



00551

6

297882

**Identificación de las proteínas de unión en
membrana plasmática, de p33/p36.**

Tesis para optar al título de maestro en Ciencias.

Estudiante : Sonia Marcela *Cuéllar* Ortiz.

Tutor : Dra. Alejandra Covarrubias Robles.

Instituto de Biotecnología.

Universidad Autónoma de México.



2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Vázquez por permitirnos usar su FPLC y sobre todo a **Pilo** por su invaluable colaboración en los procedimientos relacionados.

Al grupo del Dr. Omar Pantoja por suministrarnos los anticuerpo anti-F-MIP y al Dr. Ramón Serrano por los anticuerpos ant-ATPasa.

A las Dras: Alejandra Covarrubias, Esperanza Martínez, Georgina Ponce, Georgina Gurrola y Helena Porta, su sugerencias y correcciones que enriquecieron este texto.

A la Jefa, por aceptarme en su grupo, por lo aprendido con ella y por su paciencia. A Liz Patricia por su solidaridad. A los compañeros del grupo: Abraham, Adriana, Blanca, Emmanuel, Erika, Esperanza, Ines, Isadora, Liz, Marina, María de la Paz, Oscar, Pancho, Pepe, Ramón, Rosy y Wendy, por enriquecer este trabajo y mi formación, con sus comentarios y sugerencias. Y, a ellos junto con Jordy, Luzma, Larissa, Paco, Runying, José Luis y María Jesus por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar.

A todos los amigos que hicieron muy grata mi estancia en México durante estos tres años, especialmente a Isadora y Gerardo, por brindarme eso de familia que siempre hace falta.

Finalmente, a Mamá, Papá, Guille y Diego, al el resto de mi familia, y a los amigos, que en la distancia me apoyaron en todo este proceso.

Tabla de contenido

	Página
1. Introducción	1
1.1. Pared Celular Vegetal	1
1.1.1. Pared o matriz extracelular vegetal	1
1.1.2. La pared celular cambia con el desarrollo de células y tejidos, y lo condiciona.	1
1.1.3. Composición de la pared celular vegetal	3
1.2. Proteínas estructurales de la pared celular de plantas.	5
1.2.1. Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) o Extensinas.	7
1.2.2. Proteínas ricas en prolina (PRP).	8
1.2.3. Arabinogalactanas (AGP).	12
1.2.4. Proteínas ricas en Glicina (GRPs).	13
1.3. Interacciones de la matriz extracelular de plantas.	15
1.3.1. Interacciones célula-célula: adhesión celular.	16
1.3.2. Interacciones entre pared celular y el protoplasto.	17
1.3.2.1. La pared celular se mantiene unida al protoplasto y le transmite señales.	17
1.3.2.1.1. Comparación con el modelo animal	18
1.3.2.1.2. Proteínas WAKs	20
1.3.2.1.3. Las arabinogalactanas.	21
1.3.2.2. El protoplasto regula el estado de la pared celular en cada momento.	21
1.3.2.2.1. Exocitosis de componentes de la pared y sus modificadores.	22
1.3.2.2.2. La celulosa se ensambla en la membrana.	22

2.	Antecedentes	24
3.	Objetivos	25
4.	Materiales y métodos	26
4.1.	Material vegetal	26
4.2.	Reactivos	26
4.3.	Extracción y purificación de p33/p36.	27
4.4.	Obtención de membranas	27
4.5.	Fraccionamiento de membranas	28
4.6.	Solubilización de membranas.	28
4.7.	Extracción de proteínas asociadas a membrana.	29
4.8.	Acoplamiento de p33/p36 a una matriz de afinidad	29
4.9.	Unión de solubilizados de membrana a la sefarosa-p33/p36	30
4.10.	Ensayo de unión entre proteínas, sobre membrana de nitrocelulosa	31
4.11.	Biotinilación de p33/p36	31
4.12.	Entrecruzamiento de proteínas usando Tris(2,2' bipyridil)diclororutenio (II)	31
4.13.	Entrecruzamiento de proteínas usado glutaraldehido	32
4.14.	Electroforesis de proteínas	32
4.15.	Isoelectroenfoque de proteínas de membrana (IEF).	32
4.15.1.	Cuantificación de proteínas	33
5.	Resultados	34
5.1.	Extracción y purificación de p33/p36	34
5.2.	Obtención de una fracción enriquecida en proteínas de membrana plasmática	37

5.2.1.	Solubilización de membranas con detergentes.	39
5.3.	Detección de la unión a p33/p36 en proteínas de membrana solubilizadas o extraídas	42
5.4.	Acoplamiento de p33/p36 a agarosa-CNBr para usarla como matriz de afinidad.	44
5.5.	Identificación por afinidad de las proteínas que interactúan con p33/p36.	46
5.6.	Entrecruzamiento de p33/p36.	50
6.	Discusión.	55
7.	Conclusiones	64
8.	Bibliografía	65

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Detergentes ensayados para solubilizar membranas celulares de hojas de frijol	29
Tabla 2. Rendimiento y enriquecimiento p33/36.	37
Tabla 3. Rendimiento de la extracción de membranas plasmáticas	39
Tabla 4. Eficiencia de diferentes detergentes para solubilizar proteínas de membrana plasmática	41

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Enriquecimiento de p33/p36 de extracto ácido, mediante precipitación con sulfato de amonio.	35
Figura 2. Purificación de p33/p36 por cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200.	36
Figura 3. Fraccionamiento de membranas totales en gradiente discontinuo de sacarosa.	38
Figura 4. Solubilización de proteínas de membrana plasmática con detergentes.	42
Figura 6. Verificación de la unión de p33/p36 a Sefarosa 4B.	46
Figura 7. Unión de proteínas de membrana plasmática a sefarosa-p33/p36.	47
Figura 8. Detección de la interacción entre p33/p36 y proteínas de membrana.	49
Figura 9. Entrecruzamiento de lactato deshidrogenasa con glutaraldehido y Tris(2,2'bipiridil) diclororutenio (II).	52
Figura 10. Entrecruzamiento de p33/p36 con Tris(2,2'bipiridil)diclororutenio	53

Abreviaciones usadas

ABA	Fitohormona ácido abscísico
AGPs	Arabinogalactanas
AIA	Fitohormona ácido indol acético, auxina
AtGRP5	Proteína rica en glicina de <i>Arabidopsis</i>
AtPRP1	Proteína rica en prolina/hidroxiprolina, de <i>Arabidopsis</i>
BA	Buffer de acoplamiento: fosfato de sodio 100 mM pH 6.5 y NaCl 500 mM
BE	Buffer de entrecruzamiento: NaCl 150 mM en fosfato de sodio 15 mM
BR	Buffer de resuspensión: Tris-Mes 6 mM pH 8.0, glicerol 10 %, manitol 250 mM, DTT 2 mM
BU	Buffer de unión: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, CaCl 1 mM
DcAGP1	Arabinogalactana de zanahoria
ENOD2	Proteína rica en prolina/hidroxiprolina de los nódulos de soya
FPLC	Cromatografía de flujo líquido para proteínas
FSPRP	Proteína rica en prolina/hidroxiprolina de las fibras de lino
GAXs	Glucuronarabinoxilanos
GRPs	Proteínas ricas en glicina
GRP1.8	Proteína rica en glicina de frijol
HGAs	Homogalactouronanos
HRGP4.1	Extensina de tabaco
HRGPnt3	Extensina de <i>Brasica napus</i>
HRGPs	Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina: Extensinas
Hyp	Hidroxiprolina
HWPI	Proteína de la matriz extracelular de <i>Candida albicans</i>
IEF	Isoelectroenfoque
MsPRP2	Proteína rica en prolina/hidroxiprolina de alfalfa
NP40	Detergente: Nonidet 40
NPR1	Proteína relacionada con la respuesta a patógenos de <i>Nicotiana tabacum</i>
PBS	Buffer fisiológico de fosfatos y sales

PMSF	Fenil metil sulfoxido
PRPs	Proteínas ricas en prolina/hidroxiprolina
RG I	Ramnogalacturonanos I
RLK	Receptores relacionados con los receptores cinasa de animales
SbPRP1	Proteína rica en prolina/hidroxiprolina, de soya
SC	Proteína rica en cisteína del locus S
SCA	Adesina estigma-estilo rica en cisteína
SDS	Dodecilsulfato de sodio
sefarosa-p33/p36	Sefarosa a la que se acoplaron p33/p36
SRK	Receptor cinasa del locus S
tdClRu	Tris (2,2'bipiridil)diclororutenio (II)
TPRP-F1	Proteína rica en prolina/hidroxiprolina, de tomate
TTS	Proteína del tejido transmisor del estilo
VnF	Proteína relacionada con Vitronectina del alga Fucus
WAK	RLK asociada a la pared celular
XiGs	Xiloglucanos

Resumen

p33/p36 son glico-proteínas de la pared celular de frijol, se encuentran relacionadas antigénicamente y se acumulan en forma soluble en la pared, como respuesta a estrés hídrico y a ácido abscísico (Covarrubias *et al*, 1995). La secuencia parcial de estas proteínas las relacionan con la familia de las Proteínas Ricas en Prolina (PRPs) como PRP2 y PRP4 de soya.

Se ha observado que p33/p36 se adhieren a protoplastos de hoja de frijol y a microsomas de membrana plasmática, esta unión es competida por péptidos y proteínas que incluyen la secuencia RGD y es anulada por tratamientos con tripsina (García-Gómez, B. *et al*, 2000).

Con la finalidad de identificar la(s) proteína(s) en la membrana plasmática capaces de interactuar con p33/p36, se decidió usar una columna de afinidad con p33/p36 como anzuelo, en este trabajo se establecieron las condiciones para ello.

Se optimizó la extracción y purificación de p33/p36, a partir de plántulas de frijol sometidas a estrés hídrico, y se establecieron las condiciones para acoplar este par de proteínas en una matriz de afinidad.

Se obtuvieron fracciones enriquecidas en proteínas de membrana plasmática y se ensayaron varios detergentes para solubilizarlas. Los solubilizados se aplicaron a la matriz de afinidad preparada con p33/p36 y se obtuvo fraccionamiento de patrón de proteínas totales, indicando que hay interacción diferencial entre la sefarosa-p33/p36, y la sefarosa-albúmina que se usó como control.

1. Introducción

1.1. Pared Celular Vegetal

1.1.1. Pared o matriz extracelular vegetal

Las primeras observaciones de tejidos vegetales fueron realizadas en el siglo XVII a través de uno de los primeros microscopios ópticos que se construyeron. Hoy sabemos que lo que Hooke observó, cuando introdujo el nombre de células, fueron paredes celulares de corteza de corcho (Darnel *et al.* 1988). Con el desarrollo de la microscopía en el siglo XIX, se estableció que las células vegetales se encuentran rodeadas y circunscritas por una capa firme a la que las plantas deben su rigidez y flexibilidad. Por la misma época se identificaron las partes de la pared y su diversidad en los diferentes tejidos.

Con base en los conocimientos que se han acumulado sobre éste organelo, se ha propuesto reemplazar el nombre de **pared celular** por **matriz extracelular**, con la intención de eliminar el prejuicio derivado de la anatomía clásica de que la pared es solamente una caja rígida que contiene a las células vegetales. Independiente de cómo se le llame, hoy en día sabemos que la pared o matriz extracelular vegetal, está involucrada en eventos tan importantes como la elongación celular, la morfogénesis, la respuesta de la planta a factores bióticos y abióticos, entre otros. La complejidad de éstos procesos, y la regulación tan estrecha que deben tener al interior y al exterior de la célula, obligan a pensar en la pared celular vegetal como un componente dinámico, co-responsable de múltiples procesos importantes (Roberts 1994).

1.1.2. La pared celular cambia con el desarrollo de células y tejidos, y lo condiciona.

La pared celular vegetal se constituye durante la división de las células, a partir de vesículas que provienen del aparato de Golgi.

Estas vesículas acarrean los componentes de la membrana plasmática y contienen a los componentes de pared celular, se localizan en el plano de división de la célula, al que son guiadas por un arreglo del citoesqueleto conocido como **fragmoplasto**. Cuando las vesículas del fragmoplasto se fusionan constituyen el **plato celular** el cual crece desde el interior de la célula en división, hasta ponerse en contacto con las paredes laterales.

En su primera etapa, la matriz extracelular es delgada (usualmente entre 100 y 200 nm), se le llama **pared primaria** y es producto de la acumulación de 3 o 4 capas sucesivas de microfibrillas de celulosa. En cada capa, las microfibrillas de celulosa se orientan dependiendo de la disposición de los microtúbulos corticales, los cuales alinean al complejo de la celulosa sintetasa. La elongación celular ocurre en el eje perpendicular al de las microfibrillas de la capa de pared que se está depositando. En la medida que se acumulan nuevas capas en la matriz extracelular, en las capas anteriores las microfibrillas de celulosa se re-acomodan.

Una vez que ha cesado el crecimiento, algunas células sintetizan capas adicionales de pared celular, a las que se llama **pared secundaria**. Esta pared secundaria se relaciona con la especialización de cada tipo celular, a diferencia de la pared primaria contiene una mayor proporción de celulosa, lignina y/o suberina, y otros compuestos dependiendo del tipo de célula y de su función (Carpita & Mccann 2000).

En sistemas animales se ha establecido que algunos componentes de la matriz extracelular afectan los patrones de desarrollo de la célula, definiendo una u otra línea de diferenciación (Alberts *et al.* 1994).

En vegetales hay reportes que indican, que en embriones del alga parda *Fucus sp*, la presencia de pared celular proveniente del rizoide, es suficiente para convertir protoplastos de células del tallo en células de rizoide (Quatrano & Shaw 1997). En cultivos embriogénicos de células de zanahoria, un factor soluble que se libera a la matriz extracelular por algunas de las células presentes en el cultivo, es necesario para el desarrollo de embriones somáticos (McCabe *et al.* 1997). Otro factor soluble

localizado en la pared celular de *Zinnia sp*, es capaz de transformar células de mesófilo, en células de protoxilema parecidas a traqueidas (Pennell 1998). Estas observaciones muestran, que también en vegetales la matriz extracelular es capaz de condicionar el desarrollo de las células.

1.1.3. Composición de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal está compuesta por una red de polisacáridos y proteínas, que está embébedida en una matriz gelatinosa de carbohidratos, proteínas y otras moléculas. La composición de la pared varía entre tipos celulares y entre diferentes grupos taxonómicos (Carpita & Mccann 2000).

El principal componente de la pared celular vegetal es la **celulosa**, que representa entre el 15% y el 30% del peso seco de las paredes primarias, dependiendo del tejido y de la especie. La red de celulosa está conformada por microfibrillas, en las cuales cadenas de poly 1-4- β -D-glucosa se ensamblan mediante puentes de hidrógeno.

Las fibras de celulosa se encuentran atadas por carbohidratos no fibrilares a los que se denomina genéricamente **hemicelulosa**. Los componentes mayoritarios de la hemicelulosa son xiloglicanos (XiGs) en las dicotiledoneas y algunas monocotiledoneas, y glucuronarabinosilanos (GAXs) en las restantes monocotiledoneas y en gimnospermas (Carpita & Mccann 2000).

El otro grupo de carbohidratos abundantes en las paredes celulares vegetales, es lo que se conoce como **pectina**. La pectina es un polisacárido no fibrilar, rico en ácido D-galacturónico, heterogéneamente ramificado y muy hidratado. Los componentes mayoritarios de la pectina son: los homogalacturonanos (HGA) y ramnogalacturonanos I (RG I) (Carpita & Mccann 2000). La matriz de pectina determina la porosidad de la pared, proporciona cargas que modulan el pH y con él la dinámica iónica. Se ha propuesto que la pectina actúa en la regulación de la adhesión entre células, porque se acumula en la lamela media, y se le ha relacionado con el reconocimiento de simbiontes,

parásitos e insectos. También se ha planteado que participa en la retención de las enzimas de la matriz extracelular regulando su actividad por localización (Showalter 1993, Carpita & Mccann 2000).

Lignina y suberina son polímeros complejos compuestos por fenilpropanoides y alcoholes aromático. Se acumulan en algunas paredes secundarias y, en casos excepcionales, en paredes primarias. La lignina, la suberina y ceras como la cutina, le confieren impermeabilidad al agua a los tejidos en los que se depositan (Carpita & Mccann 2000).

Incluidas en la red de polisacáridos, se encuentran diversas proteínas, entre ellas: enzimas relacionadas con la producción de nutrientes como la glucosidasa, enzimas relacionadas con el metabolismo de la pared como las xiloglucan-transferasas, peroxidasas y lacasas, proteínas relacionadas con defensa como thioninas, proteínas de transporte como las transportadoras de lípidos, etc. (Showalter 1993, Liyama *et al.* 1994).

Formando parte de esta red que es la pared celular, se encuentran las llamadas proteínas estructurales de la pared celular vegetal. Estas proteínas estructurales comparten algunas características: son ricas en uno o dos aminoácidos, tienen dominios con secuencias repetidas y están glicosiladas en mayor o menor grado (ver más adelante) (Cassab 1998, Reiter 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998, Carpita & Mccann 2000).

La pared, como otros componentes de la célula vegetal, responde a las condiciones ambientales modificando su estructura y composición (Liyama *et al.* 1994, Cassab 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998). Estas modificaciones dependen de la planta, el tejido y la condición ambiental que los afecta, por lo cual las respuestas son diversas y complejas. Por ejemplo, en la respuesta a patógenos se acumulan en las paredes diferentes proteínas relacionadas con la defensa, como tioninas y quitinasas. También se acumulan proteínas que modifican la estructura de la pared como una peroxidasa de frijol, que se insolubiliza a sí misma en

la matriz extracelular por efecto de elicitores (Morimoto *et al.* 1999). Y en algunos casos se forman barreras de celulosa y/o otros componentes estructurales, que evitan el paso del patógeno (Brownleader *et al.* 1997, Cassab 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998, Robertson *et al.* 1999, Carpita & Mccann 2000).

En respuesta al déficit hídrico se ha encontrado que se induce la transcripción de genes que codifican para diferentes proteínas de pared celular, entre ellas varias PRPs (José-Estanyol & Puigdoménech 2000). También se ha encontrado que en la pared se acumulan proteínas como p33 y p36 de frijol, y otras proteínas como la de 10 kDa que se acumula en líneas celulares de chile, que son osmotolerantes; hasta la fecha, no se ha establecido el mecanismo de acción de ninguna de estas proteínas (Covarrubias *et al.* 1995, Quintero-Higuera *et al.* 1997). En respuesta a la sequía también se ha encontrado que la pared modifica su estructura. Ejemplo de ello, es que durante el estrés hídrico se acumulan e insolubilizan varias proteínas de *Pinus banksiana* (Marshall *et al.* 1999).

1.2. Proteínas estructurales de la pared celular de plantas.

Como se mencionó arriba, las llamadas proteínas estructurales de la pared celular son ricas en un algún aminoácido o en combinaciones de ellos y, en concordancia, se les denomina: glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs por 'hidroxiprolin-rich proteins') o extensinas, proteínas ricas en prolina/hidroxiprolina (PRPs por 'proline-rich glicoproteins'), arabinogalactanas (AGP por 'arabinogalactan-protein') y proteínas ricas en glicina (GRP por 'glycine-rich protein') (Cassab 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

Se ha planteado que las extensinas, las PRPs y las AGPs tienen un origen común a partir de un ancestro rico en prolina, hipótesis que es consistente con la localización de proteínas similares a extensinas en la pared de algas clorofíceas. Adicionalmente, se encuentran arabinogalactanas en briófitos y embriófitos, y se han reportado extensinas y proteínas ricas en prolina tanto en

gimnospermas como en angiospermas. De acuerdo con lo anterior, el motivo ProProXYLys de las proteínas ricas en prolina debió aparecer en los embriófitos tempranos, a partir del motivo Ser(Pro)₄ de las extensinas o de un ancestro común (Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

Se han reportado una proteína de maíz y otra de frijol que tienen un dominio típico de PRP y otro dominio pobre en Pro, hidrofóbico, y con varias Cys en el extremo carboxilo terminal (Williamson 1994). La identificación de éstas y otras proteínas quiméricas, que incluyen regiones características de más de una familia de proteínas, ha permitido que algunos autores sugieran que la clasificación en PRPs, HRGPs, GRPs y AGPs es más adecuada para las regiones que para las proteínas mismas (Williamson 1994, Cassab 1998).

Regiones ricas en prolina

Varias de las proteínas de la pared celular contienen regiones ricas en prolina. Las regiones ricas en prolina se encuentran en diversas proteínas tanto de plantas como de animales y de hongos. Su función aunque no está claramente establecida, se ha relacionado con interacciones entre regiones de proteínas o entre proteínas.

La presencia de estas regiones ricas en prolina en un segmento de la RNA polimerasa II y en algunos factores de transcripción, ha permitido plantear la hipótesis de que estas regiones actúan estabilizando complejos proteicos de estequiometría variable pero conformación espacial definida. La rigidez del enlace peptídico entre prolinas sugiere la hipótesis de que las regiones ricas en prolina favorecen las interacciones entre proteínas (Williamson 1994).

Relacionado con la interacción entre proteínas mediada por regiones ricas en prolina, el antígeno más abundante en la superficie celular de hifas de *Candida albicans* es una proteína rica en prolina, denominada HWPI. Esta proteína, se ubica en la matriz extracelular de la hifa y se entrecruza con las células

epiteliales del hospedero por efecto de la transglutaminasa de mamíferos (Staab *et al.* 1999).

Otro caso bien conocido de regiones ricas en prolina que se involucran en interacciones entre péptidos, se encuentra en proteínas como el colágeno. Está establecido que el colágeno constituye hélices triples que dependen de residuos prolina, estas hélices su vez, se conforman en fibras, y de estas fibras depende la actividad estructural del colágeno en la matriz extracelular de mamíferos (Baum & Brodsky 1999).

1.2.1. Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) o Extensinas.

Las extensinas están codificadas por familias de genes altamente representadas en dicotiledoneas y menos comunes en las gramíneas (Cassab 1998).

Las HRGPs son proteínas ricas en hidroxiprolina (Hyp), en serina y en ciertas combinaciones de valina, tirosina, lisina e histidina. Se caracterizan por la repetición de la secuencia Ser(Pro/Hyp)₄, y pueden presentar otras secuencias repetidas que varían de un grupo taxonómico a otro (Williamson 1994, Cassab 1998). Las extensinas están glicosiladas fundamentalmente con arabinosa (entre uno y cuatro residuos), la cual se encuentra unida mediante enlace O-glicosídico a la mayoría de los residuos de Hyp (Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

Las extensinas en solución, pueden asumir conformación en hélice de poliprolina II lo cual se comprobó mediante dicroísmo circular en extensinas de zanahoria. Usando microscopía electrónica se les ha observado en conformación de bastón ('rod-like'), la cual depende de la glicosilación en Hyp (Holst & Varner 1984).

Las extensinas se secretan a la matriz extracelular como monómeros y se ha propuesto que se inmovilizan en la pared mediante enlaces cruzados entre tirosinas (Cassab 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998). Lo anterior se sostiene, por que hay evidencia de que *in vivo* las extensinas se insolubilizan por elicitores y de que una peroxidasa de rábano es capaz de promover, *in vitro*, la formación de enlaces cruzados entre

extensinas, y entre una extensina y una PRP (Brownleader *et al.* 1997, Otte & Barz 2000). También *in vitro*, se confirmó la formación de enlaces tirosina-tirosina usando peroxidasa de pared de chícharo (Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

De otro lado, se ha caracterizado una peroxidasa de matriz extracelular de *Scutellaria baicalensis* que contiene una región tipo extensina y se inmoviliza a sí misma en la pared celular en respuesta a elicitores (Morimoto *et al.* 1999). Además, en algodón se han encontrado extensinas entrecruzadas con la fracción RGI de las pectinas (Cassab 1998).

Los patrones de expresión de diferentes extensinas como extA de *Brassica napus*, HRGP4.1 de frijol, AtEPR1 de Arabidopsis y HRGPnt3 de tabaco, sugieren que las extensinas forman parte, junto con la lignificación, de la respuesta al estrés por tensión (Cassab 1998, Merkouropoulos *et al.* 1999, Dubreucq *et al.* 2000).

Las extensinas están involucradas en la respuesta a heridas y en la respuesta al ataque por patógenos. Respecto de lo último, hay evidencias que sugieren que las HRGPs participan en la constitución de barreras físicas para inmovilizar al patógeno atacante (Williamson 1994, Cassab 1998, Merkouropoulos *et al.* 1999).

Finalmente, algunas extensinas presentan patrones de expresión específicos durante el desarrollo de diferentes tejidos (Reiter 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998, Merkouropoulos *et al.* 1999, Dubreucq *et al.* 2000). El que las extensinas interactúen con otros componentes de la pared, se estructuren en fibras, se asocien con la formación de barreras y la resistencia a tensión mecánica, ha hecho pensar que las extensinas desempeñan una función estructural en la pared celular.

1.2.2. Proteínas ricas en prolina (PRP).

Las PRPs están codificadas por familias de varios genes que se caracterizan por tener secuencias repetidas y/o palindrómicas del motivo ProProXYLys en donde X puede ser valina, treonina, histidina o alanina y Y puede ser triptofano, treonina, glutámico o prolina. El segundo residuo de Pro (y/o el tercero en caso de

existir) suelen estar modificados post-transcripcionalmente por hidroxilación (Williamson 1994)

Las PRPs son proteínas básicas por su alto contenido de lisina y están poco glicosiladas con arabinosa y en algunos casos con galactosa. La glicosilación sucede fundamentalmente mediante enlaces O-glicosídicos aunque existe N-glicosilación (Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

De acuerdo con el análisis de las secuencias génicas descritas, Fowler y colaboradores proponen la subdivisión de las PRPs en tres grupos. El primer grupo, en el que se incluye una PRP de zanahoria, SbPRP1 y SbPRP2 de soya, se caracteriza porque su estructura primaria se compone, casi exclusivamente, de repetidos del pentapéptido típico PPV(Y/H/E)(K/T) (Fowler *et al.* 1999).

En el segundo grupo se incluyen PvPRP1 de frijol, TPRP-F1 de tomate, AtPRP1 y AtPRP3 de *Arabidopsis*. Este grupo, se caracteriza porque la región amino terminal de estas proteínas contiene, aparte de la señal putativa de tránsito a la matriz extracelular, una región rica en prolina que incluye los repetidos PPXYK característicos de la familia. En cambio, la región carboxilo terminal de las proteínas de este grupo es pobre en prolina, sin repetidos y generalmente cargada. Para algunas de las proteínas de la pared celular que presentan esta estructura bipartita, se ha planteado que están involucradas en interacciones con otros componentes de la pared (Fowler *et al.* 1999).

En este segundo grupo, al que corresponderían MsPRP2 de alfalfa (Deutch & Winicov 1995) y DcAGP1 de zanahoria (Baldwin *et al.* 2001), se encuentran las proteínas que José-Estanyol y Puigdoménech denominan PRPs híbridas. Las PRPs híbridas se caracterizan por que la región carboxilo terminal de la proteína es hidrofóbica, contiene seis u ocho cisteínas conservadas, no contiene repetidos ni es abundante en prolina (José-Estanyol & Puigdoménech 2000).

El tercer grupo de las PRPs se define a partir de AtPRP2 y AtPRP4 de *Arabidopsis*. Las proteínas de este grupo presentan en la región amino terminal la correspondiente señal putativa de tránsito a la matriz extracelular y una región sin secuencias

repetidas. En la región carboxilo terminal son ricas en prolina y contienen secuencias repetidas PPV y P(V/I)YKPPV, también contienen repetida la secuencia KKPCPP que esta presente en otras PRPs y se considera susceptible a entrecruzamiento mediante enlaces bisulfuro (Fowler *et al.* 1999).

En cuanto a la localización a las PRPs, se les ha encontrado en diferentes tejidos y acumuladas en respuesta a diferentes estímulos. Se han identificado PRPs en tejido en desarrollo de soya, en tejido sexual de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana glauca*, en fibras de algodón, en embriones de maíz, en frutos de tomate, en alfalfa, en frijol, en nódulos inducidos por *Rhizobium sp* en legumbres, entre otros (Hong *et al.* 1990, Showalter 1993, Williamson 1994, Deutch & Winicov 1995, Orford & Timmins 1997, Cassab 1998, Reiter 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998, José-Estanyol & Puigdoménech 2000). Se ha identificado inducción de la expresión de diferentes PRPs en respuesta a heridas, en respuesta al ataque de patógenos, en respuesta a estrés tensil, en respuesta a déficit hídrico, en respuesta a sales y en respuesta a bajas temperaturas. También se les ha encontrado durante la embriogénesis somática, en el desarrollo de embriones zigóticos, en la maduración del fruto y en la formación de pelos radicales. (Creelman & Mullet 1991, Covarrubias *et al.* 1995, Orford & Timmins 1997, Cassab 1998, José-Estanyol & Puigdoménech 1998, Fowler *et al.* 1999, Bernhardt & Tirney 2000).

Las PRPs como las extensinas, han sido implicadas en la lignificación por la afinidad observada de los residuos de prolina con los grupos fenólicos, lo que concuerda con que se les encuentra en xilema, protoxilema y en floema (Cassab 1998, Fowler *et al.* 1999, José-Estanyol & Puigdoménech 2000). Sin embargo, el transcrito de FSPRP de fibras de algodón es abundante durante los primeros estadios del desarrollo de las fibras y disminuye cuando se sintetiza la pared secundaria (Orford & Timmins 1997). Esta evidencia pone en duda el que la familia de las PRPs se relacione exclusivamente con las células diferenciadas y la pared secundaria.

Adicionalmente, la expresión de AtPRP3 está limitada a los tricoblastos (células de epidermis de raíz que forman pelos radicales) y está afectada por auxinas y etileno igual que la formación de pelos radicales. De lo que se asume, que esta proteína que se relaciona con alguna característica particular de los tricoblastos a lo largo de su diferenciación (Bernhardt & Tirney 2000).

También, existen las proteínas TTS (por 'transmitting tissue style') a las cuales se les ha considerado intermedias entre PRPs y AGPs. En el tejido transmisor del estilo, que está compuesto por las matrices extracelulares de las células del estilo, TTS1 contribuye con el gradiente de glicosilación del que depende la migración del tubo polínico. (Reiter 1998).

Estos resultados indican que no es posible asociar a la familia de las PRPs con un estadio particular del desarrollo celular, ya que se les encuentra tanto, durante la diferenciación de los tejidos, como en las etapas diferenciadas.

En cuanto a la función, evidencia indirecta indica que algunas PRPs (como las extensinas) se insolubilizan rápidamente en la pared en respuesta a elicitores y estrés mecánico, en un proceso catalizado por peroxidasas de la pared. Por analogía con las extensinas, se ha propuesto que esta insolubilización depende de enlaces tirosina-tirosina (Liyama *et al.* 1994, Williamson 1994, Sommer-Knudsen *et al.* 1998, Otte & Barz 2000).

También se ha planteado que las PRPs pueden interactuar iónicamente, por ejemplo con las pectinas ácidas. Lo cual se deriva de su alto punto iso-eléctrico y el que se solubilizan parcialmente con sal (Williamson 1994, Cassab 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

Estas propiedades han hecho que se proponga que las PRPs desempeñan un papel estructural, sin embargo, también se ha planteado que las PRP híbridas podrían interactuar con la membrana plasmática a través de la región hidrofóbica del segmento carboxilo terminal (José-Estanyol & Puigdoménech 2000).

1.2.3. Arabinogalactanas (AGP).

Estos proteoglicanos se caracterizan porque sólo el 10% del peso (o menos) es proteína, el restante 90% del peso son carbohidratos, los cuales están compuestos fundamentalmente por arabinosa, aunque otros azúcares pueden estar presentes. La glicosilación de las AGPs generalmente está compuesta por cadenas de polisacáridos grandes de (50 residuos o más), muy ramificados que se unen al péptido mediante enlaces O-glicosídicos en Ser e Hyp (Sommer-Knudsen *et al.* 1998). Un sólo núcleo proteico puede glicosilarse de múltiples formas (Williamson 1994).

El péptido de las arabinogalactanas es rico en hidroxiprolina, alanina, treonina, serina, y glicina, contiene varios repetidos Ala-Hyp y su composición final de aminoácidos varía entre especies y tejidos (Williamson 1994, Cassab 1998, Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

Las arabinogalactanas son resistentes a altas temperaturas y a tratamiento con álcali en frío, así como a proteólisis, gracias a la altísima glicosilación (Williamson 1994, Cassab 1998). A pesar de lo anterior, experimentos de pulso y caza revelaron que la vida media de algunas AGPs es muy corta, lo que se ha atribuido a un mecanismo activo de degradación específica (Cassab 1998).

Las arabinogalactanas, como las oligosacarinas, pueden ser internalizadas por un sistema de vesículas, mediado por un receptor de endocitosis y pueden ser acumuladas en la vacuola (Williamson 1994). Este sistema de transporte puede estar relacionado con el mencionado mecanismo de recambio de AGPs (Cassab 1998).

Las arabinogalactanas se encuentran presentes en gomas, exudados y en la pared celular, comúnmente se asume que no están unidas covalentemente a los demás componentes de la pared, como las extensinas o las PRPs (Cassab 1998). Sin embargo, evidencia reciente indica que hay una fracción de AGPs en fibras de lino, que sólo puede liberarse de la pared, con tratamientos a pH básico o mediante degradación con celulasa. Esto indica que al menos esta fracción de las AGPs está

firmemente atada al componente celulósico de la pared (Girault *et al.* 2000).

Se ha propuesto que las AGPs actúan como barreras, lubricantes y/o humectantes. (Williamson 1994, Cassab 1998). También se ha observado que las AGPs actúan en la morforregulación en plantas no vasculares como en briófitos y hepáticas. Actúan en la regulación de la embriogénesis somática en zanahoria y se les relaciona con la expansión y muerte celular (McCabe *et al.* 1997). De hecho, LeAGP1 de tomate se inmunodetecta en tejido vascular en diferenciación y desaparece en los vasos diferenciados, lo que la relaciona con el patrón de muerte celular programada (Gao & Showalter 2000).

Por otro lado, en tubos polínicos de *Lilium sp.*, usando el reactivo Yariv que une arabinogalactanas, se estableció la importancia de AGPs para el ensamble correcto de la pared en este órgano (Roy *et al.* 1998).

1.2.4. Proteínas ricas en Glicina (GRPs).

Al igual que las extensinas y las PRPs, las proteínas ricas en glicina están codificadas por familias de varios genes y su expresión está regulada durante el desarrollo, y por múltiples estímulos como el daño, el frío, la luz, el ritmo circadiano, la infección de patógenos y las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (AIA) (Williamson 1994, Reiter 1998, Sacheto-Martins *et al.* 2000).

Como su nombre lo indica, las GRPs se caracterizan por su alto contenido de glicina (hasta el 70%) y por que en su estructura primaria presenta secuencias cortas (Gly-X) repetidas (Keller 1993, Williamson 1994, Cassab 1998).

La presencia de un péptido señal putativo en el extremo N-terminal, en la mayoría de las secuencias de cDNA aisladas, sugirió que las GRPs son transportadas a la pared celular y esta localización ha sido confirmada mediante ensayos de inmunolocalización (Williamson 1994, Ryser *et al.* 1997, Cassab 1998). Sin embargo, también se ha confirmado la presencia citosólica y en el núcleo de algunas GRPs que carecen del péptido señal (Sacheto-Martins *et al.* 2000).

De hecho, con base en la secuencia de aminoácidos predicha, las GRPs de plantas se pueden agrupar en dos categorías: las que transitan por el retículo endoplásmico (hacia la pared, en los casos que está confirmado), y las que unen RNA, como lo hacen algunas proteínas ricas en glicina de animales y hongos (Sacheto-Martins *et al.* 2000).

A las GRPs de pared se les asocia con células en proceso de lignificación, por lo que se asume juegan un papel importante en el desarrollo del tejido vascular y en respuesta al estrés por heridas (Ryser *et al.* 1997, Cassab 1998). Sin embargo, algunas AGPs se acumulan preferencialmente en tejidos como la epidermis de hojas y polen, las anteras, el estilo, los óvulos y los frutos maduros, los nódulos inducidos por *Rhizobium sp* y los entrenudos, que no son tejidos que se lignifiquen. Todo lo anterior dificulta las generalizaciones respecto a su función (Sacheto-Martins *et al.* 2000).

Algunas GRPs se acumulan en xilema y aparentemente, se transportan desde el parénquima del xilema en donde, mediante anticuerpos, se ha evidenciado la presencia de GRP1.8 en el aparato de Golgi (Ryser *et al.* 1997).

Con base en las secuencias de aminoácidos, se predicen dos tipos de estructura terciaria para las GRPs. La primera, conformación en 'loops' de glicina (velcro), la que es un estructura flexible que favorece las interacciones entre proteínas y que puede regularse en condiciones de estrés, y la segunda, conformación en hojas β plegadas, que se sugiere está relacionada con elasticidad y resistencia tensil durante el desarrollo de la pared secundaria. Además, las láminas β pueden alinear aminoácidos hidrofóbicos en una de las caras, lo que les permitiría interactuar con lípidos y/o membranas (Sacheto-Martins *et al.* 2000). De hecho GRP1.8, una proteína rica en glicina de frijol, establece interacciones hidrofóbicas en la pared celular de protoxilema joven. (Ringli *et al.* 2001). Otras GRPs se relacionan con la membrana o están asociadas a ella, por ejemplo AtGRP5 y GPRP, para las que se ha sugerido que están involucradas en el tráfico vesicular (Sacheto-Martins *et al.* 2000).

Las GRPs de plantas con secuencias de unión a RNA presentan un consenso de unión del tipo RNPI. Al menos para una de ellas se ha demostrado su unión *in vitro* a RNA y DNA de cadena sencilla, y hay evidencia de que se fosforilan. A diferencia de las GRPs de pared, las GRPs que unen RNA se expresan en todos los órganos de la planta y se regulan por el ritmo circadiano y por algunas condiciones de estrés. De ahí se ha sugerido que formen parte de la maquinaria de maduración de mensajeros (Sacheto-Martins *et al.* 2000).

Como las extensinas y las PRPs, los residuos Tyr presentes en algunas GRPs podrían formar enlaces cruzados, lo que les permitiría a las GRPs entrecruzarse entre ellas y con otras proteínas como extensinas y PRPs (Sacheto-Martins *et al.* 2000); también podrían transglutaminarse por sus altos contenidos de glutámico (Ringli *et al.* 2001). Sin embargo, el hecho de que se extraen de aleurona con agua caliente, sugiere que las GRP están unidas a la pared celular por enlaces iónicos con carbohidratos, más que por entrecruzamiento (Sacheto-Martins *et al.* 2000). Ringli y colaboradores dan luces al dilema demostrando por un lado, que GRP1.8 se puede extraer con sales de hipocotilos jóvenes y no de hipocotilos maduros de frijol, de lo que se presume que esta proteína se inmoviliza por entrecruzamiento en tejido maduro. Por otro lado, los mismos autores demuestran que segmentos de GRP1.8 que incluyen tirosina puede entrecruzarse en presencia de H₂O₂ y peroxidasa de rábano, mientras que segmentos de wGRP1 que no incluyen tirosina no lo hacen, con lo que se confirma que las GRPs pueden entrecruzarse mediante las tirosinas, además de que la inmovilización de GRP1.8 en la pared celular está regulada por el desarrollo (Ringli *et al.* 2001).

1.3. Interacciones de la matriz extracelular de plantas.

La matriz extracelular se conecta y comunica en dos direcciones. Por un lado, la pared es el organelo más externo de la célula y por ende de ella dependen las interacciones entre células y entre tejidos. Estas interacciones están mediadas por el fenómeno

conocido como **adhesión celular**. De otro lado, la pared se mantiene en constante comunicación con el interior celular, esta interacción entre la pared y protoplasto es dinámica y mantiene el vínculo físico entre estos dos componentes celulares, entre otras funciones.

1.3.1. Interacciones célula-célula: adhesión celular.

Las células vegetales son en su mayoría inmóviles, de ahí que sus interacciones directas en general están restringidas a la comunicación a través de plasmodesmos y a la adhesión entre células vecinas a través de la lamela media de la pared (Lole & Pruitt 1999). Sin embargo, existen algunos casos de células o estadios de desarrollo móviles, en los que la adhesión de una célula con otra o la adhesión a un sustrato, son determinantes.

Durante la fecundación, el polen que es móvil se une al tejido transmisor del estilo, el cual promueve la germinación y conduce al tubo polínico hasta el saco embrionario. Del correcto desarrollo de este proceso depende la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y finalmente la polinización, incluido el fenómeno de auto-incompatibilidad del polen que se presenta en algunas especies (Lord 2000).

En la adhesión entre el polen y la matriz extracelular del estilo participan moléculas involucradas con la auto-incompatibilidad como el receptor SRK y su ligando SC en *Brasica napus* (Brugière *et al.* 2000). Se ha encontrado que una proteína parecida a una transferasa de lípidos (SCA por 'stigma-stylo cystein rich adhesin') y una pectina, son necesarias para la adhesión de los tubos polínicos a una matriz estilar simulada *in vitro* (Mollet *et al.* 2000, Park *et al.* 2000). De acuerdo con inmunolocalizaciones, SCA se encuentra presente en la matriz extracelular estilar y es transferida o inducida en tubos polínicos que germinan *in vivo*, más no en los que germinan *in vitro* (Park *et al.* 2000).

En otro modelo, se encontró que el fucodano F2 y VnF están relacionados con la habilidad del embrión del alga *Fucus sp* para adherir al sustrato. VnF es una proteína presente en la matriz extracelular de *Fucus sp* que se relaciona con vitronectina, la cual

es una proteína presente en matriz extracelular de animales involucrada en la adhesión celular (ver más adelante) (Quatrano & Shaw 1997).

Otro evento en el que células diferenciadas interactúan es la fusión de carpelos postgénita, en donde células epidérmicas del primordio floral interactúan a través de la cutícula, se adhieren y posiblemente re-programan su diferenciación para dar lugar al sincarpio. Por análisis de mutantes se sabe que en este proceso están involucradas ceras de la cutícula. Posiblemente estas ceras afectan la permeabilidad a factores solubles presentes en la matriz extracelular, disparan la rediferenciación cuando las células carpelares se ponen en contacto (Lole & Pruitt 1999).

1.3.2. Interacciones entre pared celular y el protoplasto.

La interacción entre pared y protoplasto mantiene el vínculo físico entre estos dos componentes celulares y media el flujo de información hacia el interior de la célula transmitiendo señales que dan cuenta de las condiciones del ambiente extracitoplasmático. En el otro sentido, de adentro hacia afuera, el protoplasto regula el estado de la pared en cada momento, dependiendo del desarrollo del tejido y las condiciones ambientales.

1.3.2.1. La pared celular se mantiene unida al protoplasto y le transmite señales.

Durante el fenómeno conocido como **plasmólisis**, que es la separación del protoplasto vivo de la pared celular por un efecto hiperosmótico, la interacción física entre la pared celular y el protoplasto se hace evidente (Oparka 1994). Durante la plasmólisis, el protoplasto se mantiene unido a la pared celular a través de las estructuras conocidas como **Fibras de Hechtian**, que son prolongaciones del citoplasma y la membrana plasmática, no perturbables por drogas que afectan el citoesqueleto (Lang-Pauluzzi 2000). Se sabe, por estudios de microscopía óptica (Pont-Lezica *et al.* 1993) y microscopía de luz ultravioleta, que las fibras de Hechtian no dependen de los

plasmodesmos y que en la membrana se anclan en un punto fijo, independiente de la movilidad del citoplasma (Lang-Pauluzzi 2000).

En experimentos que combinan patógenos, con hospederos compatibles y no compatibles, y plasmólisis parcial, se demostró que la adhesión entre la pared y la membrana plasmática es necesaria para la respuesta de la matriz extracelular a la infección por patógenos. En los mismos ensayos se evidenció, que el citoesqueleto de actina está involucrado en la respuesta a patógenos (Mellersh & Heath 2001).

Ya se han mencionado en este texto, otros ejemplos en los que la comunicación entre la pared y el citoplasma son definitivos. ¿Quién comunica al núcleo y el citoplasma con la pared celular vegetal y como lo hace? ¿Cómo se atan los protoplastos a la pared? Respecto a estas preguntas hay varios frentes de investigación.

1.3.2.1.1. Comparación con el modelo animal

En la última década se encontraron evidencias que le permitieron a algunos autores plantear, que el mecanismo de interacción entre el citoplasma y la pared celular de células vegetales, es similar al mecanismo bien conocido de interacción entre la matriz extracelular animal y la membrana plasmática de células animales (Pont-Lezica *et al.* 1993, Wyatt & Carpita 1993, Reuzeau & Pont-Lezica 1995).

En animales está establecido el papel de la matriz extracelular y sus interacciones con la membrana plasmática, en procesos de diferenciación celular, morfogénesis, migración celular, respuesta a diferentes estímulos y, en general, en los procesos en los que es definitiva la comunicación de la célula con el medio ambiente externo (Alberts *et al.* 1994). Las interacciones entre células dependen en muchos casos de la adhesión entre ellas y están mediadas por moléculas de la matriz extracelular como fibronectina, vitronectina, colágeno I, laminina y sus receptores en membrana plasmática, las **integrinas**.

Las integrinas son heterodímeros transmembranales que se conectan mediante su segmento citoplasmático con el citoesqueleto, y mediante su segmento extracelular interactúan

con, las mencionadas, proteínas de la matriz extracelular (Giaconti & Ruoslahti 1999). El reconocimiento de las integrinas por sus ligandos está mediado, en muchos de los casos, por la presencia en el ligando de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) (Alberts *et al.* 1994).

En plantas hay múltiples reportes de inmunolocalización de proteínas relacionadas con integrinas o sus ligandos, de hecho ya se mencionó a VnF, proteína relacionada con vitronectina, que está presente en la pared celular de embriones de *Fucus sp* (Fowler & Quatrano 1997).

Adicionalmente se ha reportado, la presencia de péptidos que unen anticuerpos anti-vitronectina en tomate, soya, *Lilium sp*, y *Physarum polycephalum* (Faik *et al.* 1998). En células de zanahoria una proteína inmunológicamente relacionada con vitronectina, se encuentra involucrada en la infección por *Agrobacterium sp* (Faik *et al.* 1998). También mediante inmunodetección, en células de tabaco adaptadas a alta sal, se reportó el enriquecimiento de la membrana en proteínas relacionadas con vitronectina y fibronectina humanas (Zhu *et al.* 1993).

En células en cultivo de soya se inmunodetectó un péptido relacionado con el receptor de vitronectina (Schindler *et al.* 1989). Anticuerpos contra las integrinas $\alpha\beta$ 1 y α IIb β 3 detectan proteínas en *Arabidopsis* y cebolla (Kiba *et al.* 1998) y en *Arabidopsis* y *Rubus sp* (Faik *et al.* 1998). Anticuerpos policlonales contra las integrinas β 1, α IIb β 3 de mamíferos, detectan en callos de maíz, glicoproteínas que podrían corresponder a las integrinas α IIb, a β 1 y β 3 (Labouré *et al.* 1999). En otro estudio con anticuerpos se encontraron proteínas relacionadas con las integrinas α V β 3 y β 1 en tubos polínicos de *Lilium sp* y tabaco (Sun *et al.* 2000).

Adicionalmente, se identificó en *Arabidopsis* un cDNA con similitud a genes que codifican para integrinas (Nagpal & Quatrano 1998).

A pesar de todo lo anterior, el enfoque inmunológico en relación con el modelo animal, ha conducido a el aislamiento de proteínas

que no están relacionadas con la matriz extracelular de plantas (Kohon 2000).

Paralelamente al uso de anticuerpos anti-integrinas animales, hay múltiples reportes en los que se ha visto cómo péptidos que incluyen la secuencia RGD causan diferentes efectos en plantas. Los péptidos que incluyen la secuencia RGD alteran la pared celular, desatan la membrana plasmática de la pared y promueven el desarrollo en cultivos celulares de soya y de *Arabidopsis* (Schindler *et al.* 1989, Faik *et al.* 1998). Estos péptidos, afectan la percepción de estímulos gravitatorios en el alga *Chara sp.*, inhiben la producción de fitoalexinas estimulada por elicitores e inducen embriogénesis somática en callos de maíz (Faik *et al.* 1998, Kiba *et al.* 1998, Labouré *et al.* 1999). Del mismo modo, los péptidos RGD disminuyen la acumulación de H₂O₂ y de calosa en la pared celular de *Vignia unguolata*. Tanto peróxido como calosa se acumulan normalmente en respuesta a la infección por hongos patógenos (Mellersh & Heath 2001). Adicionalmente, se ha visto que péptidos que incluyen la secuencia RGD, aplicados sobre el estigma de *Lilium sp* alteran el desarrollo del tubo polínico (Sun *et al.* 2000). De todo lo anterior se ha propuesto que estos efectos se deben a que los péptidos RGD producen interacciones aberrantes entre la pared y la membrana, porque perturban la interacción entre moléculas relacionadas, al menos funcionalmente, con las integrinas animales y sus ligandos. Finalmente, y reforzando esa hipótesis, Canut y colaboradores, establecieron la presencia en membrana plasmática de *Arabidopsis* de dos sitios específicos de unión a RGD. De naturaleza proteica, estos sitios de unión son uno de baja afinidad y el otro de alta afinidad (Canut *et al.* 1998). Por otro lado, Mellersch *et al* demostraron que péptidos que incluyen la secuencia RGD desaparecen las Fibras de Hechtian en células epidérmicas de *Vignia unguolata* (Mellersh & Heath 2001).

1.3.2.1.2. Proteínas WAKs

A partir del análisis de los bancos de secuencias de *Arabidopsis*, se identificaron y clonaron la proteínas WAK, así denominadas por 'wall-associated kinases'. Estas son proteínas de la familia de las proteínas de plantas parecidas a receptores cinasa de

animales (RLK). Las Wak contienen un dominio transmembranal, un dominio intracelular con actividad cinasa y un dominio extracelular que presenta homología con el factor de crecimiento epidérmico (EFG) y con una proteína viral involucrada en movimiento. En *Arabidopsis*, las proteínas WAK están codificadas por una familia de cinco genes (Wak1-5) que se expresan diferencialmente (He *et al.* 1999, Wagner & Kohorn 2001). Wak1 está involucrada en la respuesta a patógenos. Su mensajero, como el de Wak2, 3 y 5, se induce por ácido salicílico y por infección con *Pseudomonas syringae*, y esta inducción depende de la proteína relacionada con la respuesta a patógenos NPR1. Más aún, plantas de *Arabidopsis* transformadas con el antisentido de Wak1 mostraron que esta proteína se requiere, para que la planta sobreviva a la respuesta que ella misma monta ante la infección de un patógeno (He *et al.* 1998).

Usando un anticuerpo contra Wak1 se evidenció que esta proteína se ubica en membrana y se ancla a la pared de donde sólo se libera mediante tratamientos con SDS al 4% y DTT 50 mM, lo que evidentemente ubica a estas proteínas entre los componentes que vinculan a la pared celular con la membrana y el citoplasma (He *et al.* 1996).

1.3.2.1.3. Las arabinogalactanas.

La ubicación en la pared celular de las AGPs, el que sean solubles y difundibles, su actividad en morfogénesis y su endocitosis, ha hecho pensar que éstas proteínas, pueden estar involucradas en la comunicación célula a célula y que participan en la transmisión de la información posicional, que es fundamental para regular la forma y la especialización celular (Williamson 1994, Cassab 1998). En ese sentido, recientemente se encontró que algunas AGPs están atadas a la membrana mediante enlaces miristoil. Todo lo anterior ha permitido que se proponga a las AGPs como moléculas candidatas en la interacción entre la pared y la membrana plasmática (Kohon 2000).

1.3.2.2. El protoplasto regula el estado de la pared celular en cada momento.

La composición de la pared celular está constantemente regulada por proceso transcripcionales y post-transcripcionales, que

dependen del estado de desarrollo y las condiciones ambientales del tejido.

Esta regulación de la composición de la pared, está mediada por el tráfico de vesículas y la exocitosis de los componentes de la pared y/o de las enzimas que los modifican, estructuran, ensamblan o degradan. Al tiempo, la composición y estructura de la pared está mediada por la síntesis en membrana de los componentes celulósicos de la matriz extracelular.

1.3.2.2.1. Exocitosis de componentes de la pared y sus modificadores.

La pared celular se mantiene en constante recambio y modificación mientras la célula está viva. La mayoría de los componentes de la matriz extracelular llegan hasta ella en vesículas que provienen del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. El direccionamiento de estas vesículas define el crecimiento de los tubos polínicos, el desarrollo de los pelos radicales, de los tricomas, de las células guarda, etc. Además, la orientación de la exocitosis es determinante en funciones importantes como el desarrollo del polen y la embriogénesis temprana (Belanger & Quatrano 2000).

Los procesos morfogenéticos en diferentes organismos incluyen algunos elementos comunes: la definición de un sitio cortical determinado por señales internas o externas, el ensamblaje del citoesqueleto anclado a ese sitio cortical, y el tráfico de vesículas orientado por el citoesqueleto que relaciona al citoplasma con la matriz extracelular modificándola localmente (Fowler & Quatrano 1997).

1.3.2.2.2. La celulosa se ensambla en la membrana.

La celulosa es el componente fundamental de las paredes celulares vegetales. De los patrones de acumulación de la celulosa y su recambio, depende la forma y la orientación de la elongación de la célula. Esto hace pensar que parte importante de la interacción entre el citoplasma y la matriz extracelular está mediada por la celulosa sintetasa y las otras enzimas encargadas del recambio y mantenimiento de la celulosa (Kohon 2000).

Por observaciones al microscopio electrónico se sabe que la celulosa sintetasa se conforma en un complejo hexamérico que se

localiza en la membrana plasmática y se le ha encontrado asociada en el interior de la membrana con la enzima sacarosa sintetasa (Susy) y con una GTPasa pequeña (Kohon 2000, Perrin 2001).

La celulosa sintetasa de plantas (CelA) pertenece a una gran familia de genes en *Arabidopsis*. Datos provenientes del análisis de mutantes han permitido plantear que cada complejo hexamérico está constituido por dímeros funcionales compuestos por celulosas sintetosas diferentes, y que la composición de estos dímeros debe estar regulada en cada tejido y, seguramente, en los diferentes estadios de desarrollo de las células (Saxena & Brown-Jr. 2000, Perrin 2001).

2. Antecedentes

En trabajos anteriores en nuestro laboratorio, se identificaron dos glicoproteínas presentes en la fracción soluble de la matriz extracelular de células de frijol, a las que se denominó p33 y p36 (Covarrubias *et al.* 1995). Dichas proteínas se relacionan antigénicamente, se acumulan en forma soluble en la pared celular como respuesta a estrés hídrico y a ácido abscísico, pero no se acumulan en respuesta a heridas.

La secuencia parcial de p33/p36 reveló la presencia del motivo PPVYKPPVEK de lo que se deduce su relación con la familia de las PRPs como PRP2 y PRP4 de soya (García-Gómez *et al.* 2000).

Se ha visto que p33/p36 se adhieren a protoplastos de hoja de frijol, y que esta adherencia, se abate cuando los protoplastos se tratan con la proteasa tripsina y se compite con anticuerpos anti-p33. Resultados similares se encuentran en experimentos de unión a microsomas de membrana plasmática, en los que se detectó que p33 y p36 unen a la membrana juntas y cada una por separado, y que esta unión es favorecida por la adición de calcio.

La adherencia entre p33/p36 y la membrana también se compite por la adición de péptidos que incluyen la secuencia RGD, la cual participa en la interacción entre la matriz extracelular y la membrana plasmática en animales. Esta secuencia se encuentra en proteínas de la matriz extracelular animal que unen a receptores de membrana tipo integrina, de los cuales no hay homólogos reportados en plantas.

Usando p33/p36 marcada con biotina y proteínas de membranas plasmáticas purificadas, se encontró, mediante ensayo de unión entre proteínas sobre nitrocelulosa, que p33 y p36 juntas y separadas reconocen a una proteína de membrana plasmática de 80 kDa a la que llamamos pmp80 (García-Gómez *et al.* 2000).

La importancia de la interacción entre la matriz extracelular y la membrana plasmática en diferentes procesos, incluyendo la respuesta a estrés, hace que sea muy importante profundizar en estos estudios en la mira de establecer con quien interactúan p33/p36 en la membrana.

Hipótesis

Proteínas de la matriz extracelular vegetal como p33 y p36 de frijol, que se inducen en respuesta a estrés hídrico, interactúan con proteínas de la membrana plasmática.

3. Objetivo General

Identificar la(s) proteína(s) de membrana que se unen a p33/p36.

Objetivos específicos

- Implementar la purificación de p33/p36 a mediante cromatografía de líquida de baja presión (FPLC).
- Establecer las condiciones para obtener y solubilizar membranas plasmáticas de frijol.
- Ensayar diferentes metodologías para identificar a la(s) proteína(s) de membrana que unen a p33/p36, como: cromatografía de afinidad y entrecruzamiento de proteínas.
- Establecer las condiciones para obtener una matriz de afinidad con p33/p36 acoplada.
- Identificar la(s) proteínas de membrana que unen a p33/p36 usando la matriz de afinidad con p33/p36.
- Explorar alternativas diferentes a la purificación por afinidad, para identificar la (o las) proteína(s) de la membrana plasmática que interactúan con p33/p36.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Negro Jamapa (PRONASE), se desinfectaron superficialmente durante 15 minutos con hipoclorito de sodio 10 % (v/v del producto comercial, Clorox) y se lavaron exhaustivamente con agua hasta eliminar el hipoclorito. Se incubaron en oscuridad a 24 °C (+/- 2 °C), sobre papel absorbente saturado de agua, en bandejas cubiertas con papel aluminio para mantener en el ambiente una humedad relativa cercana al 100 %. Las plántulas se trasplantaron cuando tenían entre 3 y 4 cm de longitud.

Para el tratamiento de estrés hídrico, las plántulas se trasplantaron a vermiculita humedecida con 500 µl de agua destilada por gramo de vermiculita, que corresponde aproximadamente a un potencial hídrico (Ψ_w) de -0.38 MPa. Las plántulas se mantuvieron sin regar durante tres días en oscuridad a 24 °C (± 2 °C) (Covarrubias *et al.* 1995).

Para la extracción de membranas se usaron plantas de 30 días, mantenidas en condiciones de invernadero a 25 °C (± 5 °C) con riego óptimo y suplemento de macro y micro nutrientes (García-Gómez *et al.* 2000).

4.2. Reactivos

Todos los reactivos usados durante este trabajo fueron grado analítico. La columna de exclusión molecular Superdex 200 y la resina para afinidad Sepharosa-4B, son fabricadas por Amersham Pharmacia Biotech. Se usaron los detergentes, Tween-20 y Tritón-X100 marca Sigma, octilglucósido y Chaps marca Research Organics, deoxicolato de sodio marca Merck y Zwittergent 13-14 marca Hampton. El Tris(2,2'-bipiridil)dichlororutenio (II) fue provisto por Sigma y el glutaraldehido grado microscopía electrónica se usó marca SPI.

Se usaron anticuerpos policlonales anti-p33 de frijol obtenidos en el laboratorio, anticuerpos policlonales anti-MIP-F de

Mesembrantemun sp, obtenidos en el laboratorio del Dr. Omar Pantoja y anticuerpos policlonales anti-H⁺ATPasa de membrana plasmática de *Arabidopsis* obtenidos en el laboratorio del Dr. Ramón Serrano.

4.3. Extracción y purificación de p33/p36.

Después del tratamiento de estrés, se cosecharon hipocotilos y raíces en nitrógeno líquido. El tejido congelado y molido, se incubó a 4 °C en buffer ácido (75 % etanol, 3.36 % HCl, 0.1 % metabisulfito de sodio p/v, 1 % polivinilpolipirrolidona p/v) durante 48 h, bajo agitación continua. Se centrifugó a 25,000 g durante 20 minutos para retirar restos celulares y de tejido, se precipitó el sobrenadante con 3 volúmenes de acetona fría durante 16 h a -20 °C.

Después de centrifugar a 25,000 g durante 20 minutos, la pastilla se lavó con acetona fría (tres lavados) y con acetona al 80 %. La pastilla se dejó secar al aire y se resuspendió en acetato de sodio 0.1 M pH 4.5, descartando por centrifugación (9,000g) los restos insolubles (Covarrubias *et al.* 1995). Este extracto de proteínas básicas se fraccionó mediante precipitación con sulfato de amonio. Las fracciones enriquecidas en p33 y p36 se dializaron contra acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 y se separaron en una columna Superdex 200 mediante cromatografía líquida de baja presión (FPLC), usando como eluyente acetato de sodio pH 4.5 0.1 M, NaCl 0.5 M, β-mercaptoetanol 10 mM. Las fracciones que contenían a p33/p36 se dializaron contra acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 y se concentraron por filtración en Microcon 10. En geles de poli-acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS) se cuantificó la concentración de p33/p36 en cada fracción y se verificó su grado de pureza (García-Gómez *et al.* 2000).

4.4. Obtención de membranas

Hojas de plantas de frijol de 30 días se licuaron en buffer de extracción frío (Tris base 110 mM, glicerol 10 %, manitol 400 mM, albúmina sérica bovina 0.5 % p/v, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM). El licuado se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 25,000 g durante 20 minutos, para retirar restos

celulares y de tejido. El sobrenadante se ultracentrifugó a 200,000 g durante una hora para empaquetar las membranas. La pastilla se resuspendió a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína total en buffer de resuspensión (BR: Tris-Mes 6 mM pH 8.0, glicerol 10 %, manitol 250 mM, DTT 2 mM). Todos los procedimientos con membranas, se llevaron a cabo sobre hielo ó a 4 °C, los buffers se suplementaron al momento de usarlos con PMSF 1m y se usaron enfiados.

Los microsomas membranales fueron almacenados a -70 °C y usados antes de 5 semanas.

4.5. Fraccionamiento de membranas

El extracto de membranas totales se diluyó en BR suplementado con PMSF 1mM (1 mg/ml de proteína total) y se separó en un gradiente discontinuo de sacarosa al 16 %, 32 % y 36 % (p/v) preparado en BR. Para esto, el extracto de membranas se ultracentrifugó en el gradiente, durante 2 h a 70,000 g, 4 °C, y cada interfaces se recuperó con pipeta pasteur. En la primera interface (sobre la fase del 16 %) se recuperaron membranas de tonoplasto, en la segunda y la tercera interfaces se recuperaron fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas. Cada fase recuperada se diluyó 4 veces en BR para lavar la sacarosa y se ultracentrifugó durante una hora a 200,000 g, 4 °C, para empaquetar los microsomas. Las pastillas se resuspendieron en BR a una concentración de proteína total de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (García-Gómez *et al.* 2000).

La integridad de las proteínas de membrana se verificó en gel de poli-acrilamida-SDS, el fraccionamiento y enriquecimiento de las membranas plasmáticas se verificó mediante experimentos tipo 'western' usando anticuerpos anti-H⁺ATPasa de membrana plasmática y anti-F-MIP.

4.6. Solubilización de membranas.

Microsomas de membranas plasmáticas (2 mg/ml de proteína total) se incubaron en BR con el detergente a ensayar (Tabla 1) durante una hora, bajo agitación suave. La fracción insoluble se separó por ultracentrifugación a 200,000 g durante una hora a 4

°C. Los solubilizados se usaron inmediatamente sin almacenarlos (Nennstiel *et al.* 1998).

Tabla 1 Detergentes ensayados para solubilizar membranas celulares de hoja de frijol

Detergente	Concentración micelar crítica (CMC)
Tween-20 (Tw)	0.21 %
Tritón-X100 (Tr)	0.49 %
octilglúcosido (Og)	0.01 %
deoxicolato de sodio (Doc)	0.00 2%
Chaps (Ch)	0.02 %
Zwittergent 13-14 (Z)	0.73 %

4.7. Extracción de proteínas asociadas a membrana.

Los microsomas de membranas (2 mg/ml de proteína total) se incubaron en BR con NaCl (0.7 % y 1.5 %) ó con CaCO₃ (1 mM y 100 mM) durante una hora a 4 °C, bajo agitación suave. La suspensión se ultracentrifugó a 200,000 g para separar las membranas de la proteína soluble extraída al sobrenadante (Howell & Palade 1982).

4.8. Acoplamiento de p33/p36 a una matriz de afinidad

La sefarosa activada con bromuro de cianógeno se hidrató en HCl 10 mM durante 15 minutos y se lavó con buffer de acoplamiento (BA: fosfato de sodio 100 mM pH 6.5 y NaCl 500 mM).

Las proteínas p33/p36, purificadas y dializadas contra BA, se incubaron con la sefarosa (2 µg de proteína/µl Sefarosa) durante 12 h, en agitación suave a 4 °C. Después de la incubación, la resina se lavó con BA para eliminar el exceso de proteína no acoplada, y se bloquearon los grupos reactivos que hubieran quedado disponibles usando Tris-HCl 100 mM pH 8.0. A continuación, la resina se lavó alternadamente con acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y con Tris HCl 100 mM pH 8.0, para retirar

cualquier resto de proteína que no estuviera unida a la resina covalentemente (Pharmacia 1999).

La sefarosa acoplada se almacenó a 4 °C en solución de acetato de sodio 100 mM pH 4.5 suplementada con azida de sodio 0.02 %.

El acoplamiento de p33/p36 a la resina, se verificó cuantificando la cantidad de proteína antes y después de la incubación con la sefarosa (incluidos los lavados), mediante lecturas de absorbancia a 280 nm.

Adicionalmente, una alícuota de 10 µl de la resina acoplada a p33/p36 (sefarosa-p33/p36) se incubó con 11 µg de suero anti-p33 durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, la alícuota de sefarosa-p33/p36 se lavó exhaustivamente para retirar el anticuerpo que no se hubiese unido a las proteínas acopladas en la resina. Los anticuerpos unidos a la sefarosa-p33/p36 se desprendieron mediante un lavado con acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y un lavado con Tris HCl 100 mM pH 8.0. Finalmente eluidos y lavados se detectaron en ensayos tipo 'dot blot' con anticuerpo secundario anti-conejo (Harlow & Lane 1988).

Como control, se acopló y probó albúmina sérica bovina a Sefarosa-4B en las mismas condiciones descritas.

4.9. Unión de solubilizados de membrana a la sefarosa-p33/p36

Los solubilizados de membranas se dializaron exhaustivamente contra BR suplementado con PMSF 1 mM, para retirar el exceso de detergente. Se incubaron con la sefarosa-p33/p36 (previamente equilibrada en BR), durante 12 h en agitación. Al cabo de la incubación, la resina se decantó y se retiró el sobrenadante, se lavó con 10 volúmenes de BR y con 10 volúmenes de Tris-Mes 15 mM pH 8.0. Los buffers de incubaciones y lavados se suplementaron con PMSF 1 mM final y se usaron fríos, todo el procedimiento se ejecutó a 4 °C o sobre hielo.

La proteína unida a la sefarosa-p33/p36 se eluyó con Tris-Mes 15 mM pH 8.0, NaCl 1 M. Los eluidos se concentraron mediante

precipitación con acetona y se analizaron en geles de poli-acrilamida-SDS (Nennstiel *et al.* 1998).

4.10. Ensayo de unión entre proteínas, sobre membrana de nitrocelulosa

Los microsomas de membrana plasmática (40 μ g) se separaron en gel de poli-acrilamida-SDS. El gel se incubó por dos h en un buffer de renaturalización (Tris-HCl 10 mM pH 7.0, urea 4 M, EDTA 20 mM, DTT 0.01 mM), con el objetivo de lavar el exceso de SDS y propiciar la renaturalización de las proteínas. Después del tratamiento de renaturalización, las proteínas se electro-transferieron a membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó por 2 h a 42 °C, en buffer de unión (BU: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, CaCl 1 mM), adicionado con 3 % de leche. La membrana bloqueada se incubó con p33/p36 biotiniladas (300 ng/ml) en BU-leche por 4 h. Se lavó con 50 ml de BU-leche y BU por 20 minutos, tres repeticiones de cada lavado. Después de los lavados la membrana se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa, 1:5000 en BU por 2 h. A continuación se hicieron dos lavados de 20 minutos con BU-leche y otros dos con BU se reveló con sustrato para quimioluminiscencia ECL plus (García-Gómez *et al.* 2000).

4.11. Biotinilación de p33/p36

Fraciones enriquecidas ó purificadas de p33/p36, previamente dializadas contra buffer PBS pH 6.5, se incubaron con biotina en proporción 1:10 p/p, durante 4 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Después de la reacción, las proteínas se dializaron exhaustivamente contra acetato de sodio 0.1 M pH 4.5, para eliminar la biotina libre. Las proteínas biotiniladas se almacenaron a 4 °C por 4 semanas.

4.12. Entrecruzamiento de proteínas usando Tris(2,2' bipyridil)diclororutenio (II)

La proteína purificada (LDH o p33/p36) se diluyó (\pm 1 μ g/ μ l) en buffer de entrecruzamiento (BE: NaCl 150 mM en fosfato de sodio

15 mM pH 7.5 en el caso de LDH y pH 6.5 en el caso de p33/p36,) y se le añadió Tris(2,2'bipiridil)diclororutenio (II) (tdClRu) en cantidad suficiente para alcanzar la concentración final 1.25 mM, a partir de entonces las muestras se manejaron en penumbra. Se les añadió persulfato de amonio 2.5 mM final, para LDH y 0.025 mM final, para p33/p36. Inmediatamente después, la muestra se expuso a luz blanca, filtrada a través de 2.5 cm de agua, durante tiempos entre 5 y 60 segundos.

Después de iluminar las reacciones se diluyeron añadiendo un volumen de buffer de Laemmly 2X suplementado con el doble de SDS y el doble de β -mercaptoetanol (Tris 62.5 mM pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0,02 %). Cada reacción se incubó a 95 °C por 5 minutos y se analizó en gel de poli-acrilamida-SDS al 8 % (Fancy & Kodadek 1999).

4.13. Entrecruzamiento de proteínas usado glutaraldehido

Se procedió como en el inciso anterior reemplazando el tdClRu y el persulfato de amonio por glutaraldehido calidad microscopía electrónica, entre 5 y 20 mM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante tiempos entre 5 y 60 minutos.

4.14. Electroforesis de proteínas

Se realizaron electroforesis discontinuas en geles de poli-acrilamida-SDS de acuerdo con el método de Laemmly (Hoefer 1993).

4.14.1. Isoelectroenfoco de proteínas de membrana (IEF).

Los extractos de membranas totales se resuspendieron en Nonidet 40 (NP40) 2 % y se hirvieron durante tres minutos, luego se adicionaron el resto de los componentes del buffer de muestra para IEF (urea 8M, β -mercaptoetanol 5 %, anfolinas 3-10 1 % y anfolinas 4-6.5 3 %) (Hurkman & Tanaka 1986). Las muestras se separaron a equilibrio en gel de iso-electro-enfoque, preparado

con el mismo espectro de anfolinas, seguido de una segunda dimensión en gel de poli-acrilamida-SDS.

4.15. Cuantificación de proteínas

La proteína total de los extractos membranales se cuantificó usando el método de Bradford, y el método de Lowry en los casos en que la muestra incluía detergente. La concentración de los extractos de p33/p36 se estimó visualmente en geles de poli-acrilamida-SDS y mediante absorbancia a 280 nm. En todos los casos se usaron como estándar soluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina.

5. Resultados

5.1. Extracción y purificación de p33/p36

Dado que el objetivo central de este trabajo requería de una fracción pura de p33/p36, la primera fase del mismo consistió en optimizar el método de purificación de estas proteínas.

De acuerdo con lo reportado por Covarrubias y colaboradores, la extracción de las proteínas p33/p36 se llevó a cabo a partir de plántulas etioladas de frijol de tres días, que se sometieron a condiciones de déficit hídrico moderado (Covarrubias *et al.* 1995).

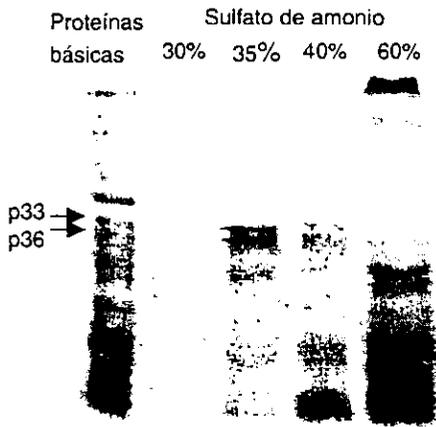
Durante el desarrollo del este trabajo se encontró que se obtenía mejor rendimiento cuando las plántulas que se sometían al déficit hídrico, medían alrededor de 3 cm de longitud, independientemente de el tiempo de germinación. Plántulas en estas condiciones soportaron la condición estresante por cuatro días, lo que repercutió en una mayor acumulación de las proteínas p33/p36, y permitió duplicar el rendimiento durante el proceso de su extracción.

Como se indica en la sección de Materiales y métodos, para la extracción de p33/p36 el tejido molido se incubó en buffer ácido y el extracto resultante se fraccionó mediante precipitaciones parciales con sulfato de amonio. El 80 % de p33/p36 precipitan en la fracción del 35 % de sulfato de amonio, junto con varios contaminantes menos abundantes (Figura 1). Las fracciones enriquecidas en p33/p36 se dializaron contra acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y se conservaron a 4 °C.

Con el objetivo de eliminar los contaminantes que co-precipitaron con p33/p36 en la fracción del 35 % de sulfato de amonio, se ensayaron procedimientos adicionales. Entre ellos una cromatografía de intercambio catiónico y cromatografías de exclusión molecular en el rango de 2.5 a 40 kDa, y en el rango de 10 a 600 kDa. Se optó por la cromatografía de exclusión

molecular de amplio rango (10 a 600 kDa) ya que fue la única que separó adecuadamente a p33/p36 de sus contaminantes. Para esta cromatografía, un extracto enriquecido en las proteínas de interés se aplicó a una columna Superdex 200 y se separó mediante el sistema de cromatografía líquida de baja presión (FPLC), como eluyente se usó una solución que contenía NaCl 0.1 M, β -mercaptoetanol 10 mM y acetato de sodio pH 4.5.

Figura 1. Enriquecimiento de p33/p36 de extracto ácido, mediante precipitación con sulfato de amonio.



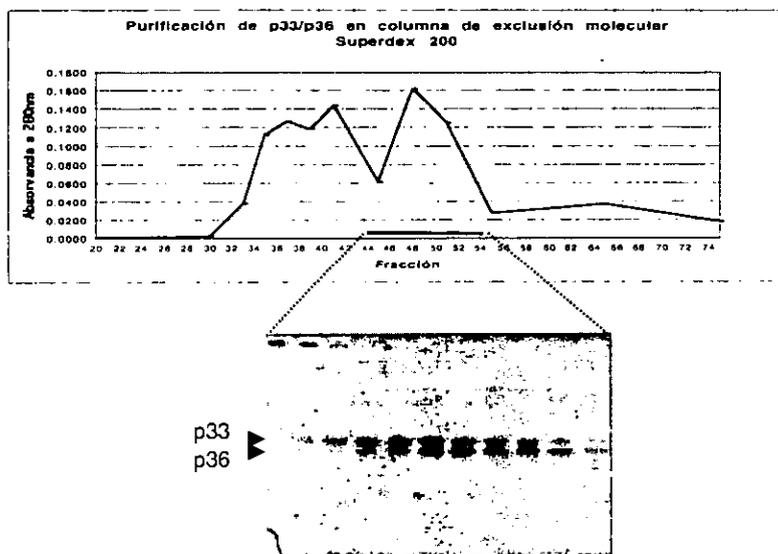
El extracto ácido de plántulas de frijol, sometidas a estrés hídrico, se precipitó con sulfato de amonio en las concentraciones que se muestran. Cada fracción se centrifugó y el precipitado se resuspendió en acetato de sodio 0.1 M pH 4.5. 10 μ l de cada fracción se analizaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 12%, mediante tinción con azul de Coomasie.

Como se muestra en la Figura 2, esta cromatografía permitió separar a p33/p36 de sus contaminantes, pero no fue posible separarlas una de otra. Por otro lado, en concordancia con resultados previos (Hernández *et al*, resultados no publicados), se observó que estas proteínas eluyeron con un peso molecular

aparente alto, ya que la proteína contaminante que eluye en el pico inmediatamente anterior, apenas entra en el gel de poli-acrilamida-SDS al 12%.

En la Tabla 2 se muestran los promedios de los resultados de las extracciones realizadas en condiciones óptimas. Para éstas, las plántulas de frijol se sometieron a estrés durante cuatro días, el tejido se extrajo en buffer ácido durante 48 h, seguido de fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200.

Figura 2. Purificación de p33/p36 por cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200.



El extracto enriquecido en p33/p36 (3.9 mg de proteína), se separó en una columna Superdex 200, usando como eluyente: acetato de sodio 0.1 M pH 4.5, NaCl 0.1 M, β -mercaptoetanol 10 mM. El contenido de proteína en cada fracción se estableció mediante absorbancia a 280 nm. En el gel (poliacrilamida-SDS al 12% teñido con azul de Coomassie) se presentan las fracciones correspondientes al pico que contiene a p33/p36.

Con este procedimiento se logra un rendimiento de 2.2 μg de p33/p36 purificadas, por gramo de tejido estresado de frijol.

Tabla 2. Rendimiento y enriquecimiento p33/36.

	Rendimiento μg de proteína total por g de tejido estresado		p33/p36 en la fracción
Extracto ácido	43.9	+/- 9.1 (3)	8.3%
Sulfato de amonio	3.8	+/- 1.1 (3)	60%
Superdex 200	2.2	+/- 0.1 (2)	100%

Se presentan los resultados de las extracciones óptimas de p33/p36. Las concentraciones de proteína se estimaron visualmente en gel de poli-acrilamida-SDS. Se muestran promedios, desviaciones estándar (número de repeticiones).

5.2. Obtención de una fracción enriquecida en proteínas de membrana plasmática

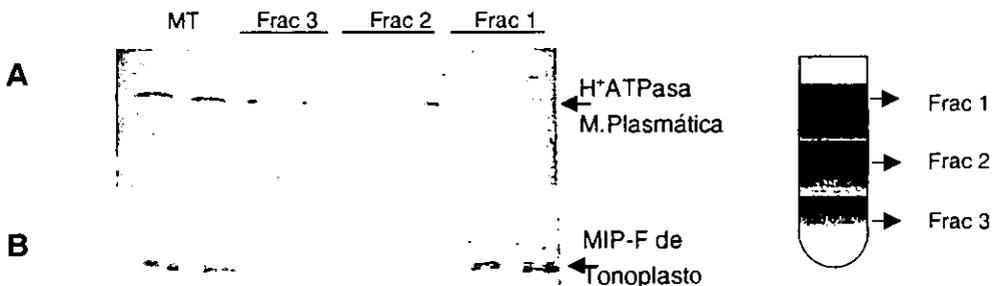
El siguiente paso en el cumplimiento del objetivo central de este trabajo requería de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana plasmática. Como se describe en la sección de Materiales y métodos, se obtuvieron extractos de microsomas membranales totales separando la fracción insoluble de un homogeneizado de hojas de frijol. Con el objeto de obtener un extracto enriquecido en proteínas de membrana plasmática, el extracto de microsomas membranales totales se fraccionó en un gradiente discontinuo de sacarosa.

Del gradiente se recuperaron tres fracciones correspondientes a cada interfase (ver Materiales y métodos). En la primera interfase (sobre la fase de 16 % de sacarosa) se recuperaron membranas de tonoplasto, y en la segunda y la tercera interfases (sobre las fases de 32 y 36 % respectivamente) se recuperaron fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas (García-Gómez *et al.* 2000). Para confirmar lo anterior, se hicieron ensayos tipo 'western' usando anticuerpos contra un proteína de membrana

plasmática como la H⁺ATPasa y contra una proteína de tonoplasto como la acuaporina MIP-F.

Como se muestra en la Figura 3, el anticuerpo anti-H⁺ATPasa de membrana, detectó en los carriles correspondientes a las fracciones 2 y 3, una banda que corresponde con el peso molecular esperado para la H⁺ATPasa de membrana plasmática de frijol, que es 90 kDa (Campos *et al.* 1996). Por otro lado, anticuerpos anti-MIP-F reconocieron una banda de aproximadamente 36 kDa en los carriles de la fracción 1, la cual se encuentra dentro del rango de peso molecular esperado para la acuaporinas de tonoplasto (Johansson *et al.* 2000). Lo anterior indica que hay fraccionamiento de las membranas totales en el gradiente de sacarosa, que separa las membranas del tonoplasto en la fracción 1, de las membranas plasmáticas en las fracciones 2 y 3.

Figura 3. Fraccionamiento de membranas totales en gradiente discontinuo de sacarosa.



El extracto de membranas totales se separó en un gradiente de sacarosa 16 %, 32 % y 36 % en BR. Los microsomas membranales recuperados en cada fracción, se analizaron en ensayo tipo 'western' usando anticuerpos contra H⁺ATPasa de membrana plasmática (panel A) y contra MIP-F (panel B). Frac. 1, Frac. 2 y Frac. 3 corresponden a las fracciones recuperadas sobre las fases de 16, 32 y 36 % de sacarosa, respectivamente. Se sembraron 30 µg de proteína de membranas totales (MT), 15 µg de proteína de Frac. 1, Frac 2 y Frac 3.

Con este procedimiento de extracción y enriquecimiento de las membranas plasmáticas es posible obtener un rendimiento de 103 µg de proteína total de membrana plasmática por gramo de hoja (Tabla 3).

Tabla 3 Rendimiento de la extracción de membranas plasmáticas

	µg de proteína total por g de tejido	Fracción de las membranas totales
Membranas totales	435.0 +/- 181.5	100%
Fracción 2	55.6 +/- 8.5	11 %
Fracción 3	47.3 +/- 8.2	10 %
Total	102.9	21 %

Se presentan los promedios y desviaciones estándar de tres extracciones de membranas plasmáticas. El contenido de proteína total de los extractos, se cuantificó mediante el método de Bradford

5.2.1. Solubilización de membranas con detergentes.

De acuerdo con el modelo de Mosaico Fluido, las proteínas integrales de la membrana son aquellas que contienen segmentos hidrofóbicos que se encuentran disueltos en la bicapa de lípidos. La purificación y caracterización de este tipo de proteínas requiere ponerlas en solución, para lo cual es necesario usar reactivos que disgreguen los lípidos de la membrana (Darnel *et al.* 1988). Cuando se solubilizan proteínas integrales de membrana con el objeto de identificarlas, purificarlas y/o hacer ensayos funcionales, generalmente se usan detergentes (Jones *et al.* 1990).

Los detergentes son moléculas anfipáticas que en solución acuosa forman estructuras capaces de aislar del agua, los segmentos hidrofóbicos de una molécula. Por esta propiedad, los

detergentes son útiles en la solubilización de proteínas de membrana, ya que pueden mantener a los segmentos hidrofóbicos de la proteína, aislados del medio acuoso, con lo cual protegen su estructura tridimensional (Jones *et al.* 1990).

Dado que, la solubilización de una proteína depende de las características de la misma y de las interacciones que establezca con el detergente usado; para establecer la eficiencia de diferentes detergentes en las condiciones específicas de este trabajo, se ensayaron diferentes tipos de detergentes comúnmente usados en la solubilización de proteínas de membrana de plantas (Mithöfer *et al.* 1996, Umemoto *et al.* 1997, Nennstiel *et al.* 1998, Tassoni *et al.* 1998). Para ello, los extractos enriquecidos en membranas plasmáticas se incubaron durante una hora con los diferentes detergentes, se ultracentrifugaron y finalmente, se analizaron sobrenadantes y precipitados en cuanto a contenido y composición de proteínas.

El contenido de proteína total de sobrenadantes y precipitados se analizó usando el método de cuantificación de Lowry. En la Tabla 4 se muestra que los diferentes detergentes, en diferentes concentraciones, solubilizan diferentes cantidades del contenido de proteína total de las membranas.

La composición de proteínas de los sobrenadantes y los precipitados producto de la solubilización, se analizó comparando los patrones obtenidos en geles de poli-acrilamida-SDS, teñidos con azul de Coomassie. De acuerdo con el análisis de los patrones de proteínas se encontró que, en general, los detergentes usados solubilizan en mayor o menor proporción el patrón general de las proteínas de la membrana.

En la Figura 4 se muestran los patrones de proteínas obtenidos después de solubilizar membranas plasmáticas con Tritón-X100 al 1 %, Zwittergent 13-14 al 0.01 %, octilglucósido al 1 % y deoxicolato de sodio al 1.5 %. Los demás detergentes y concentraciones ensayados mostraron un comportamiento similar (no se muestra el resultado).

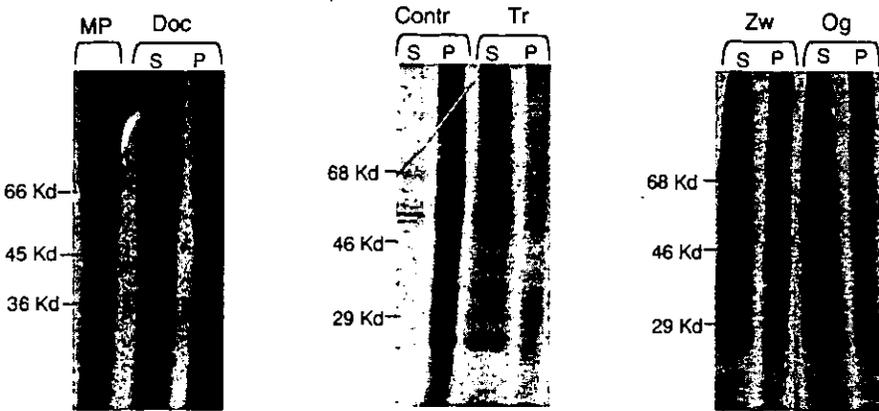
Los detergentes Tritón-X100 al 1 %, octilglucósido al 0.7 y 1 %, deoxicolato de sodio al 1.5 %, Chaps al 1.5 % y Zwittergent 13-14 al 0.01 %, solubilizan más del 65 % del contenido total de proteínas de membrana (Tabla 4). Sin embargo, el Tritón-X100 no es posible eliminarlo de una solución mediante diálisis e interfiere con la cuantificación, por lo que su uso se descartó, quedando como opciones octilglucósido, deoxicolato de sodio, Chaps y Zwittergent 13-14.

Tabla 4 Eficiencia de diferentes detergentes para solubilizar proteínas de membrana plasmática.

Detergente	Concentración micelar crítica	Concentración usada	Fracción de proteína total extraída
Control	-	-	19.2%
Tween 20	0.002%	1.50%	56.0%
Tritón x100	0.02%	0.02%	4.9%
		1.00%	88.6%
octilglucósido	0.73%	0.70%	79.0%
		1.00%	89.4%
deoxicolato de sodio	0.21%	1.50%	67.6%
Chaps	0.49%	1.50%	72.0%
Zwittergent 13-14	0.01%	0.01%	90.4%

100 µg de membranas plasmáticas se incubaron durante una hora en agitación con los detergentes indicados disueltos en BR y suplementados con PMSF 1 mM. La muestra se ultracentrifugó y se cuantificó el contenido de proteína total en sobrenadantes y precipitados. Para esto se usó el método de Lowry, y una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. La proteína extraída se expresa en porcentaje con respecto a la proteína total inicial.

Figura 4. Solubilización de proteínas de membrana plasmática con detergentes.



100 μ g de membranas plasmáticas se incubaron durante una hora con los detergentes indicados. Al cabo de lo cual se ultracentrifugó y sobrenadantes y precipitados se analizaron en gel de poli-acrilamida-SDS mediante tinción con azul de Coomasie. MP: Membranas plasmáticas sin tratar, Doc: deoxicolato de sodio al 1.5%, Contr: membranas tratadas con buffer sin detergente, Tr: Tritón-X100 al 1%, Zw: Zwittergent 13-14 al 0.01%, y Og: octilglucósido al 1%. S: sobrenadantes, P: precipitados. En cada carril se sembraron aproximadamente 15 μ g de proteína total, excepto en el carril correspondiente al sobrenadante del control que contiene menos proteína total.

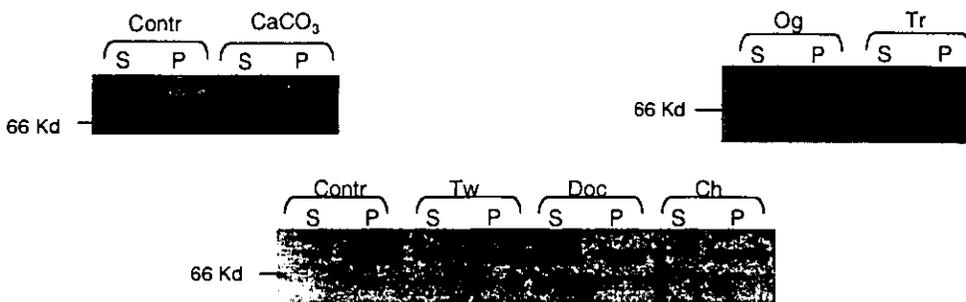
5.3. Detección de la unión a p33/p36 en proteínas de membrana solubilizadas o extraídas

Las proteínas que unen a p336/p36 no necesariamente deben ser integrales de la membrana, podrían encontrarse sólo asociadas a ella. Se consideran **proteínas asociadas**, aquellas que se encuentran unidas a la bicapa de lípidos por interacciones proteína-proteína o proteína-lípido (Jones *et al.* 1990). Para

establecer si la proteína de unión a p33/p36 pmp80 previamente descrita (García-Gómez *et al.* 2000), se encontraba asociada a la membrana, se usaron dos procedimientos de extracción, usados para separa de las membranas a las proteínas asociadas (Howell & Palade 1982). Para esto, las membranas plasmáticas se incubaron con NaCl 1.5 M y 0.7 M, y con CaCO₃ 0.1 M (ver Materiales y métodos), y se buscó detectar a pmp80 en los sobrenadantes mediante el uso de un ensayo de unión entre proteínas, sobre membrana de nitrocelulosa (ver Materiales y métodos). Mediante el mismo ensayo se busco a pmp80 en los solubilizados de membranas con los diferentes detergentes.

En la Figura 5 se muestra que la proteína de membrana plasmática pmp80 no se extrajo de la membrana por tratamientos con CaCO₃ 0.1 M, el mismo resultado se obtuvo con NaCl 1.5 M y 0.7 M (no se muestra el resultado), lo que indica que su interacción con la membrana no se limita a interacciones entre cargas. En la misma Figura 5, se muestra que la señal de unión a p33/p36 se solubilizó ampliamente con deoxicolato de sodio al 1.5 %, en menor medida con octilglucósido al 1.5 % y con Tritón-X100 al 2 %. Chaps al 1.5 % y Tween-20 al 1.5 % solubilizan a pmp80 en muy baja proporción.

Figura 5. Detección de la actividad de unión a p33/p36 en membranas solubilizadas y extraídas con CaCO₃.



Microsomas membranales (100 µg de proteína total) se incubaron con los reactivos indicados durante 1 hora, en agitación suave, a 4

°C. Al cabo de lo cual, se ultracentrifugó y cuantificó el contenido de proteína total en sobrenadantes y precipitados. sobrenadantes y precipitados (40 µg) se sembraron en gel de poli-acrilamida-SDS al 10 % y se sometieron a ensayo de unión entre proteínas sobre nitrocelulosa con p33/p36 purificadas y biotiniladas CaCO₃: CaCO₃ 0.1 M, Og: octilglucósido al 1.5 %, Tr: Tritón-X100 al 2 %, Tw: Tween 20 al 1.5 %, Doc: deoxicolato de sodio al 1.5 %, Ch: Chaps al 1.5 %, Contr: microsomas tratados sólo con buffer.

Por estos resultados, y dado que el deoxicolato de sodio solubiliza convenientemente todo el patrón de proteínas de membrana analizado con azul de Coomasie, se decidió usar este detergente en los ensayos subsiguientes.

5.4. Acoplamiento de p33/p36 a agarosa-CNBr para usarla como matriz de afinidad.

Las cromatografía de afinidad es una metodología que permite identificar y purificar el o los ligandos desconocidos de una proteína, con base precisamente en la relación específica de cada proteína con su (o sus) ligando(s). Una purificación exitosa por este método depende de que el ligando, en este caso p33/p36, esté correctamente acoplado a la matriz inerte que se usa como soporte, en este caso agarosa activada con bromuro de cianógeno (Sefarosa 4B).

p33/p36 tienen un pI básico (al rededor de 8.0) y tienden a precipitar a pH de neutros a básicos (resultados no mostrados). Dado que las condiciones óptimas de acoplamiento de proteínas a la Sefarosa 4B, se logran a pH 8.0 (Pharmacia 1999), fue necesario establecer modificaciones al protocolo de acoplamiento que permitieran acoplar p33/p36 a esta resina.

Se probó el acoplamiento de albúmina sérica bovina a la Sefarosa 4B en pH 6.5; ya que, por experimentos previos sabemos que p33/p36 permanecen solubles en este pH. Se encontró que usando buffer fosfato pH 6.5 se lograba un acoplamiento del 71 % de la albúmina a la resina, lo cual se puede considerar adecuado.

El acoplamiento de p33/p36 a Sefarosa 4B se llevó a cabo tal como se describe en la sección Materiales y métodos, prestando cuidado especial a bloquear los sitios reactivos no ocupados, y lavar alternando condiciones de pH ácidas con condiciones de pH básicas, para retirar cualquier componente unido iónicamente a la resina o a las proteínas acopladas.

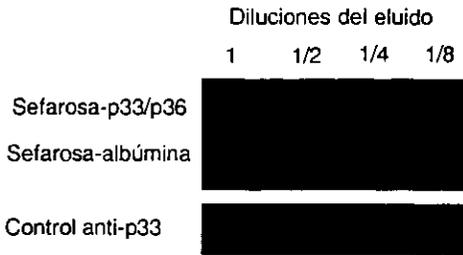
La eficiencia del acoplamiento se evaluó comparando la cantidad de proteína en la solución antes y después de la incubación con la sefarosa.

Se hicieron 4 acoplamientos de p33/p36 en Sefarosa 4B en los que se obtuvo una eficiencia de acoplamiento de 93%, 52%, 96%, y 84% respectivamente, al cabo de los cuales se obtuvieron matrices de afinidad de 0.93, 0.90, 2.1 y 2.4 mg de p33/p36 por mililitro de resina. Las cuatro se usaron en experimentos tendientes a establecer las condiciones del ensayo de unión con proteínas de membrana plasmática solubilizadas.

Como control de especificidad, en cada caso se preparó resina acoplada a albúmina sérica bovina (sefarosa-albúmina) en las mismas condiciones.

La unión de p33/p36 a la resina se verificó usando anticuerpo anti-p33, el cual se detectó con anticuerpo secundario anti-conejo mediante ensayos tipo 'dot blot'. En la Figura 6 se muestra que el anticuerpo anti-p33 une a la sefarosa-p33/p36 y no a la sefarosa-albúmina, lo que indica que, efectivamente, el par de proteínas de interés están acopladas en la sefarosa-p33/p36.

Figura 6. Verificación de la unión de p33/p36 a Sefarosa 4B.



10 μ l de sefarosa-p33/p36 y sefarosa-albúmina se incubaron con 2.5 μ l de anticuerpo anti-p33 (11 μ g de IgGs purificadas), se lavó con Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 0.5 M, y se eluyó con acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y Tris HCl 100 mM pH 8.0. El anticuerpo que eluyó se analizó en ensayo tipo 'dot blot' con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa, y se reveló por quimioluminiscencia. El control consiste en gotear diluciones del anticuerpo anti-p33.

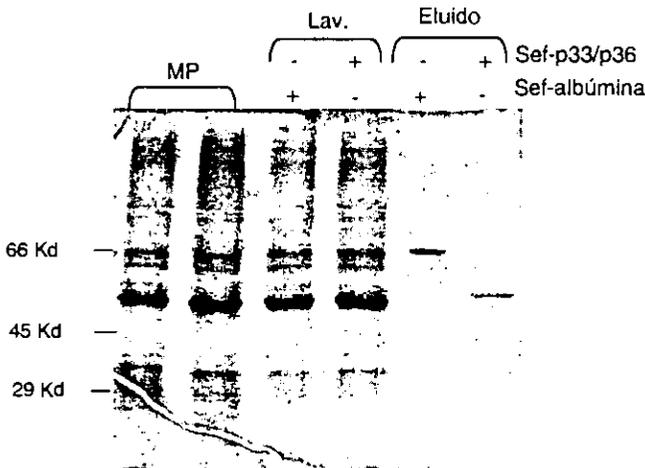
5.5. Identificación por afinidad de las proteínas que interactúan con p33/p36.

Para identificar la(s) proteína(s) de membrana plasmática que unen a p33/p36, se procedió como se indica en la sección de Materiales y métodos; 600 μ l de la sefarosa-p33/p36 se equilibraron con buffer de resuspensión (BR), 4 ml de solución de membranas plasmáticas, que contenía 4.8 mg de proteínas solubilizadas con deoxicolato de sodio 1.5 % y dializadas, se incubaron con la sefarosa-p33/p36 durante 16 h a 4 °C en presencia de PMSF 1mM. Se decantó la resina y se retiró el sobrenadante, se hicieron lavados sucesivos con 6 ml de BR, BR EDTA y Tris-Mes pH 8.0. Las proteínas unidas a la matriz de afinidad sefarosa-p33/p36 se eluyeron con NaCl 1 M en buffer Tris-Mes pH 8.0, suplementado con PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas. Los eluidos de la sefarosa-p33/p36 y sefarosa-

albúmina se analizaron en geles de poli-acrilamida-SDS al 10 %, por tinción de proteínas con azul de Coomasie, y mediante un ensayo de unión a p33/p36 sobre nitrocelulosa.

En la Figura 7 se muestra que, en eluidos de sefarosa-p33/p36 y sefarosa-albúmina es posible detectar proteínas diferentes, lo que significa que la sefarosa-p33/p36 fracciona el patrón de proteínas de la membrana de manera específica.

Figura 7. Unión de proteínas de membrana plasmática a sefarosa-p33/p36.



Membranas plasmáticas solubilizadas con deoxicolato de sodio 1.5 % (0.9 mg), dializados contra BR PMSF 1 mM, se incubaron durante 16 h con sefarosa-p33/p36 y sefarosa-albúmina a 4 °C. Después de decantar la resina, se lavó con BR, Tris-Mes pH 8.0, y se eluyó con NaCl 1 M en Tris-Mes pH 8.0. Todas las soluciones se suplementaron con PMSF 1 mM. Los eluidos de sefarosa-p33/p36 y de sefarosa-albúmina se precipitaron con acetona, se analizaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 10 % mediante tinción con azul de Coomasie. En los carriles MP se sembraron 15 µg de las membranas plasmáticas solubilizadas, y en los carriles Lav. se sembraron 15 µg del primer lavado.

Durante el curso de los experimentos de unión entre proteínas de membrana solubilizadas y la sefarosa-p33/p36, se encontró que el deoxicolato de sodio forma un gel cuando se incubaba a 4°C. Este efecto resultó un serio inconveniente, ya dificultó extremadamente los lavados de la resina de afinidad, e hizo imposible su reutilización, haciendo que los resultados obtenidos no fueran concluyentes.

A pesar de lo anterior, se intentó detectar a pmp80 en los eluidos de la sefarosa-p33/p36, usando el ensayo de unión entre proteína sobre nitrocelulosa (ver Materiales y métodos). En este tipo de ensayos se detecta la unión entre p33/p36 marcadas con biotina, y proteínas que han sido separadas en gel de poli-acrilamida-SDS, renaturalizadas mediante un tratamiento con urea 8 M, y transferidas a nitrocelulosa (García-Gómez *et al.* 2000 ver Materiales y métodos).

Durante el desarrollo de este trabajo se detectó una proteína biotinilada en el extracto de membranas, que migra en el rango de peso molecular de pmp80 (Figura 8 A). Ya que esta proteína biotinilada no se había detectado antes, se hicieron experimentos para establecer si la esta biotinilación ocurría durante el procedimiento de extracción o durante el ensayo de unión.

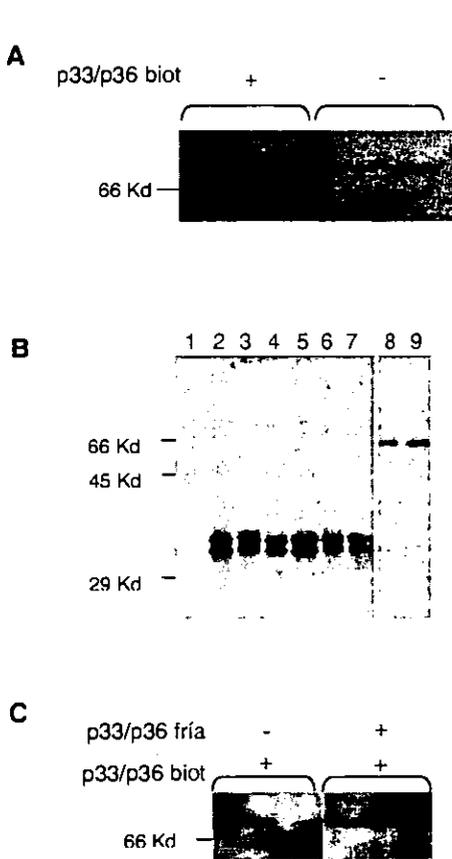
Para descartar que hubiese biotina libre en los buffers y extractos de proteína biotinilada, estos se incubaron con albúmina como testigo. Se encontró que los buffers usados durante la extracción no contenían biotina libre que pudiera marcar a la proteína testigo (no se muestra el resultado). De la misma forma los extractos de proteínas biotiniladas no fueron capaces de marcar a la albúmina, indicando que no hay biotina libre en ellos. Como control de este experimento se usaron: la albúmina que se uso en el experimento para verificar que no está marcada de antes, y un extracto de p33/p36 biotiniladas sin dializar, el cual marca eficientemente a la proteína testigo (Figura 8 B).

Finalmente, se hicieron experimentos para intentar competir la unión entre p33/p36 y pmp80, en el ensayo de unión sobre nitrocelulosa, con p33/p36 sin marcar. Se encontró que p33/p36 sin marcar en proporción 2:1 y 10:1 con respecto a p33/p36

marcadas, no compitieron la señal proveniente de este tipo de ensayos (Figura 8 C).

Estos resultados complicaron la identificación de la actividad de unión a p33/p36 mediante este tipo de ensayo, por lo que se decidió no continuar usándolo.

Figura 8. Detección de la interacción entre p33/p36 y proteínas de membrana.



A) 40 µg de proteínas de membrana plasmática se separaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 10 % y se electro-transferieron a nitrocelulosa. La membrana bloqueada, se incubó con 300 ng/ml de p33/p36 biotiniliadas o con buffer. Se detectó con estreptavidina acoplada a peroxidasa mediante quimioluminiscencia.

B) 1 µg de albúmina sérica bovina se incubó durante 5 h, con 1 µg de p33/p36 biotiniladas. La albúmina, p33 y p36 se separaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 10 %, se transfirieron a nitrocelulosa y se detectaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa mediante quimioluminiscencia. En el carril 1: 1 µg de la albúmina usada en el experimento. Carriles 2 al 4: p33/p36 biotiniladas y dializadas incubadas con

albúmina. Carriles 5 al 7: p33/p36 biotiniladas y dializadas incubadas con albúmina (lote de p33/p36 independiente del anterior). Carriles 8 y 9: 0.1 µg de albúmina incubada con 50 ng de p33/p36 biotiniladas sin dializar.

C) 40 μg de proteínas de membrana totales se separaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 10 % y se transfirieron a nitrocelulosa. La nitrocelulosa, bloqueada, se incubó con 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de p33/p36 fría o con el buffer sin proteína. Luego se incubó 300 ng/ml p33/p36 biotiniladas, y se detectó con estreptavidina acoplada a peroxidasa mediante quimioluminiscencia.

5.6. Entrecruzamiento de p33/p36 con proteínas de la membrana plasmática.

Ante las dificultades con el ensayo de unión entre proteínas sobre nitrocelulosa, se decidió explorar otras alternativas para detectar la unión entre p33/p36 y su (o sus) ligando(s).

El entrecruzamiento de proteínas es una técnica usada para identificar interacciones entre proteínas, por lo que existen en el mercado varios reactivos formadores de entrecruzamiento de diferentes características (Husic *et al.* 1991, Nurnberger *et al.* 1995, Fancy & Kodadek 1999, Giranton *et al.* 2000).

En la mira de estabilizar covalentemente el complejo que forma p33/p36 con su (o sus) proteína(s) de unión en membrana, se probaron dos reactivos formadores de entrecruzamiento: glutaraldehido y Tris(2,2'bipiridil) diclororutenio (II) (tdClRu). El glutaraldehido por su disponibilidad y la simplicidad de su uso; y el (tdClRu), porque es un entrecruzador de proteína rápido y eficiente, es fotoinducible con luz blanca y de uso relativamente simple (Fancy & Kodadek 1999). Para establecer las condiciones y los tiempos de reacción adecuados para el uso de cada uno de los entrecruzadores, se usó la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que forma dímeros de 70 kDa y tetrámeros de 140 kDa.

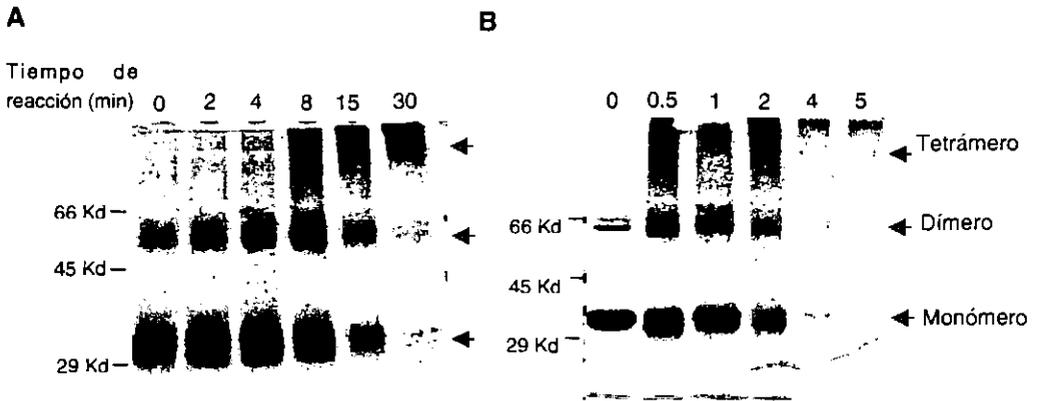
LDH (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) en buffer de entrecruzamiento (BE), se incubó a temperatura ambiente con glutaraldehido 5, 10 y 20 mM, y se encontró que 5 mM es suficiente para promover el entrecruzamiento de los monómeros de la enzima, estabilizando los dímeros y tetrámeros (no se muestra el experimento).

Para el entrecruzamiento con tdClRu, a LDH en buffer de entrecruzamiento, se le agregó la sal de rutenio 1.25 mM final y persulfato de amonio 2.5 mM final. Inmediatamente después, las muestras se expusieron a luz blanca por periodos de tiempo entre 5 y 60 segundos. Tanto las reacciones con glutaraldehido como las reacciones con tdClRu se detuvieron por dilución en buffer de Laemmly modificado con 10 % β -mercaptoetanol y 4 % SDS. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 minutos y se analizaron en geles de poli-acrilamida-SDS.

En la Figura 9 se muestra que en las condiciones mencionadas, tanto glutaraldehido como tdClRu promovieron la formación de agregados entre los monómeros de LDH, dichos agregados son estables en 10 % β -mercaptoetanol y 4 % SDS, y corresponden al peso molecular del dímero y del tetrámero de la enzima. Una pequeña cantidad del dímero es estable aún sin entrecruzamiento (tiempo 0 en la Figura 9), lo que también se observa cuando no se adiciona ningún entrecruzador (no se muestra el resultado). Sin embargo está claro que, de manera dependiente del tiempo de reacción, aumenta la proporción de dímero y del tetrámero, mientras desaparece el monómero. También de forma dependiente del tiempo de reacción, se forman agregados de alto peso molecular que se retienen en la entrada del gel y que resultan por que el exceso de entrecruzamiento promueve la formación de agregados inespecíficos (Fancy & Kodadek 1999).

El glutaraldehido promovió eficientemente el entrecruzamiento de LDH en concentración 5 mM y con tiempos de reacción entre 4 y 8 minutos. El tdClRu promovió eficientemente el entrecruzamiento entre los monómeros de LDH usado en una concentración de 1.25 mM, con persulfato de amonio 2.5 mM y con tiempo de exposición a la luz entre un minuto y dos minutos. Se decidió continuar usando tdClRu que reacciona mas rápido, es foto-activable, con lo que se logra mayor control sobre la reacción, y no produce distorsión de las bandas en gel como lo hace el glutaraldehido (Figura 9) .

Figura 9. Entrecruzamiento de lactato deshidrogenasa con glutaraldehído y Tris(2,2'bipiridil) diclororutenio (II).



A 10 μ g de LDH en buffer fosfato 15 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, (A) se le añadió glutaraldehído 5 mM final. (B) Se le añadió tdClRu 1.25 mM final, persulfato de amonio 2.5 mM final y se expuso a luz blanca durante los tiempos que se indican. Ambas reacciones se detuvieron con buffer de Laemmly 2X, se incubaron a 95 °C por cinco minutos y se analizaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 8 % por tinción de Coomassie.

El paso siguiente para establecer las condiciones adecuadas para el entrecruzamiento de p33/p36 con su (o sus) ligando(s) en membrana, fue establecer si p33 y p36 se agregan entre ellas, lo que permitiría predecir el rango de peso molecular esperado para el complejo de p33 y/o p36 con su (o sus) ligando(s) de membrana.

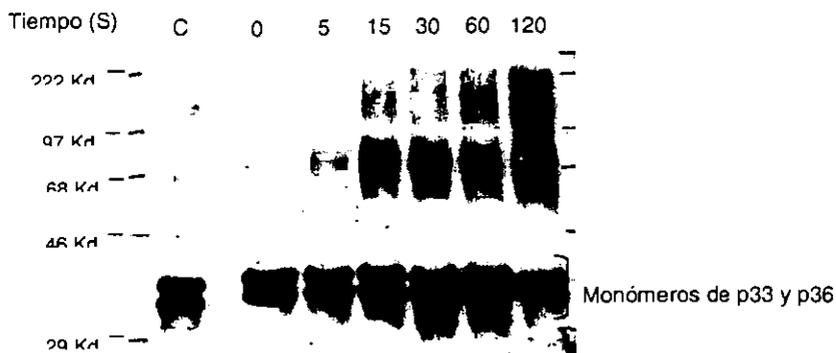
Partiendo de las condiciones óptimas para entrecruzar los monómeros de LDH con tdClRu, se realizaron experimentos para determinar las concentraciones de tdClRu y persulfato de amonio adecuadas para entrecruzar a p33/p36 (no se muestran los experimentos).

Se encontró que el entrecruzamiento entre p33/p36 mediante tdClRu, requiere concentraciones 100 veces menores de persulfato de amonio a las usadas para entrecruzar los monómero de LDH. Esto se explica considerando el mecanismo

propuesto para la reacción de entrecruzamiento promovida por tdCIRu. Fancy & Kodadek proponen que el tdCIRu actúa activando a las tirosinas para formar un intermediario, que en cercanía de un grupo nucleofílico NH o S se tautomeriza y le transfiere un electrón al persulfato de amonio, que actúa como aceptor de electrones de la reacción (Fancy & Kodadek 1999). Ya que los residuos tirosina y lisina son abundantes en p33/p36 (García-Gómez *et al.* 2000), el entrecruzamiento entre p33/p36 es eficiente en tiempos más cortos y con menores concentraciones de persulfato, de los requeridos para entrecruzar monómeros de LDH.

Como se muestra en la Figura 10, cuando p33/p36 se encuentran en una concentración de 1 µg/µl, el tdCIRu promueve la formación de agregados de p33/p36 con pesos moleculares que corresponden a los posibles homo y hetero-dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros.

Figura 10. Entrecruzamiento de p33/p36 con Tris(2,2'-bipiridil)diclororutenio



A 10 µg de p33/p36 en BE se le añadió tdCIRu 1.25 mM y persulfato de amonio 0.025 mM, y se expuso a luz blanca durante los tiempos indicados. Las reacciones se diluyeron con un volumen de buffer de Laemmli 2X y se incubaron a 95 °C por cinco minutos. Finalmente, se separaron en gel de poli-acrilamida-SDS al 8 % y se analizaron en un ensayo tipo 'western' con el anticuerpo anti-p33. En el carril C se sembraron 2 µg de p33/p36 purificadas

El mismo resultado se obtiene en experimentos en los que las proteínas se encuentran más diluidas (0.5 y 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ no se muestra el experimento), lo que indica que p33/p36 efectivamente se conforman en oligómeros, y que éstos no son producto de agregación inespecífica de las proteínas por efecto de la concentración.

6. Discusión.

En este trabajo se establecieron las condiciones necesarias para construir una matriz de afinidad con p33/p36, y se establecieron las condiciones para usarla en la identificación y purificación de la (o las) proteínas de la membrana plasmática que unen a p33/p36. Adicionalmente, se exploraron otras alternativas para detectar dicha unión.

La cromatografía de afinidad es una metodología utilizada cuando se trata de identificar y purificar el (o los) ligando(s) desconocidos de alguna proteína. De los receptores de membranas de plantas, sólo el receptor del elicitador Oligopéptido-13 de perejil y el del elicitador β -glucano de soya, se han identificado por métodos bioquímicos, y en los dos casos se utilizaron procedimientos que incluyeron cromatografía de afinidad (Shimomura *et al.* 1986, Mithöfer *et al.* 1996, Nennstiel *et al.* 1998).

Varios de los receptores de membrana de plantas se han identificado a través de la caracterización de mutantes insensibles al ligando específico. Es el caso de los receptores de hormonas como el etileno, las citoquininas y los brasinoesteroides (Rodríguez *et al.* 1999, Schumacher & Chory 2000, Inoue *et al.* 2001). Otros receptores se han identificado a través de la caracterización de mutantes con fenotipo específico, como en el caso de CLAVATA y HAESA, que son receptores de membrana involucrados en morfogénesis (Trotochaud *et al.* 1999, Jinn *et al.* 2000). Un regulador del transporte polar de auxinas se identificó mediante la técnica de 'gene targeting' (Gälweiler *et al.* 1998). La otra estrategia que se ha usado para la identificación de este tipo de proteínas es el rastreo de bancos de datos, a partir de la similitud con receptores conocidos en animales, así se han identificado varios receptores tipo receptor cinasa, como TMK1 y RPK1 (Hong *et al.* 1997).

Dado que en este trabajo no se partió de un efecto o fenotipo que permitiera seleccionar mutantes, y ya que no contábamos con información que orientara sobre el tipo de gen que codifica para

la proteína que se está buscando, se optó por el enfoque bioquímico y el consecuente uso de cromatografía de afinidad, para identificar la (o las) proteína(s) de membrana plasmática que interactúan con p33/p36.

Uno de los aspectos fundamentales para una cromatografía de afinidad es la disponibilidad de cantidades suficientes del ligando, en este caso las proteínas p33 y p36. En este trabajo se optimizaron las condiciones para el tratamiento de estrés hídrico sobre las plántulas de frijol, con lo cual se logró obtener 2.2 µg de p33/p36 por gramo de tejido (Tabla 2.). Este rendimiento corresponde, al doble del rendimiento obtenido en las condiciones que se usaban en el laboratorio para extraer y purificar este par de proteínas (no se muestran los resultados).

Se establecieron condiciones adecuadas para acoplar proteínas básicas, como lo son p33 y p36, a una matriz de agarosa activada con bromuro de cianógeno y se obtuvieron matrices de afinidad que contenían p33 y p36 acoplada a Sefarosa 4B (Figura 6).

Otros aspectos determinantes en la purificación por afinidad de una proteína de membrana, son la obtención de extractos membranales y la solubilización de sus proteínas. En este trabajo se obtuvieron fracciones enriquecidas en proteínas de membrana plasmática, con un rendimiento de 103 µg de proteína por gramo de tejido de hoja (Tabla 3). Ese rendimiento nos permitió usar cantidades, en torno a 5 mg de proteínas de membranas solubilizadas, en los experimentos de unión a la sefarosa-p33/p36. En esta cantidad de proteína esperábamos encontrar cantidades en el rango de detección de la tinción con plata, de la proteína de membrana plasmática que une a p33/p36 (pmp80). Lo anterior se consideró posible porque: pmp80 se detectó en 40 µg de membranas plasmáticas, mediante un ensayo de unión a p33/p36 biotiniladas (García-Gómez *et al.* 2000), y porque, en las condiciones de nuestro laboratorio, es posible detectar hasta 0.5 ng (7.2 femtomoles) de p33/p36 biotiniladas (no se muestra el experimento). Si se asume que la interacción entre p33/p36 y pmp80 ocurre en proporción 1:1, el que pmp80 se detecte en 40

μg significa que en esta cantidad de membranas plasmáticas hay 7.2 femtomoles de pmp80; lo que implica, que en 4.8 mg de proteínas de membrana solubilizadas (lo que se usó en el experimento descrito en la Figura 7) se encontrarían 69.1 ng de una proteína de 80 kDa.

En cuanto a la solubilización se encontró que, de los detergentes ensayados; octilglucósido, deoxicolato de sodio, Chaps y Zwittergent 13-14, solubilizan eficientemente las proteínas de membrana. En este trabajo se optó por deoxicolato de sodio porque solubilizó adecuadamente el patrón de proteína total de la membrana plasmática, y fue el detergente que solubilizó mayor proporción de la señal de unión a p33/p36 evaluada en ensayo de unión entre proteínas sobre nitrocelulosa (Figura 5).

Los extractos membranales solubilizados con deoxicolato de sodio se incubaron con la matriz de afinidad, se encontró que la sefarosa-p33/p36 retuvo una proteína de entre 45 y 66 kDa que no se retiene en la sefarosa-albúmina. Este resultado indica que hubo fraccionamiento de las proteínas de la membrana plasmática por efecto de la interacción con la sefarosa-p33/p36, diferencial con respecto a la sefarosa-albúmina (Figura 7). Sin embargo, el uso del deoxicolato de sodio resultó inconveniente porque los solubilizados de membranas con este detergente gelificaron a 4°C. Esta gelificación impidió concluir que lo eluido de las sefarosa-p33/p36 realmente sea una proteína de unión a p33/p36, ya que no se puede descartar, que se haya retenido en la resina por efecto del gel que formó el detergente, más que por interacción con p33/p36.

Con respecto a esta gelificación, se sabe que los detergentes derivados de sales biliares como el deoxicolato de sodio precipitan por efecto de cationes (Owen T *et al.* 1990), de otro lado, está establecido que la unión entre p33/p36 y pmp80 depende de cationes divalentes, aunque también sabemos que las trazas de estos cationes presentes en las soluciones, son suficientes para mantener dicha unión (García-Gómez *et al.* 2000). Considerando lo anterior, con el objeto de evitar la

gelificación se dializaron exhaustivamente los solubilizados de membranas para retirar el exceso de detergente, y se retiró el suplemento de Ca^{++} de la incubación de estos solubilizados con la sefarosa-p33/p36. A pesar de lo anterior, no fue posible evitar la gelificación del deoxicolato de sodio en la resina siempre que ésta se incubó a 4°C, lo que sugiere que las trazas de cationes presentes en las membranas y/o en los buffers son suficientes para que el deoxicolato forme quelatos y gelifique.

A pesar de que en este trabajo no se logró identificar la (o las) proteínas de unión a p33/p36, los inconvenientes que se presentaron durante el desarrollo del mismo, no permiten descartar la cromatografía de afinidad como estrategia para lograrlo.

En ese sentido, en futuros experimentos con el objeto de purificar cantidades detectables de las proteínas de unión a p33/p36, es recomendable incrementar las cantidades de la cromatografía de afinidad, tanto en el tamaño de la matriz, como en la cantidad de membranas solubilizadas que se usan. Lo anterior se propone en consideración a que las proteínas de membrana que interactúan con ligandos en la pared celular, como los receptores de membrana, son proteínas muy poco abundantes (Mithöfer *et al.* 1996, Nennstiel *et al.* 1998), y a que, hay experimentos que indican que la unión de p33/p36 a la membrana involucra varias proteínas (Battaglia 2001).

A partir de la experiencia de este trabajo, lo recomendable es incrementar la cromatografía de afinidad a 2 ml de sefarosa con 4 mg de p33/p36 purificadas. Aplicar en esta columna 100 mg de proteínas de membranas plasmáticas solubilizadas con octylglucósido. En esta cantidad de membranas se encontrarían 100 ng y 1.3 µg de proteínas poco abundantes como el receptor de membrana del elicitador Oligopéptido-13 de perejil o el receptor de membrana del elicitador β -glucano de soya, respectivamente (Mithöfer *et al.* 1996, Nennstiel *et al.* 1998).

Finalmente, y dado que la unión entre pmp80 y p33/p36 se compite con péptidos que incluyen la secuencia RGD (García-

Gómez *et al.* 2000), una alternativa que queda por explorar para purificar a pmp80, es usar una cromatografía de afinidad con péptidos que incluyan esta secuencia.

Como una estrategia adicional para la identificación y la caracterización de pmp80, se había planteado identificar la señal de unión de p33/p36 a proteínas de membrana plasmática separadas en gel de dos dimensiones, la cual es una alternativa usada para obtener pequeñas cantidades de una proteína pura con el objeto de someterla a un proceso de micro-secuencia (Satoin *et al.* 1998, Blackstock & Weir 1999). La identificación del punto correspondiente a la proteína de interés en la doble dimensión, dependía del ensayo de unión entre proteínas sobre nitrocelulosa. En este ensayo se detecta la unión entre proteínas de membrana transferidas a nitrocelulosa y p33/p36 marcadas con biotina (García-Gómez *et al.* 2000).

Estos ensayos tuvieron que descartarse como alternativa para detectar a las proteínas que unen a p33/p36, ya que durante el desarrollo de este trabajo se detectó una proteína biotinilada en el extracto de membranas, que migra en torno a los 80 kDa, el mismo rango en que migra la proteína pmp80.

Dado que durante este trabajo no fue posible competir la señal de los ensayos de unión entre proteínas con p33/p36, se descartó que la señal detectada en estos experimentos correspondiera a la proteína pmp80 (Figura 8). Ya que esta proteína biotinilada representó un interferencia importante para este tipo de ensayos, descartamos el uso del ensayo de unión sobre nitrocelulosa como estrategia para la identificación de la(s) proteína(s) de unión a p33/p36.

Ante las dificultades con el ensayo de unión entre proteínas sobre nitrocelulosa, se decidió explorar el entrecruzamiento de proteínas como alternativa para detectar la unión entre p33/p36 y su (o sus) ligando(s).

En la mira de entrecruzar a p33/p36 con su (o sus) proteína(s) de unión en membrana, se establecieron las condiciones para el entrecruzamiento de proteínas usando glutaraldehído y Tris(2,2'-bipiridil)-diclororutenio(II) (tdClRu). Se encontró que ambos reactivos, en las condiciones usadas, promueven el

entrecruzamiento de los monómeros de la enzima lactato deshidrogenasa para formar dímeros y tetrámeros estables en 4% SDS y 10% β mercaptoetanol (Figura 9).

Para el entrecruzamiento de p33 y p36 se decidió usar el tdClRu que actúa más rápido que el glutaraldehído, y es foto-activable, lo que da mayor control sobre la reacción. Además, este reactivo no produce distorsión de las bandas en gel de poli-acrilamida como lo hace el glutaraldehído.

Se encontró que, al menos *in vitro*, p33/p36 se conforman en oligómeros, que por su peso molecular podrían ser dímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros, compuestos por una de las proteínas o por diferentes combinaciones de las dos (Figura 10). En los mismos experimentos de entrecruzamiento, se encontró que la agregación de p33/p36 es determinada, ya que se detectan múltiples oligómeros escalonados hasta los 220 kDa pero no más grandes. Aunque se forman super-agregados por entrecruzamiento inespecífico (no se muestra resultado), éstos se pueden diferenciar claramente de los oligómeros porque se retienen a la entrada del gel de poli-acrilamida-SDS, lo que deja un espacio entre el inicio del gel separador y el oligómero mas grande, en el que no se detecta nada con el anticuerpo anti-p33 (Figura 10).

La presencia de múltiples productos de entrecruzamiento de p33/p36 dificulta la identificación de los complejos que formen estas proteínas con su (o sus) proteína(s) de unión en la membrana; lo que sugiere, usar un paso adicional que permita eliminar las proteínas de membrana no unidas a p33/p36, para luego detectar por algún marcaje, a la(s) proteína(s) de membrana que sí se unieron. Para esto hay varias alternativas, uno, separar los complejos por tamaño en una cromatografía de exclusión molecular y detectar los picos en los que estén presentes tanto p33 o p36, como alguna proteína de la membrana. Este esquema resultaría útil en caso de que p33/p36 interactúen con la membrana conformadas en oligómeros de alto peso molecular. Dos, separar los complejos de p33/p36 y su(s) proteína(s) de unión en la membrana, mediante la inmuno-

precipitación usando anticuerpos anti-p33; o en una cromatografía de afinidad con el anticuerpo anti p33. En los tres casos, después de estabilizar mediante entrecruzamiento los complejos que forme p33/p36 con su(s) proteína(s) de unión en membrana, estos complejos y los oligómeros de p33/p36 se separarán de las otras proteínas de membrana. Una vez separados dichos complejos y establecida la presencia en ellos tanto de p33/p36 como de proteína(s) de membrana, se pueden identificar las proteínas presentes mediante digestión parcial y secuencia de los péptidos resultantes.

Adicionalmente, el hecho de que p33/p36 forme oligómeros de 220 kDa es consistente con otras observaciones: uno, en cromatografías de exclusión molecular de alto rango, p33 y p36 eluyen juntas con un peso molecular aproximado de 220 kDa, y estos agregados cuando se analizan en gel desnaturizante de poli-acrilamida-SDS, se separan en las dos bandas identificadas como p33/p36 (ver Figura 2). Y dos, en geles nativos este par de proteínas migran juntas con un peso molecular aparente de 220 kDa, (Hernández et. al. resultados no publicados). Estos resultados indican que este par de proteínas forman oligómeros que se separan con el detergente desnaturizante SDS, pero no por tratamiento con agentes reductores como el β -mercaptoetanol. Esto permite pensar que estas proteínas pueden encontrarse conformadas en hexámeros en el tejido cuando se les extrae, lo que conduce a la pregunta: ¿Esta conformación está relacionada con la función de p33 y p36?

Para las PRPs se ha propuesto tradicionalmente una función estructural por extrapolación de las extensinas. Las extensinas se conforman en bastones (Holst & Varner 1984), y se inmovilizan en la matriz extracelular por entrecruzamiento activado por peroxidasa (Brownleader *et al.* 1997). El hecho de que p33/p36 se acumulan solubles por efecto del déficit hídrico, lo que se confirma porque se les detecta acumuladas en extractos de proteína soluble y mediante impresiones de tejido en nitrocelulosa ('tissue printing') (Hernández *et al.* resultados no publicados), permiten considerar que p33 y p36 cumplan alguna

función cuando se encuentran solubles en la pared celular, posiblemente conformadas en oligómeros.

Lo anterior, no excluye que p33/p36 se inmovilisen en la pared celular por efecto de peroxidasas, aunque hay que recordar que estas proteínas no se acumulan por daño (Covarrubias *et al.* 1995), y que el daño es el tipo de estrés para el que está demostrado la inmovilización de extensinas.

De otro lado, la interacción entre p33/p36 y la membrana plasmática se ha evidenciado de múltiples formas: p33/p36 unen a microsomas de membrana (García-Gómez *et al.* 2000, Battaglia 2001), en ocasiones, pequeñas cantidades de p33/p36 se detectan en las membranas plasmáticas (no se muestra el experimento), lo que significa que en algunas circunstancias, p33 y p36 co-purifican con las membranas plasmáticas. Además, p33/p36 unen a protoplastos de hoja y esta unión se abate por tratamientos con tripsina (García-Gómez *et al.* 2000), y proteínas de membrana plasmática inmunoprecipitan con el anticuerpo anti-p33 (Battaglia 2001). Adicionalmente, extractos de proteínas de membrana plasmática biotiniladas, unen a p33/p36 en ensayo de unión similares a los descritos hasta ahora pero inversos: p33/p36 en nitrocelulosa, incubadas con solubilizados de proteínas de membrana marcadas. Y, esta unión se puede competir pre-incubando los extractos con p33/p36 (no se muestra el experimento).

La interacción entre la matriz extracelular y la membrana, mediada por p33/p36 puede caer en alguna de las tres formas de unión entre la membrana plasmática y la pared celular de plantas que han sido descritas hasta ahora. Las proteínas WAK ('wall associated kinases') se localizan en la membrana, e interactúan con la pared celular. Recientemente se estableció que Wak1 de *Arabidopsis* une en su segmento extra-citoplasmático con una proteína rica en repetidos de glicina AtGRP-3 (Park *et al.* 2001), lo que sienta un precedente importante en el análisis de las que se han llamado proteínas estructurales de la pared celular vegetal. Teniendo en cuenta que las proteínas WAK son variables en su segmento extracelular, lo que permite pensar que interactúen con diferentes ligandos, podría ser que p33/p36 interactuaran con alguna proteína WAK.

Una segunda alternativa de interacción entre la membrana y la matriz extracelular vegetal la constituyen las arabinogalactanas, de las cuales algunas se encuentran atadas a la membrana por enlaces covalentes con lípidos (Kohon 2000). Podría ser que, p33 y/o p36 contuvieran segmentos de unión a la membrana, y que se liberaran solubles en la pared celular por maduración postraducciona.

De otro lado, a pesar de que hasta ahora la búsqueda de receptores de membrana de plantas relacionados con las integrinas animales, no ha conducido a la identificación de las mismas, Canut *et al* demostraron la existencia de dos sitios de unión a péptidos que contienen la secuencia RGD en la membrana plasmática de *Arabidopsis* (Canut *et al.* 1998). Lo anterior sumado al que, la unión de p33/p36 a pmp80 se compete con péptidos que incluyen la secuencia RGD (García-Gómez *et al.* 2000), plantea la posibilidad de que p33/p36 interactuen en la membrana con una proteína relacionada funcionalmente con las integrinas.

Y finalmente, sin que ésto excluya las otras opciones, p33/p36 podrían estar involucradas en las Fibras de Hechtian, que son estructuras que unen la pared celular con la membrana plasmática, identificadas en experimentos de plasmólisis (Lang-Pauluzzi 2000).

7. Conclusiones

- Se optimizaron las condiciones para obtener las proteínas p33/p36 a partir de plántulas de frijol, logrando con eso duplicar el rendimiento.
- Se estableció una metodología eficiente para solubilizar proteínas de membrana de frijol que permite usar dichos solubilizados en ensayos subsecuentes de afinidad.
- Se estableció una metodología para acoplar p33/p36 a Sefarosa 4B, que incluye las modificaciones necesarias por ser proteínas básicas.
- Se ha establecido las condiciones para el entrecruzamiento de proteínas usando Tris(2,2'-bipiridil)-diclororutenio(II) y glutaraldehído.

8. Bibliografía

- Alberts, Bruce; Dennis Bay; Julian Lewis; Marin Raff; Keith Roberts & James D. Watson. 1994. **Molecular Biology of The Cell** Editado por Garland Publishing Inc. NY.
- Baldwin, Thimoty C.; Concha Domingo; Thomas Schindler; Gouri Seetharaman; Nicola Stacey & Keith Roberts. 2001. **De AGP1, a secreted arabinogalactan protein, is related to a family of basic proline-rich proteins.** Plant Molecular Biology Vol. 45:421-35.
- Battaglia, Marina. 2001. **Caracterización de la interacción entre p33 y p36, dos proteínas de pared celular, con la membrana plasmática de *Phaseolus vulgaris*.** Tesis para optar al título de Maestra en Bioquímica. Departamento de Biología Molecular de Plantas Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca.
- Baum, Jean & Barbara Brodsky. 1999. **Folding of peptide models of collagen and misfolding in disease.** Current Opinion in Structural Biology Vol. 9:122-28.
- Belanger, Kenneth D. & Ralph S. Quatrano. 2000. **Polarity the role of localized secretion.** Current Opinion in Plant Biology Vol. 3:67-72.
- Bernhardt, Christine & Mary Tirney. 2000. **Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from *Arabidopsis*, is regulated by cell-type-specific developmental pathway involved in root hair formation.** Plant Physiology Vol. 122:705-14.
- Blackstock, Walter P. & Malcom P. Weir. 1999. **Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins.** Trends in Botechnology Vol. 17 (3):121-27.
- Brownleader, M. D.; J. Hopkins; A. Mobasher; P. Jackson & M. Trevan. 2000. **Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth.** Planta Vol. 210:668-76.
- Brownleader, Michael D.; Paul E. McNally; Giddings E. A. Davies; Michael Trevan & Prakash M. Dey. 1997. **Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cell.** Phytochemistry Vol. 46:1-9.
- Brugière, Norbert; Yuhai Cui & Steven J. Rothstein. 2000. **Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility.** Trends in Plant Sciences Vol. 5 (10):432-38.
- Campos, Francisco; J.R. Pérez-Castineira; J.M. Villaba; F.A. Culiáñez-Macia; F. Sánchez & Ramón Serrano. 1996. **Localization of plasma membrane H⁺ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L.** Plant Molecular Biology Vol. 32:1043-53.
- Canut, Hervé; Antoine Carrasco; Jean-Phylippe Galaud; Catherine Cassan; Huguette Buysou; Natalio Vita; Pascual Ferrara & Rafael Pont-Lezica. 1998. **High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall.** The

- Plant Journal Vol. 16 (1):63-71.
- Carpita, Nicholas & Maureen McCann. 2000. **The cell wall.** En el libro **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** pp 25-108. Editado por Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem and Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Meriland. USA.
- Cassab, Gladys. 1998. **Plant cell wall proteins.** Annual Review Plant Physiology Vol. 49:281-309.
- Covarrubias, Alejandra A.; José W. Ayala; José L. Reyes; Magdalena Hernández & Alejandro Garcíarrubio. 1995. **Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings.** Plant Physiology Vol. 107:1119-29.
- Creelman, Robert & John E. Mullet. 1991. **Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differential expressed cDNAs a new tubulin gene and expression of genes encoding cell wall proteins.** Plant Molecular Biology Vol. 17:591-608.
- Darnell, Jim; Harvey Londiech & Paul Baltimore. 1988. **Historia de la biología celular y molecular.** En el libro **Biología molecular y celular** Editorial Labor. Barcelona.
- Deutch, Charles E. & Ilga Winicov. 1995. **Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein.** Plant Molecular Biology Vol. 27:411-18.
- Dubreucq, Bertrand; Nathalie Berger; Emmanuel Vincent; Murielle Boisson; Georges Pelletier; Michel Caboche & Loic Lepiniec. 2000. **The Arabidopsis AtERP1 extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination.** The Plant Journal Vol. 23 (5):643-52.
- Faik, Ahmed; Anne Marie Laboure; Danielle Gulino; Paul Mandaron & Denis Falconet. 1998. **A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins.** European Journal of Biochemistry Vol. 253:552-59.
- Fancy, David A. & Thomas Kodadek. 1999. **Chemistry for the analysis of protein-protein interaction: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light.** Proceeding of Natural Academy of Sciences USA Vol. 96:6020-24.
- Fowler, John E. & Ralph S. Quatrano. 1997. **Plant cell morphogenesis: Plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall.** Annual Reviews of Cell Development Vol. 13:697-743.
- Fowler, Thomas J.; Christine Bernardt & Mary Tirney. 1999. **Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in Arabidopsis encoding two distinct subsets of multiple domain protein.** Plant Physiology Vol. 121:1018-91.
- Gälweiler, Leo; Changhui Guan; Andreas Müller; Ellen Wisman; Kurt Mendgern; Alexander Yephemov & Klaus Palme. 1998. **Regulation of polar**

- transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* Vol. 282:2226-29.
- Gao, Minggeng & Allan M Showalter. 2000. Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* Vol. 210:865-74.
- García-Gómez, Blanca I.; Francisco Campos; Magdalena Hernández & Alejandra A. Covarrubias. 2000. Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *The Plant Journal* Vol. 22 (4):277-88.
- Giacontti, Fillipo G. & Erkki Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* Vol. 285:1028-32.
- Giranton, Jean-Loïc; Christian Dumas; J.Mark Cock & Thierry Gaude. 2000. The integral membrane S-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers *in planta*. *Proceeding of Natural Academy of Sciences USA* Vol. 97 (7):3759-64.
- Girault, Reinald; Isabele His; Christine Andeme-Onzighi; Azeddine Driouich & Claudine Morvan. 2000. Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary walls of flax fibers. *Planta* Vol. 211:256-64.
- Harlow, Ed & David Lane. 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* 726. Editado por Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- He, Zheng-Hui; Masaaki Fujiki & Bruce D. Kohorn. 1996. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 271 (33):19789-93.
- He, Zheng-Hui; Deze He & Bruce D. Kohorn. 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall associated kinase for survival during the pathogen response. *The Plant Journal* Vol. 14 (1):55-63.
- He, Zheng-Hui; Ian Cheeseman; Deze He & Bruce D. Kohorn. 1999. A cluster of five cell wall-associated receptor kinases genes, Wak 1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* Vol. 39:1189-96.
- Hoefler, Marca-Registrada. 1993. *Hoefler Scientific instruments 1992-1993.*
- Holst, Gerrit-Jan Van & Joseph E. Varner. 1984. Reinforced proline II conformation in a hydroxiprolin-rich cell wall glycoprotein from carrot root. *Plant Physiology* Vol. 74:247-51.
- Hong, Jong Chan; Ron T. Nagao & Joe L. Key. 1990. Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of Soybean. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 265 (5):2470-75.
- Hong, Suk Whan; Ji Hyung Jon; June Myoung Kwak & Hong Gil Nam. 1997. Identification of a receptor-like kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration high salt and cold treatments

- in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology Vol. 113:1203-12.
- Howell, Kathryn E. & George E. Palade. 1982. **Hepatic golgi fractions resolved into membrane and content subfractions.** The Journal of Cell Biology Vol. 92:822-32.
- Hurkman, William J. & Charlene K. Tanaka. 1986. **Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis.** Plant Physiology Vol. 81:802-06.
- Husic, H. David; Showchien Hsieh & Allison L. Berrier. 1991. **Effect of dithiothreitol on the catalytic activity, quaternary structure and sulfonamide-binding properties of an extracellular carbonic anhydrase from *Chlamidomonas reinhardtii*.** Biochemical et Biophysical Acta Vol. 1078:35-42.
- Inoue, Tsutomu; Masayuki Higuchi; Yukari Hashimoto; Motoa Seki; Masatomo Kobayashi; Tomohiko Kato; Satoshi Tabata; Kazuo Shinosaki & Tatsuo Karimoto. 2001. **Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis.** Nature Vol. 409:1060-63.
- Jinn, Tsuo-Luo; Julie M. Stone & John C. Walker. 2000. **HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission.** Genes & Development Vol. 14:108-17.
- Johansson, Ingela; Maria Karlsson; Urban Johanson; Chister Larsson & Per Kjellbom. 2000. **The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance.** Biochemical et Biophysical Acta Vol. 1465:324-42.
- Jones, Owen T.; Julie P. Earnest & Mark G. McNamee. 1990. **Solubilization and reconstitution of membrane proteins.** En el libro Biological membranes. A practical approach. pp 139-77. Editado por J. B. C. Findlay and W. H. Evans. Oxford University Press. New York.
- José-Estanyol, Matilde & Pere Puigdoménech. 1998. **Developmental and hormonal regulation of genes coding for proline-rich proteins in female inflorescence and kernels of maize.** Plant Physiology Vol. 116:485-95.
- . 2000. **Plant cell wall glycoproteins and their genes.** Plant Physiology Biochemistry Vol. 38 (1/2):97-108.
- Keller, Beat. 1993. **Structural cell wall proteins.** Plant Physiology Vol. 101:1127-30.
- Kiba, Akinori; Megumi Sugimoto; Kazuhiro Toyoda; Yuki Ichinose; Tetsuji Yamada & Tomonori Shiraishi. 1998. **Interaction between cell wall and plasma membrane via RGD motif is implicated in plant defense response.** Plant Cell Physiology Vol. 39 (11):1245-49.
- Kohorn, Bruce D. 2000. **Plasma membrane-cell wall contacts.** Plant Physiology Vol. 124:31-38.
- Labouré, Anne-Marie; Ahmed Faik; Paul Mandaron & Denis Falconet. 1999. **RDG-dependent growth of maize calluses and immunodetection of an integrin-like protein.** FEBS letters Vol. 442:123-28.
- Lang-Pauluzzi, I. 2000. **The behavior of the plasma membrane during**

- plasmolysis: a study by UV microscopy.** Journal of Microscopy Vol. 198 (3):188-98.
- Liyama, Kenji; Thi Bach-Tuyet Lam & Bruce Stone. 1994. **Covalent cross-links in the cell wall.** Plant Physiology Vol. 104:315-20.
- Lole, Susan J. & Robert E. Pruitt. 1999. **Epidermal cell interaction: a case for local talk.** Trends in Plant Science Vol. 4 (1):14-20.
- Lord, Elizabeth. 2000. **Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme.** Trends in Plant Science Vol. 5 (9):368-73.
- Marshall, J.G.; E.B. Dumbroff; B.J. Thatcher; B. Martin; R.G. Rutledge & E. Blumwald. 1999. **Synthesis and oxidative insolubilization of cell-wall protein during osmotic stress.** Planta Vol. 208:401-08.
- McCabe, Paul; Tracy A. Valentine; L.Scott Forsberg & Roger I. Pannell. 1997. **Soluble signal from cell identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot.** The Plant Cell Vol. 9:2225-41.
- Mellersh, Denny G. & Michèle C. Heath. 2001. **Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense response during fungal penetration.** The Plant Cell Vol. 13:413-24.
- Merkouropoulos, Georgios; David C. Barnett & Anil H. Shirsat. 1999. **The Arabidopsis extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs.** Planta Vol. 208:212-19.
- Mithöfer, Axel; Frieddrich Lottspeich & Jürgen Ebel. 1996. **One-step purification of the β -glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an anti-peptide antiserum.** FEBS Letters Vol. 381:202-07.
- Mollet, Jean-Claude; Sang-Youl Park; Eugen A. Nothnagel & Elizabeth M. Lord. 2000. **A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix.** The Plant Cell Vol. 12:1737-49.
- Morimoto, Satoshi; Norfumi Tateish; Masako Inuyama; Futoshi Taura; Hiroyuki Tanaka & Yukiro Shoyama. 1999. **Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties.** The Journal of Biological Chemistry Vol. 274 (37):26192-98.
- Nagpal, Punita & Ralph S. Quatrano. 1998. **Isolation and characterization of an Arabidopsis cDNA clone with partial sequence similarity to integrins.** 9th International conference on Arabidopsis research. Junio 24 al 28. Madison Wsconsin Virginia. National Sciences Foundation US. Department of Agriculture.
- Nennstiel, Dirk; Dierk Scheel & Thorsten Nuremberger. 1998. **Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*).** FEBS

- letters Vol. 431:405-10.
- Nurnberger, Thorsten; Dirk Nennstiel; Lklaus Hahlbrock & Dierk Scheel. 1995. **Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes.** Proceeding of Natural Academy of Sciences USA Vol. 92:2338-42.
- Oparka, Karl J. 1994. **Plasmolysis: a new insights into an old process.** New Phytol Vol. 126:571-91.
- Orford, S.J. & J.N. Timmins. 1997. **Abundant mRNA specific to the developing cotton fiber.** Theoretical and Applied Genetics Vol. 94:909-18.
- Otte, Oliver & Wolfgang Barz. 2000. **Characterization and oxidative cross-linking of an extensin-like protein and proline-rich protein purified from chickpea cell walls.** Phytochemistry Vol. 53:1-5.
- Park, Ae Ran; Cho Somi K; Ui Jeong Yun; Mi Young Jin; Seoung Hyun Lee; Gilberto Sabetto-Martins & Ohkmae K. Park. 2001. **Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycyne rich protein AtGRP-3.** Journal of Biochemistry en Internet. Manuscript No. M101283200. May 2, 2001.
- Park, Sang-Youl; Gauang-Yuh Jauh; Jean-Claude Mollet; Kathleen J. Eckard; Eugene A. Nothnagel; Linda L. Wailing & Elizabeth M. Lord. 2000. **A lipid transfer-like protein is necessary for Lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix.** The Plant Cell Vol. 1:151-63.
- Pennell, Roger. 1998. **Cell walls: structure and signals.** Current Opinion in Plant Biology Vol. 1:504-10.
- Perrin, Robyn M. 2001. **Cellulose: How many cellulose synthases to make a plant?** Current Biology Vol. 11:R213-R16.
- Pharmacia, Marca-Registrada. 1999. **Sefarosa CNBr Manual de uso.**
- Pont-Lezica, R.F.; J.G. McNally & B.G. Pickard. 1993. **Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypotheses.** Plant Cell and Environment Vol. 16:111-23.
- Quatrano, Ralph S. & Sidney L. Shaw. 1997. **Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos.** Trends in Plant Science Vol. 2 (1):15-21.
- Quintero-Higuera, María Fernanda; María Del Socorro Santos-Díaz & Ramón Fernando Gacía-De La Cruz. 1997. **Cell wall proteins of *in vitro* cultured chili pepper lines differing in water stress tolerance.** Plant Science Vol. 128:217-23.
- Reiter, Wolf-Dieter. 1998. **The molecular analysis of cell wall components.** Trends in Plant Sciences Vol. 3 (1):27-32.
- Reuzeau, C. & R.F. Pont-Lezica. 1995. **Comparing plant and animal extracellular matrix-citoeskeleton connections-are they like?** Protoplasma Vol. 186:113-21.
- Ringli, Christoph; Gunter Hauf & Beat Keller. 2001. **Hydrophobic interactions of the structural protein GRP1.8 in cell wall of**

- protoxilem elements.** Plant Physiology Vol. 125:673-82.
- Roberts, Keiht. 1994. **The plant extracellular matrix: in a new expansive mood.** Current Opinion in Cell Biology Vol. 6:688-94.
- Robertson, Duncan; Przemyslaw Wojtaszek & G.Paul Bolwell. 1999. **Stimulation of cell wall biosynthesis and structural changes in response to cytokinin- and elicitor-treatments of suspension-cultured *Phaseolus vulgaris* cell.** Plant Physiology Biochemistry Vol. 37 (7/8):611-22.
- Rodríguez, Fernando I.; Jeffrey J. Esch; Anne E. Hall; Brad M. Binder; G.Eric Schaller & Anthony B. Bleeker. 1999. **A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis.** Science Vol. 283:996-98.
- Roy, Stéphane; Guang Yuh Jauh; Peter K. Hepler & Elizabeth M. Lord. 1998. **Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube.** Planta Vol. 204:450-58.
- Ryser, Ulrich; Martine Schorderet; Gui-Fang Zhao; Daniel Studer; Katia Ruel; Gunte Hauf & Beat Keller. 1997. **Structural cell-wall protein in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein.** The Plant Journal Vol. 12 (1):97-111.
- Sachetto-Martins, Gilberto; Luciana O. Franco & Dulce E. De Olivera. 2000. **Plant glycyne-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?** Biochimica et Biophysica Acta Vol. 1492:1-14.
- Satoin, Véronique; David Rouquie; Patrick Doumas; Monique Mansion; Marc Boutry; Hervé Degand; Paul Dupree; Len Packman; Janine Sherrier; Marc Tracy Prime; Guy Bauw; Esmeralda Posada; Pierre Rouzé; Patrice Dehais; Ilhem Sahnoun; Isabelle Barlier & Michel Rossignol. 1998. **Use of a proteomic strategy for targging proteins present at the plasma membrane.** The Plan Journal Vol. 15 (5):633-41.
- Saxena, Inder M & R. Malcom Brown-Jr. 2000. **Cellulose synthases and related enzymes.** Current Opinion in Plant Biology Vol. 3:523-31.
- Schindler, Melvin; Sally Meiners & David A. Cheresch. 1989. **RGD-dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane: consequences for growth.** The Journal of Cell Biology Vol. 108:1955-65.
- Showalter, Alan M. 1993. **Structure and function of cell wall proteins.** The Plant Cell Vol. 5:9-23.
- Schumacher, Karin & Joanne Chory. 2000. **Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors.** Current Opinion in Plant Biology Vol. 3:79-84.
- Sommer-Knudsen, Jens; Antony Bacic & Adrien E. Clarke. 1998. **Hydroxiprolin-rich plant glycoproteins.** Phytochemistry Vol. 47 (4):483-497.
- Staab, Janet F.; Chistopher A. Ferrer & Paula Sundstrom. 1996. **Developmental expression of a tandemly repeated proline-rich glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces of**

- Candida albicans*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 271 (11):6298-305.
- Staab, Janet F.; Steven D. Bradway; Paul L. Fidel & Paula Sundstrom. 1999. **Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans*** Hwp. Science Vol. 283:1535-37.
- Sun, Ying; Hong Qian; Xiao-Dong Xu; Ye Han; Long-Fei Yen & Da-Ye Sun. 2000. **Integrin-like proteins in pollen tube: detection, localization and function.** Plant Cell Physiology Vol. 41 (10):1136-42.
- Tassoni, Annalisa; Fabiana Antognoni; Maria Luisa Battistini; Oliver Sanviedo & Nello Bangni. 1998. **Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane protein from zucchini hypocotyls.** Plant Physiology Vol. 117:971-77.
- Trotochaud, Amy E.; Tong Hao; Guang Wu; Zhenbia Yang & Steven E. Clark. 1999. **The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CALVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein.** The Plant Cell Vol. 11:393-405.
- Umemoto, Naoyuki; Makoto Kakitani; Akihiro Iwamatsu; Masaaki Yoshikawa; Naoto Yamaoka & Isao Ishida. 1997. **The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein.** Proceeding of Natural Academy of Sciences USA Vol. 94:1029-34.
- Wagner, Tanya A. & Bruce D. Kohorn. 2001. **Wall-associated kinase are expressed throughout plant development and are required for cell expansion.** The Plant Cell Vol. 13:303-18.
- Williamson, Michael P. 1994. **The structure and function of proline-rich regions in proteins.** Biochemical Journal Vol. 297:249-60.
- Wyatt, Sarah E. & Nicholas C. Carpita. 1993. **The plant cytoskeleton-cell-wall continuum.** Trends in Cell Biology Vol. 3:413-17.
- Zhu, Jian-Kang; Jun Shi; Utpal Singh; Sara E. Wyatt; Ray A. Bressan; Paul M Hasegawa & Nicholas Carpita. 1993. **Enrichment of vitronectin and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion.** The Plant Journal Vol. 3 (5):637-46.