a las fracciones que contenían proteína se les midió actividad de ATPasa, por cuantificación de fósforo libre (38).

Las fracciones con actividad positiva, se colectaron constituyendo una sola muestra, la que fue corrida en otra columna de Sephadex-DEAE de 1.5 X 0.6 cm equilibrada en buffer A con 25 mM de NaCl, con un flujo de 40 ml/hr, eluyendo con un gradiente de NaCl de 25 a 500 mM en buffer A, colectando fracciones de 3 ml y detectando la enzima con el mismo procedimiento utilizado en la columna anterior.

Para corroborar la pureza de la enzima se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % (24), revelando con azul de Comassie para proteínas totales (7).

En cada etapa de purificación se cuantificó proteína por el método de Bradford (5).

#### Caracterización.

Se registró la actividad de ATPasa en cada etapa de purificación, siguiendo la reacción de hidrólisis de ATP, incubando a la enzima en buffer Tris-HCl 30 mM, en presencia de ATP 3 mM a pH y temperatura óptimos durante 15 minutos, en un volumen total de 1ml, utilizando 0.5 ml de TCA al 30 % para detener la reacción. Las muestras fueron centrifugadas durante 2 minutos a 15000 X g. Del sobrenadante se utilizaron 0.5 ml para cuantificar Pi libre por el método Taussky modificado (38), para lo cual se adicionó 1.5 ml de TCA al 0.5 N a cada muestra y 1 ml de reactivo de color conteniendo: 4 ml de Molibdato de amonio al 16 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 N, 2 gr de sulfato ferroso y 36 ml de agua, exactamente a los 10 minutos después de la adición del reactivo de color se procedió a tomar lecturas a 660 nm en espectrofotómetro; se elaboró una curva patrón de Pi de 0.1 a 0.5  $\mu$ M para interpolar las lecturas.

Se evaluó la actividad de la enzima variando pH en un rango de 6.0 a 9.0 con Tris-HCl 30 mM y temperatura de 10 a 60° C, para determinar condiciones óptimas, una vez obtenidas estas condiciones se utilizaron para registrar la actividad de ATPasa en presencia de distintos inhibidores, iones y sustratos.

Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  en mitocondrias aisladas y  $F_1$  purificada, en presencia y ausencia de  $NaCl$  100 mM, de plantas control y tratadas con  $NaCl$  100 mM en el medio de crecimiento.

Para determinar el peso molecular y las subunidades constituyentes se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % con SDS al 1 % (9), revelando con azul de Coomassie para proteínas totales (7), utilizando como marcadores de peso molecular: alfa lactoalbúmina (14 200 D), anhidrasa carbónica (29 000 D), albumina de suero de bovino (66 000 D).

Se evaluó el efecto de distintos inhibidores que actúan de la siguiente manera: Oligomicina: sobre el componente  $F_0$  de la ATPasa mitocondrial, DCCD que actúa sobre la ATPasa mitocondrial, al igual que el NEM, el molibdato de amonio que actúa sobre fosfatasa, vanadato de sodio que actúa sobre ATPasa de *plasmalema* Azida que es el inhibidor específico para el factor  $F_1$  de ATPasa mitocondrial y el nitrato de potasio que inhibe a la ATPasa de *tonoplastos*; los inhibidores se utilizaron en concentraciones que ocasionan la mitad de la inhibición total ( $I=50$ ).

También se registró el efecto de algunos aniones y cationes *in vitro* sobre la actividad de la enzima purificada.

#### CUANTIFICACION DE IONES INTRANITOCONDRIALES.

Se aislaron mitocondrias con el procedimiento descrito anteriormente, utilizando agua desionizada para la resuspensión final y agitando vigorosamente para romper las mitocondrias; para precipitar los restos de membrana se centrifugó a 12 000 X g durante 2 minutos, el sobrenadante obtenido se utilizó para cuantificar iones por espectrofotometría de absorción atómica (27).

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### AISLAMIENTO

La técnica de solubilización con cloroformo brinda buenos resultados, como se observa en la figura 1, se obtuvo un 20 % de proteína en la fase acuosa, con actividad específica elevada con respecto a la reportada con otras metodologías de aislamiento. Existen varias técnicas para aislar el componente  $\text{F}_1$ , una muy empleada ha sido la precipitación con sulfato de amonio, aunque no es la más recomendable debido a que la sal puede interferir en la caracterización de la enzima. En este trabajo se aisló esta molécula mediante la solubilización en cloroformo, de acuerdo a los resultados obtenidos esta técnica brinda buenos resultados, manteniendo la enzima en buenas condiciones y alto rendimiento, lo que se refleja en valores de actividad específica mayores a los reportados por precipitación con sulfato de amonio: de  $8 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$  en maíz (36) y no mayor de  $10 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$  en otros reportes (2). El valor más alto de actividad específica reportado con otras metodologías es de  $60 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$  para papa (17). Además de que esta metodología es sencilla y rápida.

FRACCION	ACT. TOTAL $\mu\text{mol Pi. min}^{-1}$	ACT. ESPECIFICA $\mu\text{mol Pi. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	VOL. T. ml	PROT. T. mg	PURIFIC.
MITOCONDRIA	13.86	0.451 <sup>±</sup> 0.34	10.2	32.1	1
CHCl <sub>3</sub>	4.75	1.985 <sup>±</sup> 0.44	7.6	6.4	5
G-200	4.96	2.010 <sup>±</sup> 0.33	9.3	3.1	10
DEAE	3.79	40.400 <sup>±</sup> 5.80	6.5	0.7	155

Fig. 1.- Purificación de F<sub>1</sub> de *Amaranthus hypochondriacus*. La actividad fue medida por cuantificación de fósforo libre, a pH 8.0 y 30 °C. Los valores son promedio de 4 ensayos. (± SD).

## PURIFICACION

Al pasar la muestra solubilizada por la columna de sephadex G-200 (Fig. 2), se logró separar varias proteínas, la segunda en eluirse, que corresponde al 10 % de proteína total, mostró actividad de ATPasa sensible a Azida de sodio, esta fracción se eluyó a través de una columna de intercambio iónico para completar la purificación (Fig. 3). La ATPasa purificada presentó una actividad específica 100 veces mayor que en la mitocondria ( $40.4 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ ).

La técnica cromatográfica permitió purificar totalmente la enzima, manteniendo la misma actividad durante tres semanas después del aislamiento, almacenada a  $25^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ , viéndose disminuida la actividad a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aunque algunos autores reportaban alta sensibilidad de la enzima a bajas temperaturas (30). Sin embargo cabe indicar que la enzima pierde su actividad gradualmente después del aislamiento ya que se mantenía en disolución que explica que no todos los resultados muestren la misma actividad específica, por lo que se recomienda liofilizar la muestra.

## CARACTERIZACION

En cuanto a la caracterización, la  $F_1$  de mitocondrias de hipocotilos de amaranto comparte características con ATPasas aisladas de otras especies (15), como la preferencia por ATP a otros sustratos (Fig.4), el pH óptimo de 8.0 (30,37) ligeramente más básico que el óptimo en mitocondrias y la temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  (21) (Fig.5), observándose que la enzima en mitocondria muestra una temperatura óptima de  $40^{\circ}\text{C}$ , elevada para otras enzimas pero reportado en algunas ATPasas (31).

## SEPHADEX G-200

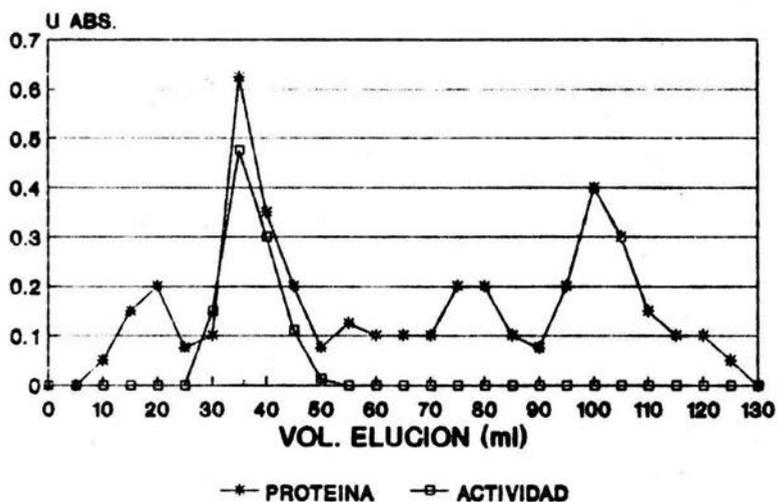


Fig. 2.- Purificación de F<sub>1</sub> solubilizada en cloroformo. la muestra corrió durante 48 hrs., a través de una columna de sephadex G-200 de 60 X 1.5 cm. La proteína de las fracciones se determinó a 280 nm y la actividad por cuantificación de fósforo libre.

## SEPHADEX-DEAE

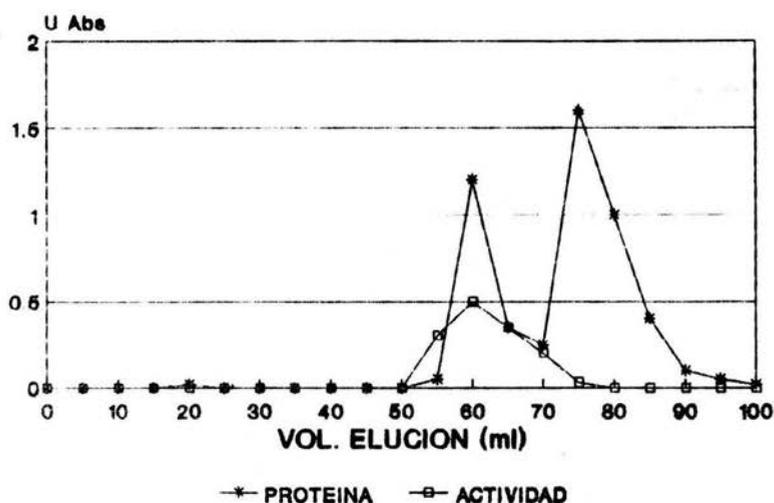


Fig. 3.- Purificación de F<sub>1</sub> en sephadex-DEAE. La fracción colectada de la columna de G-200 con actividad de ATPasa se corrió a través de una columna de 1.5 X 0.6 cm y se eluyó la muestra mediante un gradiente de NaCl de 25 a 500 mM.

SUSTRATO	$\mu\text{mol Pi. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	%
ATP	41.0	100
ADP	18.0	44
G6P	3.0	7

Fig. 4. Preferencia por sustratos. Actividad registrada utilizando 3 mM de sustrato a pH 8.0 y 30 °C.

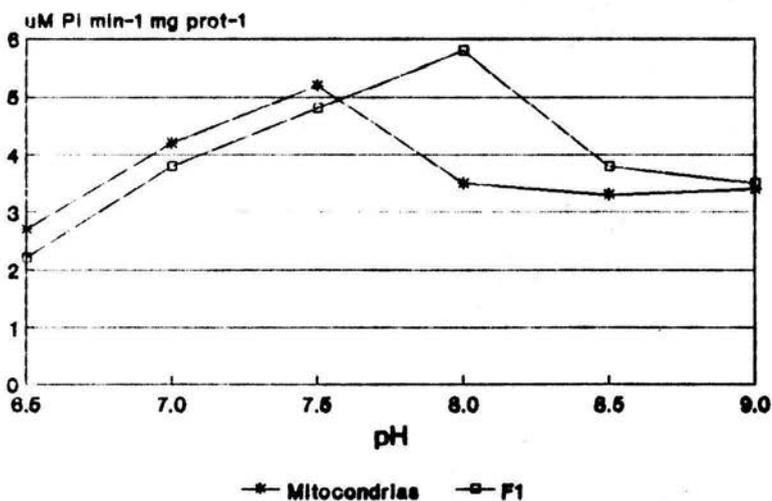
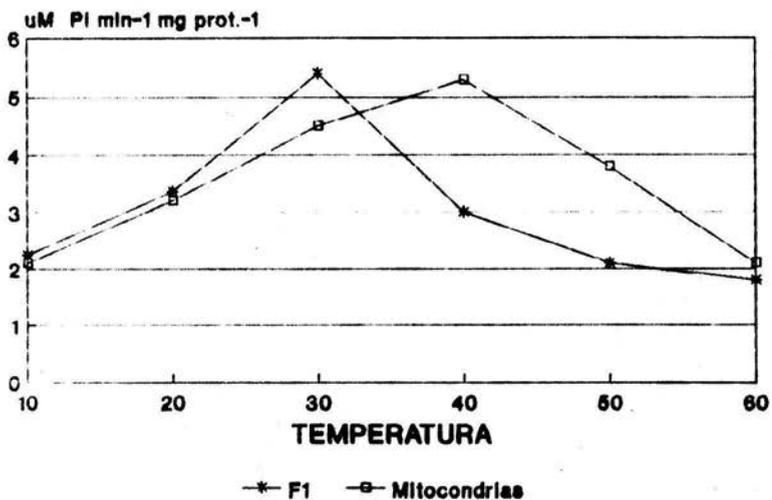


Fig. 5.- Condiciones de temperatura y pH óptimos para la enzima. Se determinó la actividad máxima utilizando un rango de temperatura de 10 a 60 °C y otro de pH de 6 a 9. En presencia de ATP 3 mM.

## INHIBIDORES

Se probó el efecto de distintos inhibidores en la actividad de ATPasa mitocondrial y  $F_1$  purificada, encontrando que para la ATPasa mitocondrial se presentó inhibición por azida, oligomicina, vanadato, DCCD, NEM,  $KNO_3$  y molibdato de amonio, en orden decreciente, lo que indica la presencia de otras ATPasas y fosfatasas; en la fracción  $F_1$  no hay inhibición con molibdato de amonio, ni con  $KNO_3$ , observándose un 17 % de inhibición con vanadato, además de la inhibición específica de  $F_1$  con NEM, DCCD y azida (Fig.9).  $F_1$  es inhibida por azida, pero a concentración de  $150 = 2$  mM, mayor a las reportadas para otras especies ( $150 = 10-200 \mu M$ ), consiguiendo la inhibición total con 5 mM. Se observó inhibición por vanadato, existen reportes que indican que a concentraciones menores de  $500 \mu M$  se inhibe la ATPasa de plasmalema y no la de mitocondria (36) por lo que se eligió una concentración de  $250 \mu M$  y aun así se encontró inhibición. Otros autores reportan inhibición por vanadato de la ATPasa mitocondrial de maíz con  $50 \mu M$  (30).

Se observó activación por tripsina para la ATPasa mitocondrial de 50 %, no habiendo modificación en la actividad de  $F_1$  purificada. El efecto de tripsina en la ATPasa mitocondrial fue activador, ya que según algunos investigadores, esta técnica desplaza la proteína inhibidora, cuya función en plantas se atribuye a la subunidad  $\epsilon$ . En el caso de  $F_1$  purificada la tripsina no mostró efecto, lo que puede explicarse porque algunos autores reportan el desplazamiento de la proteína inhibitoria de su sitio de acción, durante el proceso de purificación (12).

## EFFECTO DE INHIBIDORES

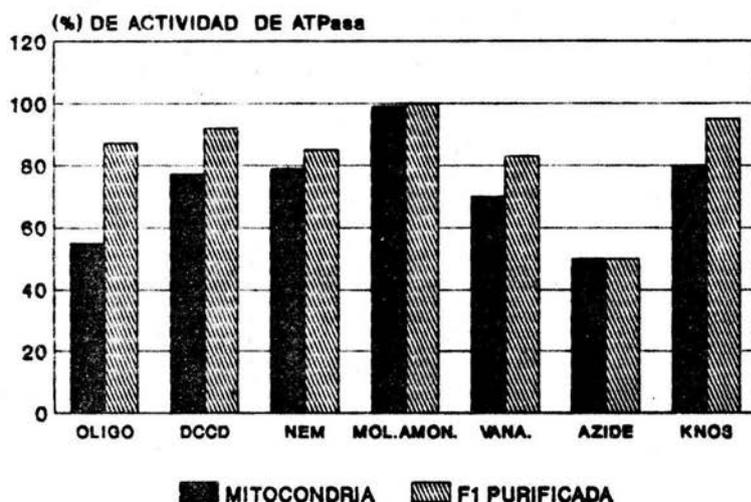


Fig. 7.- Efecto de inhibidores. Se registró actividad de ATPasa de mitocondria y F<sub>1</sub> purificada a 30°C, pH 8.0; 76 µg/ml de oligomicina, 100 µM de DCCD, 100 µM de NEM, 100 µM de Molibdato de Amonio, 500 µM de Vanadato de sodio, 2 mM de Azida y 10 mM de KNO<sub>3</sub>.

## PARAMETROS CINETICOS

El valor de  $K_m$  de la ATPasa mitocondrial disminuyó de 3.3 a 0.22 mM en la  $F_1$  purificada (Fig. 6), esto era de esperarse, ya que los valores de  $K_m$  disminuyen en las enzimas purificadas. Los valores de  $V_{max}$  se mantuvieron constantes, tanto para las plantas control como para las crecidas en NaCl, en presencia y ausencia de NaCl *in vitro*, se observa que el valor de  $V_{max}$  es semejante al de otros reportes (36,38) y no se modifica en ninguna de las condiciones experimentales; no sucede lo mismo para los valores de  $K_m$ , observándose una disminución en la enzima de plantas salinizadas con respecto a las control, tanto en mitocondrias como en la  $F_1$  purificada, en este caso la  $K_m$  disminuye a la mitad en condiciones de salinidad. El valor de  $K_m$  con NaCl *in vitro* disminuye con respecto al control sin NaCl en el medio, pero es igual para las plantas control y salinizadas. En otras ATPasas como la de *Plantago maritima* la sal *in vivo* no afecta las propiedades cinéticas, pero *in vitro*, sí (4). Estos datos indican que el NaCl podría incrementar la afinidad por el sustrato ya sea por cambios conformacionales en la enzima o favoreciendo la interacción entre el sustrato, la enzima y posiblemente el magnesio, ya que se sabe que es requerido para que la enzima se una al sustrato. Se ha encontrado que el  $Mg^{2+}$  en presencia de sodio incrementa la actividad de la enzima (12).

CULTIVO	HOAGLAND		NaCl 100 mM	
	Control	NaCl	Control	NaCl
<i>in vitro</i>				
MITOCONDRIAS	K <sub>m</sub> :	3.3		2.15
	V <sub>max</sub> :	0.57		0.58
F <sub>1</sub>	K <sub>m</sub> :	0.22	0.18	0.10
	V <sub>max</sub> :	0.60	0.60	0.62

Fig. 6. - Parámetros cinéticos. La actividad fue registrada a pH 8.0 y 30 °C, variando el sustrato de 0.2 a 9.0 mM; utilizando el modelo de Lineweaver-Burk. Los valores de V<sub>max</sub> se expresan en  $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , y los de K<sub>m</sub> en mM de ATP.

## EFFECTO IONICO

En cuanto al efecto de iones *in vitro* sobre la actividad de  $F_1$ , se observó un efecto inhibitorio del sodio en la enzima aislada de plantas control (Fig.8), observandose un comportamiento semejante para el potasio (Fig.9), el calcio estimula a bajas concentraciones e inhibe a concentraciones mayores de 50 mM (Fig.10). Para el caso de la enzima aislada de plantas crecidas en 100 mM de NaCl no se observa inhibición con sodio, existiendo el mismo comportamiento para los demás iones aunque menos significativo.

El ión sodio activa la enzima de plantas control a 25 mM, a 50 mM la mantiene inalterable y a 100 y 200 mM la inhibe, pero en el caso de la enzima de plantas crecidas en salinidad el NaCl estimuló ligeramente la enzima en todas las concentraciones aunque la diferencia no es significativa, lo que concuerda con varias referencias que reportan una estimulación de la enzima por sal (16,20).

El efecto de iones en la actividad de ATPasa permite observar que el potasio no modifica la actividad en la enzima de plantas salinizadas y en la de plantas control la inhibe; comparando estos resultados con otras referencias se encontró que el potasio de 10 a 100 mM en mitocondrias de rata no muestra efecto alguno (12), pero en maíz y avena (30,34) estimula la actividad de la enzima, lo que permite suponer que el efecto iónico es distinto en mitocondrias de animales y plantas.

## EFEECTO DE SODIO in vitro

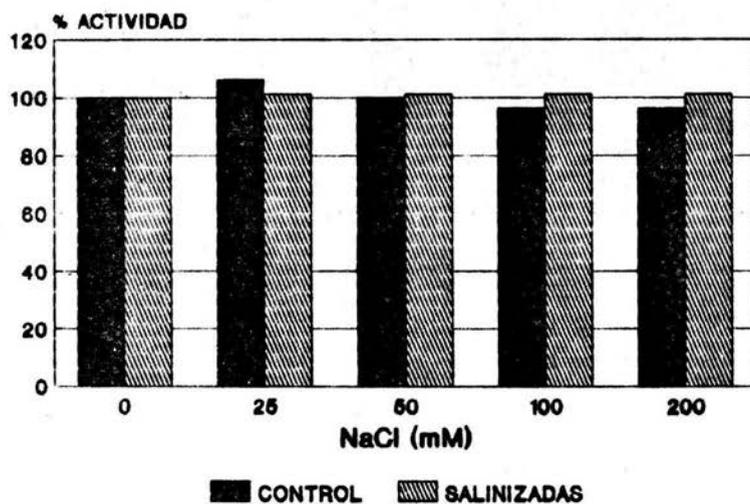


Fig.8.- Efecto del sodio in vitro, sobre la actividad de  $F_1$  purificada de plantas control y salinizadas. El registro se realizó a pH 8.0 y 30 °C, con 3 mM de ATP.

## EFFECTO DE POTASIO in vitro

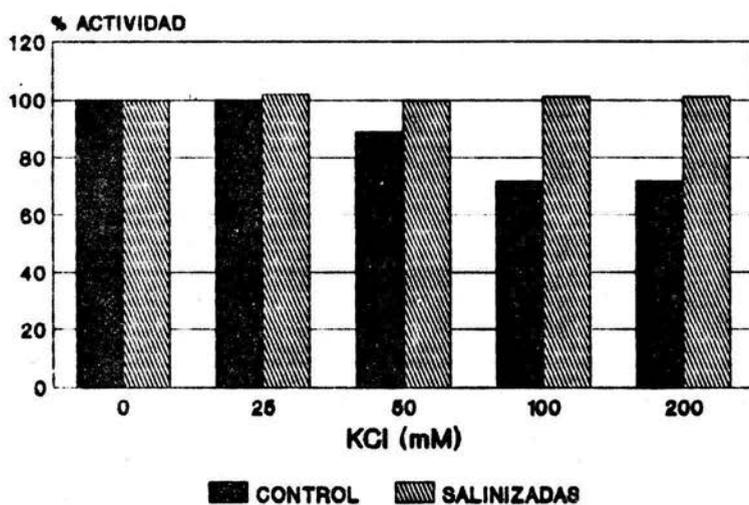


Fig.9.- Efecto del potasio *in vitro*, sobre la actividad de  $F_1$  purificada de plantas control y salinizadas. Condiciones como en la Fig. 8.

## EFFECTO DE CALCIO *in vitro*

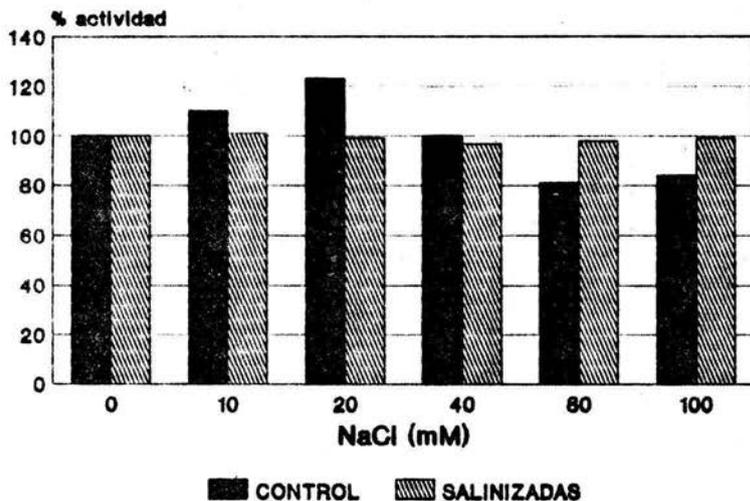


Fig.10.- Efecto de calcio *in vitro*, sobre la actividad de F<sub>1</sub> purificada de plantas control y salinizadas. Condiciones como en la Fig. 8.

## EFFECTO DE MAGNESIO in vitro

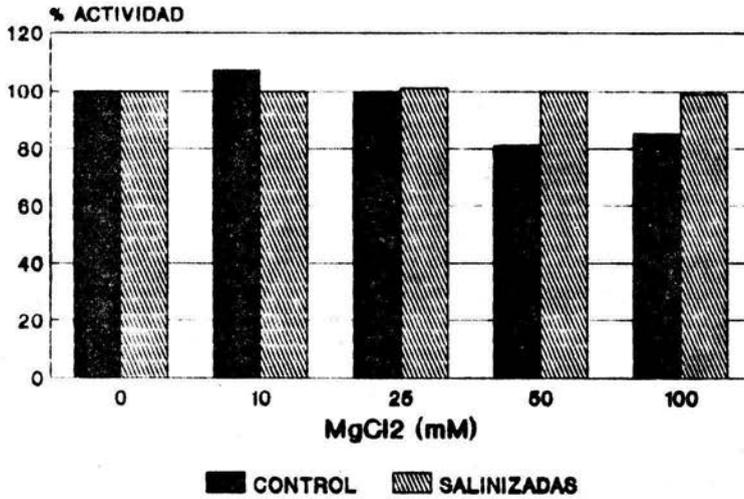


Fig.11.- Efecto del magnesio in vitro, sobre la actividad de la purificada de plantas control y salinizadas. Condiciones como en la Fig. 8.

## EFEECTO DEL CLORO in vitro

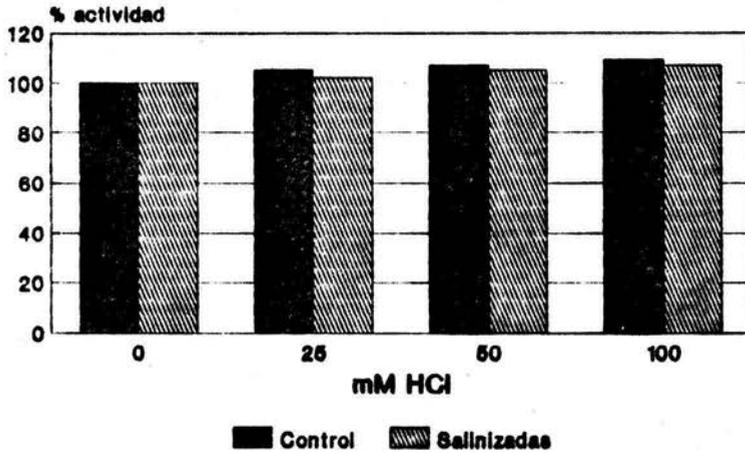


Fig.12.- Efecto del cloro in vitro, sobre la actividad de  $H_2$  purificada de plantas control y salinizadas. Condiciones como en la Fig. 8.

## EFFECTO DE CO<sub>3</sub>

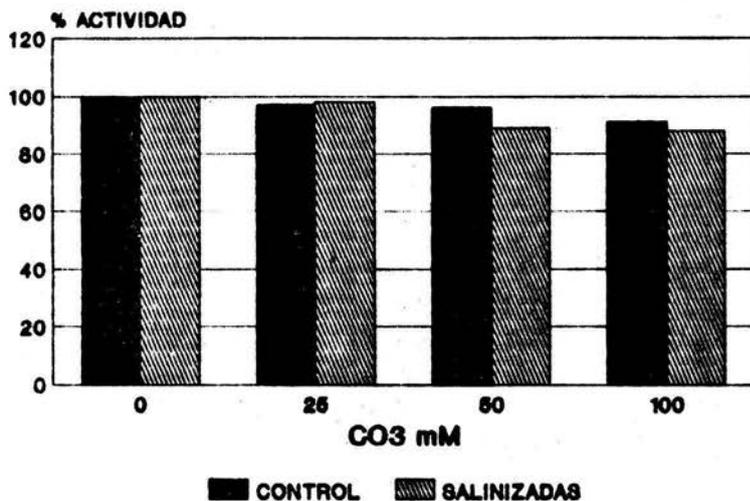


Fig. 13.- Efecto del bicarbonato *in vitro*, sobre la actividad de H<sub>2</sub> purificada de plantas control y salinizadas. Condiciones como en la Fig. 8.

## EFFECTO DE SO<sub>4</sub> in vitro

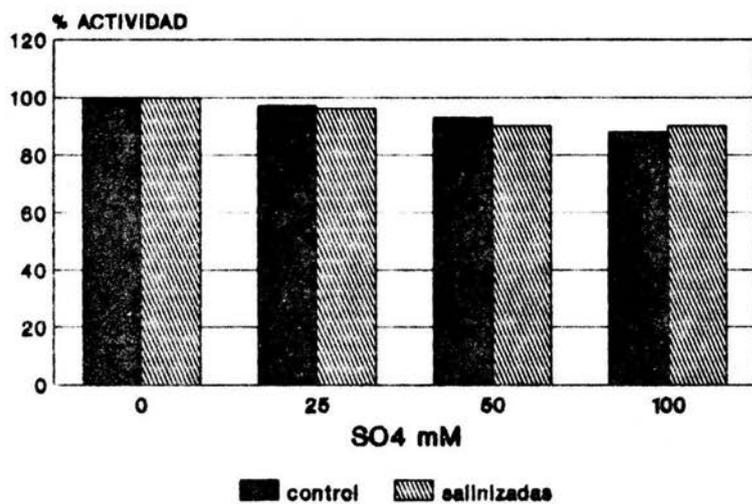


Fig.14.- Efecto del sulfato *in vitro*, sobre la actividad de H<sub>1</sub> purificada de plantas control y salinizadas. Condiciones como en la Fig. 8.

El calcio en las plantas control, estimula hasta 20 mM y a concentraciones mayores de 40 mM inhibe, pero en el caso de la enzima de plantas salinizadas la actividad se mantiene constante en todas las concentraciones. En raíz de *Avena sativa*, *Triticum aestivum* y *Brassica*, la actividad de la ATPasa se estimula en presencia de calcio (8, 13).

El ión magnesio activa ligeramente a 10 mM pero a concentraciones mayores de 25 mM inhibe la enzima de plantas control, no así para las plantas salinizadas donde la actividad se mantiene igual en cualquier concentración.

Se observó que el cloro activó la enzima (Fig.12); el  $\text{CO}_3$  al igual que el  $\text{SO}_4$  la inhiben (Figs. 13-14); lo que concuerda con los resultados de Sze (36).

Los resultados muestran una mayor influencia de los cationes que de los aniones lo que descarta la posibilidad de incurrir en interpretaciones erróneas al utilizar sales.

#### COMBINACION DE CATIONES

Con respecto a la combinación de cationes  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2} - \text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+ - \text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+ - \text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2} - \text{Mg}^{+2}$  (Fig.15), también evidenció diferencias entre la enzima de plantas control y salinizadas; para la  $F_1$  aislada de plantas control todas las combinaciones inhibieron la actividad, pero en el caso de  $F_1$  de plantas crecidas en stress salino, solo  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  inhibió,  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^+ - \text{Ca}^{+2}$  no modifican la actividad y  $\text{Na}^+ - \text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+ - \text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2} - \text{Mg}^{+2}$  incrementan la actividad. Cuando está presente el catión divalente ( $\text{Mg}^{2+}$ ) las plantas salinizadas estimulan la actividad, sin importar la combinación; en plantas control cualquier combinación inhibe. La combinación de sodio y potasio inhibe en ambos casos.

## EFFECTO DE CATIONES

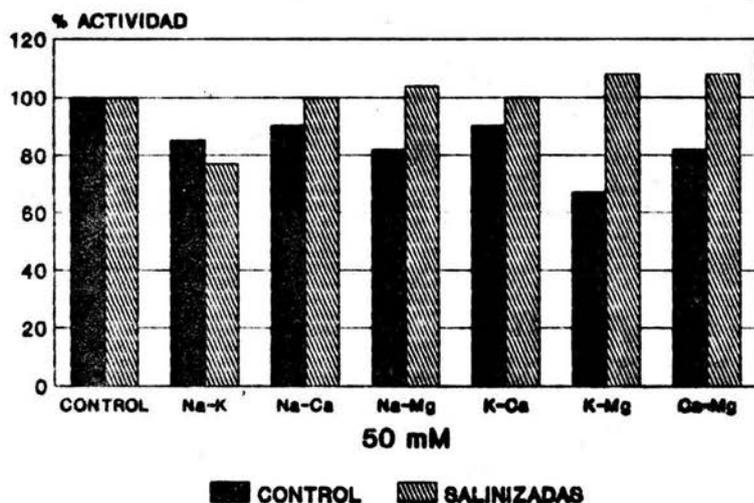


Fig.15.- Efecto de la combinación de cationes *in vitro*, sobre la actividad de H<sub>1</sub> purificada de plantas control y salinizadas. El registro se realizó a pH 8.0 y 30 °C, con 3 mM de ATP. Se probaron dos iones a la vez en concentración final de 50 mM.

## IONES INTRAMITOCONDRIALES

Al evaluar los iones intramitocondriales en plantas control y crecidas en NaCl 100 mM se observó que los niveles de sodio aumentaron en más del 40 % en las plantas salinizadas, por el contrario el potasio disminuyó al 50 % en las plantas salinizadas. El calcio se mantuvo igual en las plantas control y salinizadas. El magnesio se incrementó aproximadamente un 10 % en las plantas salinizadas.

De alguna manera la concentración del total de iones es casi la misma: 0.82  $\mu$ moles/mg prot. para las control y 0.80  $\mu$ moles/mg prot. para las salinizadas; al incrementarse el sodio (y en menor proporción el magnesio) en las plantas salinizadas el potasio disminuyó, posiblemente para equilibrar y mantener la concentración total constante.

Posiblemente es el ión potasio el que modifica más significativamente su concentración, al incrementarse el sodio debido a que este ión parece no tener una función relevante en la mitocondria, de tal manera que su salida no afecta su funcionamiento, contrario a lo que sucedería si fuesen calcio o magnesio los que sufrieran cambios ya que estos iones juegan un papel importante en la fosforilación oxidativa.

## SUBUNIDADES CONSTITUYENTES

En lo que respecta a las subunidades constituyentes de  $F_1$ , se observó el mismo patrón reportado para otras especies, con pesos moleculares que caen en los mismos rangos (Fig.18). Se detectaron los 5 tipos de subunidades con pesos moleculares de:  $\alpha$  52 KD,  $\beta$  46 KD,  $\gamma$  37 KD,  $\delta$  25 KD y  $\epsilon$  15 KD. Siendo muy semejantes a los de  $F_1$  de maíz (33). No se observó una sexta subunidad, que han denominado  $\delta'$ , reportada en papa y remolacha (25), esto concuerda con el hecho de que las ATPasas se han mantenido a lo largo de la evolución casi sin cambios.

## IONES INTRAMITOCONDRIALES

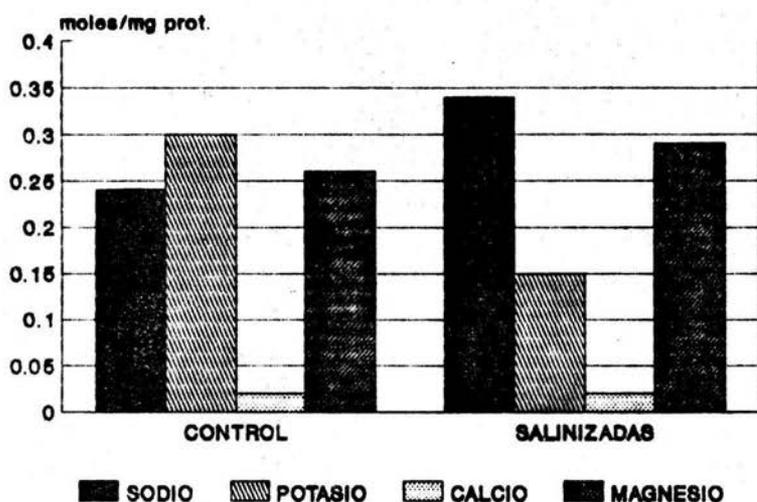


Fig.- 17.- Cuantificación de iones intramitocondriales. Se aislaron mitocondrias de plantas control y salinizadas y se rompieron para liberar los iones y cuantificarlos por espectrofotometría de absorción atómica.

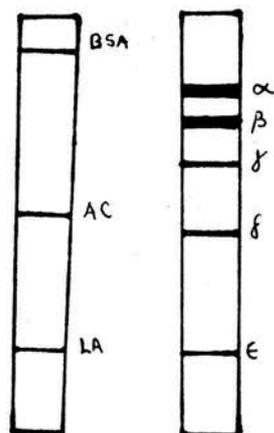


Fig.16. - Subunidades constituyentes de  $F_1$  purificada. El gel de la derecha presenta un patrón de proteínas cuyos pesos moleculares son: BSA (66 KD), AC (29 KD),  $\alpha$ LA (14.2 KD). A partir de una gráfica de log de PM vs Rf se interpolaron los PM de las subunidades:  $\alpha$  (52 KD),  $\beta$  (46 KD),  $\gamma$  (36 KD),  $\delta$  (25 KD) y  $\epsilon$  (15KD).

## CONCLUSIONES.

- La técnica de aislamiento y purificación de ATPasa mitocondrial (F<sub>1</sub>) basada en extracción con cloroformo y purificación por filtración en gel e intercambio iónico brinda buenos resultados en cuanto a recuperación y estabilidad.
- La concentración de sodio intramitocondrial de hipocotilos de amaranto, se incrementa cuando las plantas crecen con 100 mM de NaCl en el medio.
- El NaCl en el cultivo ocasiona un cambio en las concentraciones de K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup> intramitocondrial con respecto a las plantas control.
- La F<sub>1</sub> de amaranto comparte las características principales de ATPasas de otras especies como el pH y temperaturas óptimos, parámetros cinéticos, subunidades constituyentes y peso molecular.
- La K<sub>m</sub> disminuye por efecto de NaCl, tanto *in vitro*, como *in vivo*.
- La mayor afinidad de la enzima por el sustrato ocasionado por el NaCl, podría estar relacionado con un mayor aporte energético para contrarrestar el efecto de la sal en la planta, mediante transporte iónico o por alguna otra vía.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alejandro, I.G. 1986. Cultivo del Amaranto en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- 2.- Beechy, R.B.; Hubrard, S.A., et al. 1975. A simple and rapid method for the preparation of ATPase from submitochondrial particles. *Biochem J.* 148:533-537.
- 3.- Ben-Hayyim, G.; Kan, U. 1990. Salt-induced cooperativity in ATPase activity of plasma membrane-enriched fractions from cultured *Citrus* cells: kinetic. *Physiologia Plantarum* 80:210-216.
- 4.- Bernstein, L. and Hayward, H.E. 1958. Physiology of salt tolerance. *Ann Rev. Plant Physiol* 9:25-46.
- 5.- Bradford, M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein. *Anal Biochem.* 72: 248-250.
- 6.- Bruce, P.; Vitaly, L.; Spitsber, et al. 1985. Kinetic Analysis of corn mitochondrial. *Plant Physiol.* 77:346-351.
- 7.- Chrambach, A., et al. 1967. A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 20: 150-154.
- 8.- Churchill, K. y Sze, H. 1984. Anion-Sensitive,  $H^+$ -Pumping ATPase of oat roots. *Plant Physiol.* 76:490-497.
- 9.- Dunn, A.; Arditti, J. 1968. *Experimental plant physiology.* Holt, R. and Winston Inc. NY. 265 págs.
- 10.- Garbarino, J. y DuPont, M.F. 1989. Rapid induction of Na/H exchange activity in Barley root tonoplast. *Plant Physiol.* 89:1-4.
- 11.- Gómez-Puyou, A.; Ayala, G.; Muller, U. y Iuena, de G-P. 1983. Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP by mitochondrial ATPase. *J. of Biol. Chem.* 258 (22) 13673-13679.

- 12.- Gómez-Puyuo, A.; Sandoval, F.; Peña, A.; Chávez, E. y Tuena, M. 1969. Effect of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  on mitochondrial respiratory control, oxygen uptake, and adenosine triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 244 (19): 5339-5345.
- 13.- Greenway, A. and Munns, R. 1980. Mechanism of salt tolerance in no halophytas. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- 14.- Grubmeyer, C.M.; Spencer, M. 1979. Effects of anions on soluble ATPase from mitochondria of pea cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 20: 83-91.
- 15.- Hamasur, B.; Birgeron, U.; Ericson, A.C.; Glaser, E. 1990. Large-scale purification procedure of spinach leaf mitochondria-isolation and immunological studies of the  $\text{F}_1$ -ATPase. *Physiologia Plantarum* 78: 367-373.
- 16.- Hayward, H. E. y Bernstein, L. 1958. Plant growth relationships salt-affected soils. *Botan. Rev.* 24:548-635.
- 17.- Iwasaki, Y. T. y Asahi, T. 1983. Purification and characterization of the soluble form of mitochondrial adenosine triphosphatase from sweet potato. *Arch. Biochem. Biophys.* 227:164-173.
- 18.- Leonard, R. T. y Hodges, T. K. 1973. Characterization of plasma membrane-associated adenosine triphosphatase activity of oat roots. *Plant Physiol.* 52:6-12.
- 19.- Leonard, R. T. y Holchkiss, C. W. 1976. Cation-stimulated adenosine triphosphatase activity and cation transport in corn roots. *Plant Physiol.* 58:331-335.
- 20.- Livne, A. y Levin, N. 1967. Respiration and mitochondrial oxidative phosphorylation of NaCl-treated pea seedlings. *Plant Physiol.* 42:497-514.

- 21.- Martins, I. S. et al. 1988. Effect of the electrochemical proton gradient and anions on the ATPase activity of soybean submitochondrial particles. *Plant Physiol.* 87:384-388.
- 22.- Match, T.; Ishikawa, T. y Takahashi, E. 1989. Collapse of ATP-induced pH gradient by sodium ions in microsomal membrane vesicles prepared from *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol.* 89:180-183.
- 23.- Mitchell, P. 1976. Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells. *Federation Proc* 26:1370-1379.
- 24.- Moore, T.C. 1974. *Research Experiences in Plant Physiology* Springer-Verlag. New York. pp 119-129.
- 25.- Quazzani, Ch. y Berville, A. 1991. Isolation and antigenic characterization of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase: Studies of some Beta species and of the cytoplasmic male sterile Owen form. *Plant Science.* 74:53-64.
- 26.- Porath, E. y Poljakoff, M. A. 1964. Effect of salinity on metabolic pathways in pea root tips. *Israel J. Botany.* 13:115-121.
- 27.- \_\_\_\_\_ Pye Unicam Ltd. ed. 1975. Atomic absorption spectrophotometry with the Pye Unicam Sp 1900 and Sp 190. Series instruments. England. sp.
- 28.- Quintanar, Z.R. 1989. Control de la respiración en mitocondrias de alfalfa (*Medicago sativa*) cultivada en stress salino. ENEP IZTACALA. UNAM.
- 29.- Rains, W. 1972. Salt transport by plants in relation to salinity. *Ann Rev. Plant. Physiol.* 23: 367-388.
- 30.- Randall, S. K.; Wang, Y. y Sze, H. 1985. Purification and characterization of the soluble F<sub>1</sub>-ATPase of oat root mitochondria. *Plant Physiol.* 79:957-962. 62.

- 31.- Shu-1 Tu y Bernadene, S.J. 1985. Mechanistic investigation on the Temperature dependence and inhibition of corn root plasma membrane ATPase. Archives of Biochemistry and Biophysics 241 (2): 348-355.
- \* 32.- Iuena, M.; Martins, B. y Gómez-Puyou. 1988. Synthesis and hydrolysis of ATP by the mitochondrial ATP synthase. Biochem. Cell Biol. 66:677-682.
- Adulao? 33.- Tuena, M.; Gómez-Puyou, A. 1989. ATPsintasa. Correlaciones entre estructura y mecanismo catalítico. Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina. UNAM.
- 34.- Vitaly, L.; Spitsberg, N.; Pfeiffer, E. 1985. Isolation and antigenic characterization of corn mitochondria F<sub>1</sub>-ATPase. Plant. Physiol. 75: 339-345.
- 35.- Walker, R.; Leigh, R. 1981. Characterization of salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris*). Planta 153: 140-149.
- 36.- Wang, Y. y Sze, H. 1985. Similarities and Differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPases of oat roots. J. Biol. Chem. 260 (19) 10434-10443.
- 37.- Wharton, D. C. y McCarty, R.E. 1972. Experiments and methods in biochemistry. McMillan Pub. New York.
- 38.- Yoshida, K.; Takenchi, Y. 1970. Properties of a soluble ATPase from castorbean endosperm mitochondria. Plant Cell Physiol 11: 403-409.