

03072



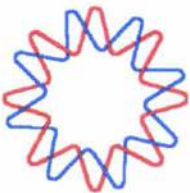
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA DE DOS PROTEÍNAS DE PARED
CELULAR DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA:
MAGDALENA HERNÁNDEZ ORTIZ.

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ALEJANDRA A. COVARRUBIAS ROBLES.



Cuernacava, Morelos, mayo 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos.
Aristóteles

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Magdalena Hernández
Ortiz

FECHA: 12/mayo/04

FIRMA: Magdalena Hdez. O

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que
queramos durante toda la vida.
Lee Smolin

A mis padres Felipe y Febita.

A Tere, mí querida hermana.

A Aylén, mi pedacito de corazón.

Por su inmenso amor y porque fueron el aliciente que me ayudó a levantarme en cada uno de mis tropiezos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, por su paciencia y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo, por aceptarme en su laboratorio y alentarme a continuar en este camino.

A los Dres. Gladys I. Cassab y Jorge Vázquez Ramos, miembros de mi comité tutorial, por su apoyo y valiosos comentarios.

A la Dra. Gladis I. Cassab López, por su apoyo en la elaboración de las impresiones de tejido.

Al M.C. Elpidio García Ramírez, por su apoyo durante la purificación de p33 y p36 en cromatografía de baja presión.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por las facilidades prestadas en su laboratorio para la purificación de p33/p36.

A la Dra Patricia León, por las facilidades en el uso del microscopio estereoscópico y su equipo fotográfico.

Al Sr. Pedro Sánchez Ramírez, por la elaboración de los cromatogramas de p33 y p36.

Al Dr. Fernando Zamudio, por su apoyo en la digestión y purificación de p33 y p36.

A la MVZ Elizabeth Mata, por el apoyo durante la obtención de los anticuerpos.

A los Dres. Mario Rocha Sosa, Sergio M. Encarnación Guevara, Georgina Ponce Romero Y Rosario Vera Estrella, por la cuidadosa revisión y comentarios a este manuscrito.

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Biotecnología- UNAM, en el Departamento de Biología Molecular de Plantas.

Bajo la dirección de la Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por los siguientes donativos:

CONACYT: 0131P-N9506

DGAPA: IN204496

En momentos como este, citar a todas las personas a quien hay algo que agradecer, es difícil pues siempre de manera involuntaria ocurren omisiones. Sin embargo correré el riesgo y quiero agradecer de manera muy especial a:

Ale, por tu amistad y apoyo no solo en el desarrollo del proyecto y durante mi estancia en el laboratorio, si no fuera de él. No hay palabras que describan mejor lo que siento al ver hacia atrás y darme cuenta que sin tu confianza, ni siquiera habría iniciado este camino, GRACIAS.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, hoy casi todos ausentes, pero no de mi memoria y afectos, Blanca, Chema, Adriana, Liz Pa, Rosy, Pancho, Oscar, Espe, Claudia Smith, Florencia, Jordi, Sergio Casas, José Luis Gama, la Sra. María de Jesús, Emmanuel y Alejandro.

A mis compañeros, valiosa compañía en las traspasadas para preparar la clase, tareas y los exámenes de cada curso, Vicky, Edgar, Juan, Rafa, Lucía.

A la familia García-Gómez, por su apoyo, comprensión, solidaridad y compañía en los momentos más difíciles.

A Blanca Inés, por tu amistad y apoyo incondicional, por las largas jornadas extrayendo a p33 y p36, por las sesiones de discusión, por el cafecito. En definitiva, uno de los presentes más valiosos que me dejaron las p33 y p36 fue tu amistad.

A Edgar, por tu amistad y solidaridad, porque siempre tuviste la palabra adecuada para devolverme la sonrisa porque Blanca y tú siempre han estado conmigo.

A Vicky, por que aun en la distancia siempre has estado presente.

A Agustín, porque en todo este tiempo no dejaste de preguntarme por la ansiada fecha, y porque sin tu ayuda no tendría en mis manos este bonito manuscrito.

A Vicky y Jesús, por las agradables veladas elaborando una tesis.

A Enrique Vargas Villaseñor, porque de alguna manera le debo mi permanencia en el posgrado.

A Sergio, por tu amistad pero sobre todo por tu paciencia en la recta final de este manuscrito.

A todas aquellas personas que no compartieron la etapa experimental, pero sí la larga espera y nunca dejaron de alentarme a terminar este manuscrito

A todos gracias

ÍNDICE.

1	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	LA PLANTA Y EL DÉFICIT HÍDRICO.....	3
1.1.1	Efectos del déficit hídrico en las plantas.....	3
1.1.2	Respuestas de la planta a la sequía.....	5
1.1.3	Genes inducidos por sequía.....	6
1.1.4	Modificaciones de la pared celular en respuesta al estrés.....	7
1.2	LA PARED CELULAR.....	7
1.2.1	Visión general y componentes.....	7
1.2.1.1	Polisacáridos.....	8
1.2.1.1.1	Celulosa.....	8
1.2.1.1.2	Hemicelulosas.....	9
1.2.1.1.3	Pectinas.....	10
1.2.1.1.4	Lignina.....	10
1.2.1.2	Proteínas de pared celular.....	11
1.2.1.2.1	Extensinas.....	11
1.2.1.2.2	Proteínas ricas en prolina (PRP's).....	11
1.2.1.2.3	Arabinogalactanas (AGPs).....	12
1.2.1.2.4	Lectinas.....	13
1.2.1.2.5	Proteínas ricas en glicina.....	13
1.2.1.2.6	Otras proteínas.....	14
1.2.1.3	Cambios en la expresión de los genes de las proteínas de pared.....	14
1.2.2	La pared celular ensamblada.....	15
1.2.3	La pared celular y el crecimiento.....	16
2	ANTECEDENTES DE LABORATORIO.....	18
3	OBJETIVO GENERAL.....	19
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO:.....	20
4.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS BÁSICAS.....	20
4.2.1	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	21
4.3	PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON SULFATO DE AMONIO.....	21
4.4	CROMATOGRAFÍA.....	23
4.4.1	Separación por intercambio catiónico.....	23
4.4.2	Separación en FPLC: columna Superdex-200.....	23
4.5	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	23
4.5.1	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	24
4.6	Experimentos tipo "WESTERN".....	24
4.6.1	Detección del antígeno.....	25
4.7	INMUNO HISTOQUÍMICA.....	26

4.7.1	Impresiones de tejido.....	26
4.7.2	Electroelusión de proteínas.....	26
4.7.3	Obtención de anticuerpos.....	26
4.7.4	Purificación de anticuerpos por inmovilización.....	27
4.8	MICROSECUENCIA.....	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	28
5.1.1	Purificación de p33 y p36.....	28
5.1.1.1	Precipitación con sulfato de amonio.....	28
5.1.1.2	Separación por intercambio catiónico.....	29
5.1.1.3	Separación por cromatografía líquida de baja presión.....	30
5.1.2	Composición de aminoácidos y secuencia parcial.....	33
5.1.3	Determinación del estado oligomérico.....	35
5.1.4	Estimación del punto isoeléctrico (pI) de p33 y p36.....	37
5.1.4.1	Separación de p33 y p36 a partir de geles catiónicos.....	37
5.1.4.2	Estimación del pI de p33 y p36, a partir de geles de doble dimensión a no equilibrio.....	38
5.1.5	CONCLUSIONES.....	39
5.2	INMUNOCARACTERIZACIÓN DE p33 y p36.....	40
5.2.1	Producción de anticuerpos y purificación por inmovilización.....	40
5.2.1.1	Purificación de anticuerpos por inmovilización.....	40
5.2.2	Análisis de polipéptidos relacionados inmunológicamente a p33 y p36 en diferentes géneros vegetales.....	41
5.2.3	Análisis de polimorfismo de p33 y p36 en otras variedades de frijol.....	43
5.2.4	Inmunolocalización de p33 y p36 en las diferentes regiones de crecimiento del hipocotilo.....	44
5.2.5	CONCLUSIONES.....	47
6	DISCUSIÓN.....	48
7	BIBLIOGRAFÍA.....	53
8	APENDICE.....	61

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA PLANTA Y EL DÉFICIT HÍDRICO.

La distribución natural de las plantas obedece a su capacidad para contender con los factores ambientales adversos; éstos van desde la limitación de nutrientes, condiciones extremas de temperatura y de pH, toxicidad por metales y la limitación de agua, entre otros.

Las plantas se clasifican de acuerdo a las condiciones de humedad en que están adaptadas para su desarrollo. Las plantas hidrófitas, sobreviven en condiciones de humedad abundante, viven parcial o totalmente sumergidas en agua. Las plantas xerófitas, adaptadas a vivir en ambientes áridos, sobreviven muy bien en potenciales hídricos muy negativos. Las mesófitas, están adaptadas a vivir en condiciones de humedad moderada, no toleran potenciales hídricos más negativos de -20 bares, a este grupo pertenece la mayoría de las plantas de interés agrícola. La falta de agua desencadena una serie de respuestas que se manifiestan en cambios a nivel celular, fisiológico y afectando el nivel de desarrollo de la planta en general (Bray, 1993).

El déficit hídrico o estrés osmótico, es uno de los problemas ambientales que más limita el desarrollo de las plantas, y se manifiesta por una considerable disminución en la disponibilidad de agua. La disponibilidad de agua no solo se limita cuando existe escasa humedad ambiental o en el suelo, sino también durante las bajas temperaturas o elevadas concentraciones de sales, y por supuesto durante condiciones de sequía, la cual constituye un grave problema agrícola, ya que la mayor parte de las plantas se cultivan bajo condiciones de temporal. Así mismo, estas condiciones de limitación de agua incrementan los costos de producción, ya que se hace necesario implementar sistemas de irrigación, los cuales a su vez generan problemas de salinidad en los suelos.

1.1.1 Efectos del déficit hídrico en las plantas.

El agua en los seres vivos desempeña diferentes funciones, por ello la falta de ésta se manifiesta a diferentes niveles. El proceso de crecimiento es uno de los más afectados, ya que de ésta manera la planta previene un gasto energético fútil en situaciones adversas. En particular el crecimiento de la parte aérea de la planta es uno de los procesos afectados por la falta de agua (Hsiao, 1973; Nonami y Boyer, 1993; Taiz y Zeiger, 1991). Se ha observado que mientras la velocidad de crecimiento de la parte aérea de la planta disminuye, la velocidad de

crecimiento de la raíz se sostiene. Esto es un proceso adaptativo que le permite a la planta aumentar su superficie de captación de agua (Creelman y Mullet, 1991; Turner, 1986). En la Figura 1 se señalan algunos procesos afectados por el déficit hídrico.

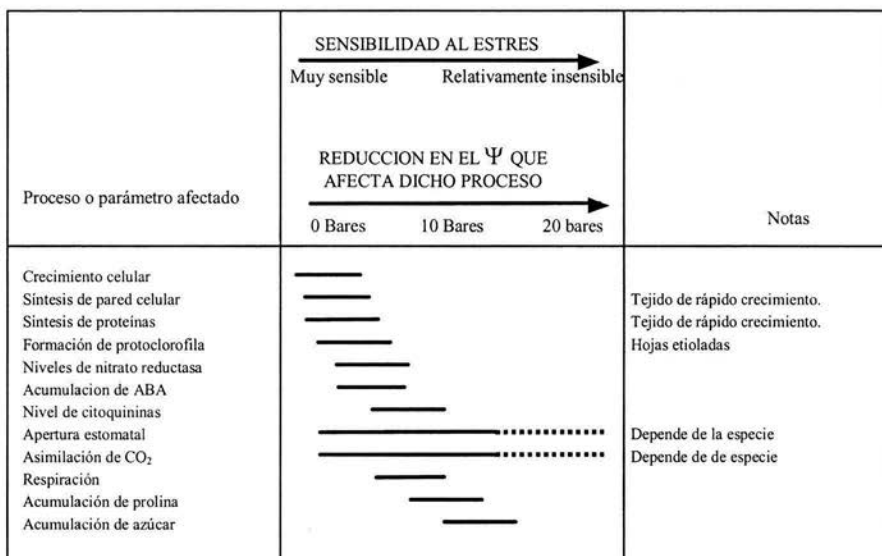


Figura 1. Sensibilidad general de algunos procesos o parámetros, al estrés hídrico. La longitud de las líneas horizontales representa el nivel de estrés en que el proceso se ve afectado. Ψ , potencial osmótico. Tomado de Hsiao (1973).

Los estomas constituyen la principal vía de pérdida de agua de la planta. En condiciones de déficit hídrico ocurre el cierre de estomas y con ello, se reduce la tasa de evaporación de agua. Sin embargo, esta medida tiene en consecuencia un incremento de la temperatura foliar, con lo cual se sugiere que en condiciones de déficit hídrico también se puede generar un estrés calórico. La apertura estomatal, no sólo depende de la cantidad de vapor presente en el aire, sino también de cambios en la presión de turgor de las células guarda.

Los efectos del déficit hídrico se aprecian a nivel metabólico los podemos apreciar en el aparato fotosintético, como consecuencia del cierre estomatal. El cerrado de los estomas previene la entrada de CO₂, lo que representa una limitación para el proceso fotosintético. Sin

embargo, la tasa fotosintética es menos sensible a la falta de agua que la expansión foliar.

1.1.2 Respuestas de la planta a la sequía.

La falta de agua ha llevado a las plantas a desarrollar mecanismos adaptativos que le permitan contender con el déficit de agua. Sin embargo, estos mecanismos adaptativos aseguran más bien la supervivencia de la planta, no así su productividad (Boyer, 1992). Los mecanismos adaptativos se observan a diferentes niveles: el morfológico, el fenológico, el fisiológico y el metabólico. Estos mecanismos han sido agrupados en tres categorías:

I) El escape a la desecación, que consiste en un rápido desarrollo fenológico tras la incidencia de lluvias; es decir, la planta completa su ciclo de vida cuando aún prevalecen condiciones de humedad adecuadas que aseguran la permanencia de la siguiente generación. Muchas plantas anuales presentan este comportamiento, a estas plantas también se les conoce como evasoras de la sequía (Turner, 1986).

II) La tolerancia a la desecación, que consiste en la habilidad de las plantas para mantener su desarrollo durante condiciones de déficit hídrico. Estas plantas han desarrollado estrategias que contrarrestan los efectos de la deshidratación, entre los que se encuentran:

i) Ajuste osmótico. Se refiere a la acumulación de solutos intracelulares haciendo más negativo el potencial de agua y manteniendo así la turgencia celular (Singh *et al*, 1972; Parsons y Howe, 1984; Nardu *et al* 1987). El ajuste osmótico permite el mantenimiento del turgor y en consecuencia el crecimiento celular (Turner, 1986). Este fenómeno se ha observado en diferentes especies y tejidos vegetales (Greacen, 1972; Michelena y Boyer 1982; Turner y Jones, 1980; Morgan, 1978, 1984; Jones y Rawson 1979). En plantas mesófitas tanto cultivadas como silvestres es común el ajuste osmótico (Hanson y Hitz, 1982).

ii) Compartimentalización de iones

iii) Cambios en las propiedades físicas de la pared celular

iv) Síntesis de proteínas protectoras de la maquinaria celular

v) Síntesis de enzimas y metabolitos antioxidantes

vi) Ajustes fisiológicos y metabólicos

III) El retardamiento de la desecación, el cual agrupa dos comportamientos diferentes: el economizador de agua y el derrochador de agua. En el primero se encuentra un grupo de

plantas que emplea estrategias como el cierre de estomas, movimientos heliotrópicos, disminución de la superficie de transpiración, la presencia de tejidos almacenadores de agua, impermeabilización de las superficies expuestas (raíces y hojas), y uso de metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), entre otras. Estrategias todas ellas que le permiten economizar el agua que logra captar de su entorno. Esto se observa principalmente en plantas denominadas suculentas.

El segundo corresponde a un grupo de plantas que por el contrario son grandes consumidoras de agua. Son capaces de captar rápida y eficientemente el agua gracias a sistemas radiculares muy bien desarrollados que aseguran la captación de agua del suelo. Ejemplo de este grupo es el mezquite, que crece en regiones áridas y semiáridas, en las que desarrolla sistemas radiculares lo suficientemente grandes para llegar a los mantos freáticos de donde se abastece de agua. En otras palabras corresponde a un grupo de plantas que a pesar de encontrarse en un hábitat desfavorable nunca perciben la falta de agua.

1.1.3 Genes inducidos por sequía.

Aunque las especies vegetales varían en su sensibilidad y respuesta a la disminución en el potencial de agua ocasionado por la sequía, se puede decir que todas las plantas poseen genes para percepción del estrés, señalización y respuesta.

La productividad de las plantas es altamente afectada por estreses ambientales y, por tanto, el mejoramiento genético de la tolerancia al estrés es una necesidad urgente para la agricultura del futuro (Velasco *et al*, 1994). Los métodos de genética clásica han contribuido al mejoramiento de las cosechas, en relación al estrés (Acevedo y Fereres, 1993). Sin embargo, la tolerancia al estrés es una característica compleja y no se puede esperar que sea controlada por un grupo reducido de genes (Nelson *et al*, 1994).

El estudio de la tolerancia a la deshidratación se ha abordado usando principalmente tres estrategias: a) examinando sistemas tolerantes tales como semilla y plantas de resurrección; b) analizando mutantes de modelos genéticos; y c) analizando los efectos del estrés en plantas de importancia agronómica (Ingram y Bartels, 1996).

El estudio de los cambios en la expresión de genes durante la respuesta a déficit hídrico ha contribuido a un mejor entendimiento de este proceso, ya que se ha logrado aprender acerca de la plasticidad de las vías metabólicas y los límites de su funcionamiento. Estudios

moleculares han revelado que una amplia variedad de especies expresan en estas circunstancias genes comunes y proteínas similares (Skriver y Mundy, 1990). Aunque las funciones para muchos de esos genes no han sido debidamente asignadas, de acuerdo a sus características es probable que sus productos jueguen papeles activos en la respuesta al estrés (Bohnert *et al* 1995); sin embargo, sólo algunos de ellos participan en la adaptación a las condiciones de estrés. El hecho de que un gene sea inducido no es suficiente para concluir que su producto es requerido para la tolerancia al estrés (Bray, 1993).

1.1.4 Modificaciones de la pared celular en respuesta al estrés.

Durante periodos de déficit hídrico se han observado cambios importantes en la composición de la pared celular. La pared celular es una estructura dinámica que no solo confiere estructura y rigidez a la célula, si no que también contribuye a mantener la presión de turgor. Cuando existe una disminución de agua el protoplasma se contrae, se ha observado que existen conexiones firmes entre la pared celular y la membrana plasmática, que resultan de la adaptación al estrés osmótico e impiden la muerte celular durante condiciones de déficit hídrico (Zhu *et al*, 1993). La pared celular también participa de forma relevante en la respuesta de la planta al ataque de patógenos. Entre las respuestas más comunes a la invasión de bacterias y hongos patógenos, está la formación de capas de proteína y lignina (Bowles, 1990; Esquerré-Tugayé *et al*, 1979. Señales de la pared celular elicidadas por insectos inducen la producción de moléculas de defensa (Palm *et al*, 1990).

1.2 LA PARED CELULAR.

1.2.1 Visión general y componentes.

Recientemente, la visión de la pared celular ha cambiado, ha dejado de ser simplemente una estructura celular rígida que delimita al protoplasma y da forma a la célula; más bien se ha reconsiderado su papel como el de un organelo activo y dinámico, que desempeña funciones importantes tanto en el desarrollo celular, como en la activación de mecanismos de defensa a patógenos. La pared celular esta integrada por distintos componentes que interaccionan estrechamente entre sí, tales como polisacáridos, proteínas, lignina, agua, sustancias incrustantes tales como ceras, cutina, suberina, y ciertos compuestos inorgánicos como calcio y boro que tiene la capacidad de auto ensamblarse (Showalter, 1993; Cassab, 1998). La inserción de éstas últimas también altera las propiedades físicas de la pared celular.

Se conocen dos tipos de pared celular, la pared celular primaria y la pared celular secundaria. La pared celular primaria se encuentra tanto en células meristemáticas como en células en crecimiento. Esta pared es delgada y semi-rígida, aunque puede variar en grosor y morfología, está compuesta en casi todas las células por celulosa, hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas.

La pared celular secundaria la encontramos en las células maduras, éstas modifican su pared celular primaria, engrosándola y depositando nuevas capas de celulosa y otros componentes. Las moléculas de celulosa son mucho más alargadas (15,000 residuos de glucosa) que las de la pared celular primaria (500-5000, residuos de glucosa). Además la pared celular secundaria es mucho más densa y menos hidratada ya que se reemplaza la pectina por otros polímeros. La pared celular secundaria proporciona soporte mecánico a la mayoría de las plantas y generalmente es depositada entre la membrana plasmática y la pared celular primaria. La forma y composición final de la pared celular depende del tipo celular (Alberts, 1989).

A continuación se presenta una breve descripción de los componentes de la pared celular.

1.2.1.1 Polisacáridos.

1.2.1.1.1 Celulosa.

La celulosa es una cadena lineal de al menos 500 residuos de glucosa unidos covalentemente unos a otros por enlaces glicosídicos β 1-4, y estabilizados una con otra de manera paralela por puentes de hidrógeno (Alberts *et al*, 1989).

Las microfibrillas de celulosa son el resultado de la asociación de moléculas individuales de celulosa en un arreglo cristalino o casi cristalino, prácticamente libre de agua (McCann, 1990; Varner y Lin, 1989). Constituyen 20-30% del peso seco de la pared. Se sabe poco acerca del complejo celulosa sintasa, sin embargo, se han observado al microscopio electrónico partículas como grupos ordenados de rosetas que son las responsables de la síntesis de celulosa. Las moléculas de celulosa liberadas por la roseta, se agregan con aquellas liberadas por rosetas adyacentes para formar las microfibrillas. La orientación y deposición de las microfibrillas es determinada por los microtúbulos y generalmente es transversal al eje mayor de crecimiento; sin embargo, en algunas paredes celulares primarias se alternan capas

de microfibrillas en ángulo recto una contra otra. Conforme la célula incrementa en longitud, las microfibrillas de capas externas de la pared pueden ser colocadas en una orientación casi paralela al eje de elongación (Alberts *et al*, 1989; Giddings y Staehelin, 1991; Delmer, 1991).

1.2.1.1.2 Hemicelulosas.

Las hemicelulosas son polisacáridos de pared no celulósicos que no son pectinas. Son varias las hemicelulosas caracterizadas, entre ellas podemos mencionar a los xiloglucanos, los xilanos, y los β -glucanos.

Se propone que los xiloglucanos se tejen entre las microfibrillas y se unen a ellas, entrecruzándolas formando una red (Hayashi, 1991).

Los xiloglucanos, están constituidos por un esqueleto de glucosas unidas por enlaces $\beta(1-4)$ con tres de cada cuatro residuos unidos a xilosa por enlaces $\beta(1-6)$, los xiloglucanos pueden contener otros azúcares como fucosa y galactosa, como cadenas laterales. La función de los xiloglucanos es unirse estrechamente por puentes de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa lo cual impide que las microfibrillas se enlacen entre sí por puentes de hidrógeno en la pared celular primaria, lo que contribuye a su deslizamiento durante la elongación celular (Mc Neil *et al* 1984, Moore and Staehelin, 1988, Hayashi *et al*, 1987; Hayashi, 1991).

Los xiloglucanos purificados están asociados fuertemente *in vitro* con microfibrillas de celulosa purificadas y muestran poca autoafinidad (Hayashi *et al* 1987). Dadas esas propiedades, se ha visto *in muro* que los xiloglucanos forman una capa sobre la superficie cristalina de las microfibrillas de celulosa y penetran en regiones amorfas. Esas moléculas de xiloglucanos pueden mediar fuertemente la imbibición de las microfibrillas en la matriz-gel de la pared. La elongación de paredes de epicotilos de chícharo inducida por auxina está acompañada por la liberación de fragmentos de xiloglucanos y un incremento en una endo- β -1,4-glucanasa que rompe los xiloglucanos de chícharo (Hayashi *et al*, 1984 b).

Los xilanos son los componentes hemicelulósicos mayoritarios de las paredes de monocotiledóneas (15-20%) y un componente menor de las paredes de dicotiledóneas (2%). Constan de una cadena (1-4)- β -D-glucano unido por enlaces 1-6 a residuos α -D-Xilosil. Todos los xilanos tienen residuos xilosil unidos por enlaces β -4. Los xilanos tienen diferentes arreglos y combinaciones de cadenas laterales unidas en O-2 ó en O-3 a residuos xilosil. Los xilanos también están unidos fuertemente por enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de

celulosa, con una fuerza de unión inversamente proporcional al grado de sustitución de las cadenas laterales.

Los β -glucanos son polisacáridos que contienen una mezcla de residuos glucopiranosidos unidos por enlaces β -3 (cerca del 30%) y β -4 (cerca del 70%), son característicos de las paredes celulares de los pastos. Aparentemente, los enlaces β -3 raramente o nunca son contiguos, mientras que los enlaces β -4 se han encontrado más frecuentemente en series de dos o tres, ocasionalmente en series de más de diez.

1.2.1.1.3 Pectinas.

Las pectinas son un grupo de polisacáridos heterogéneos, ramificados y altamente hidratados, ricos en ácido d-galacturónico. Las homogalacturonanas, junto con las ramnogalacturonanas I y II constituyen el grueso de las pectinas de las dicotiledóneas. Debido a su carga negativa son moléculas altamente hidratadas y se unen específicamente a cationes. Ciertas pectinas son particularmente abundantes en la lámina media, la región central especializada que cementa una célula con otra.

1.2.1.1.4 Lignina.

La lignina es un polímero complejo compuesto de di y tri- hidrofenoles derivados de fenilalanina o de tirosina, y su función es engrosar y endurecer las paredes celulares

La pared de las células epidérmicas está cubierta o impregnada con ceras (cutina y suberina) que sirven para prevenir la pérdida de agua y como barrera mecánica contra la invasión de bacterias, hongos e insectos. La contribución de esas capas serosas a la fuerza de la arquitectura se desconoce. En algunas células especializadas la lignina se deposita tanto en la pared celular primaria y en la secundaria después de que el crecimiento cesa.

Un esquema de los componentes de la pared celular descritos hasta aquí y su interacción celular se muestra en la figura 2.

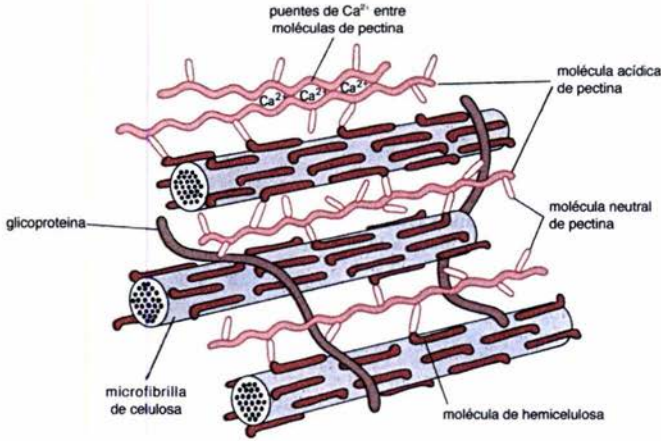


Figura 2. Esquema de los componentes de la pared celular.

1.2.1.2 Proteínas de pared celular.

1.2.1.2.1 Extensinas

Las proteínas estructurales más abundantes y mejor caracterizadas de las paredes de dicotiledóneas son las extensinas, una familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Cassab y Varner, 1988; Cooper *et al*, 1987; Tierney y Varner, 1987).

Las extensinas tienen las siguientes características en común: 1) son proteínas básicas, su punto isoeléctrico es alrededor de 10 por su alto contenido de lisina; 2) son ricas en residuos de hidroxiprolina, los cuales son típicamente glicosilados con uno a cuatro residuos arabinosil; 3) tienen dominios repetidos; 4) mediante microscopía electrónica, se ha observado que generalmente asumen estructura de vara flexible; y 5) las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos (serina, treonina, lisina, hidroxiprolina, tirosina e histidina) ofrecen muchas posibilidades para modificación postraduccional y la interacción *in muro* (Varner y Lin, 1989).

Las extensinas mejor caracterizadas son aquellas que se acumulan en cultivo de células en suspensión o en tejido en respuesta a daño, infección, elicitores o etileno.

1.2.1.2.2 Proteínas ricas en prolina (PRP's)

Las proteínas ricas en prolina son proteínas básicas que se caracterizan por tener cantidades equimolares de prolina e hidroxiprolina. Presentan repeticiones de prolinas contenidas en una variedad de secuencias repetidas. Muchas PRP's se caracterizan por la

presencia del decapeptido pro-pro-X-Y-Lis, donde X y Y pueden ser valina, tirosina, histidina y ác. glutámico, carecen de serinas y están parcialmente glicosiladas (Showalter, 1993). Las primeras PRP se identificaron en soya, donde se agruparon en tres subgrupos dentro de la familia, cada uno con una secuencia repetida representativa (Hong *et al* 1987). A partir de la secuencia deducida de aminoácidos se encontró una secuencia altamente repetitiva que consiste del pentámero PPVYK. El gene que la codifica, pertenece a una pequeña familia génica representada por tres genes: SbPRP1, SbPRP2 y SbPRP3 (Hong *et al* 1987, Hong *et al* 1990). La expresión de esta familia génica en soya está altamente regulada durante el desarrollo, y presenta patrones de expresión específico de célula y de tejido.

En frijol se han aislado genes con alta homología a PRP1 y PRP2 de soya a partir de plántulas etioladas de frijol sometidas a déficit hídrico y tratamientos con ABA (Colmenero-Flores *et al*, 1997). A la fecha se han encontrado proteínas ricas en prolina en otras especies vegetales cuyas secuencias repetidas difieren de las encontradas en soya.

1.2.1.2.3 Arabinogalactanas (AGPs).

Son una familia de glicoproteínas altamente glicosiladas, ricas en hidroxiprolina. Estas glicoproteínas consisten de un núcleo proteico unido a unidades de polisacáridos ricos, como su nombre lo indica, en arabinosa, galactosa, y en algunos casos ácido galacturónico u otros azúcares menos abundantes. La cadena polisacárida parece estar unida a los residuos de hidroxiprolina y posiblemente a serina y treonina, en tanto que las cadenas cortas de arabinosa, cuando existen, están unidas a hidroxiprolina.

Dependiendo de la composición del núcleo proteico se dividen en clásicas y no clásicas. El grupo de AGPs clásicas, están constituidas principalmente de hidroxiprolina, alanina, serina, treonina y glicina. En tanto, que las no clásicas tienen un núcleo proteico con una composición de aminoácidos distinta (Figura 3) (Showalter 2001).

Los mecanismos moleculares de la función de las AGPs aún no están del todo claros, aunque se les ha relacionado con diferentes funciones vegetales: a) como marcadores de identidad y destino celular, si bien no es claro si son las responsables de la diferenciación celular o solo son marcadores de el proceso; b) se han asociado al desarrollo del xilema, más específicamente se ha hipotetizado su función en el engrosamiento de la pared celular secundaria y en la muerte celular programada; c) interacciones moleculares y señalización, d) crecimiento reproductivo, asociadas al estilo, estigma y polen (Showalter, 2001)

A. AGPs Clásicas.



B. AGPs No-Clásicas.

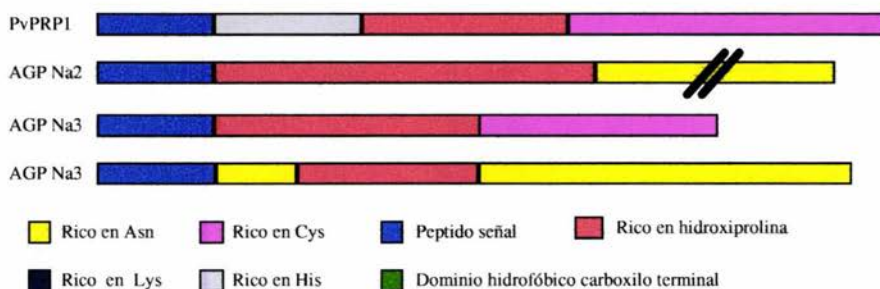


Figura 3. Estructura de los dominios codificados por clonas de arabinogalactanas clásicas y no clásicas (fragmento tomado de Showalter, 2001).

Las proteínas arabinogalactanas están ampliamente distribuidas en las plantas, contienen hidroxiprolina y se localizan principalmente en la matriz extracelular, en gomas y exudados (Showalter y Varner, 1989). La porción asociada con la pared celular es completamente soluble en agua y está involucrada en el reconocimiento célula-célula, más que en un papel estructural. Los estilos de las flores frecuentemente contienen arabinogalactanas, posiblemente asociadas con proteínas (Hoggart y Clarke, 1984), y la médula de los nódulos de las raíces de soya son ricos en proteínas arabinogalactanas (Cassab 1986).

1.2.1.2.4 Lectinas.

Las lectinas hemaglutininas de las solanáceas son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Showalter y Varner, 1989). Una región de la molécula está compuesta principalmente de hidroxiprolina y serina en proporción 4:1, el balance de la proteína es rico en cisteína, alanina y glicina. El patrón de glicosilación de las hidroxiprolinas es similar al de las extensina en las dicotiledóneas.

1.2.1.2.5 Proteínas ricas en glicina.

Algunas paredes celulares son ricas en glicina. Se ha caracterizado un gene de petunia

que codifica para una proteína que contiene 67% de glicina (Condit y Meagher, 1987), la mayor parte de la secuencia consiste de secuencias $(\text{Gli X})_n$ en las cuales X frecuentemente corresponde a glicina. El marco de lectura abierto incluye un péptido señal. El gene es expresado más abundantemente en hojas jóvenes y tallos, pero no en la raíz; además el nivel de transcrito incrementa con el daño. En *P. vulgaris* se han encontrado dos genes similares; una de las proteínas está asociada con paredes celulares del tejido vascular (Keller *et al*, 1988).

1.2.1.2.6 Otras proteínas.

Las paredes celulares de hojas de cebada contienen abundantes polipéptidos llamados tioninas, con actividad antifúngica (Bohlman *et al*, 1988). Estas proteínas tienen pesos moleculares de alrededor de 5000 Da, son básicas y ricas en cisteína (17%), constituyen la principal proteína soluble en las paredes celulares de hojas de cebada. Son codificadas por una compleja familia multigénica que contiene de 50-100 miembros por genoma haploide. Son tóxicas para hongos patógenos y su síntesis es disparada por patógenos.

Además de las proteínas estructurales y otras proteínas abundantes mencionadas, las paredes celulares contienen muchas enzimas. Entre ellas encontramos peroxidadas, fosfatasas, invertasas, α -mannosidasas, β -mannosidasas, β -1,3-glucanasas, β -1,4-glucanasas, poligalacturonasas, pectin metilesterasas, malato deshidrogenasas, arabinosidasas, α -galactosidasas, β -galactosidasas, β -glucoronidasas, β -xylosidasas, proteasas y ácido ascórbico oxidadas.

1.2.1.3 Cambios en la expresión de los genes de las proteínas de pared.

Se sabe poco a nivel molecular de la regulación de los genes involucrados en la síntesis y degradación de los polisacáridos de la pared. El sentido común nos dice que si la elongación de un tallo es controlado por auxinas y/o giberelinas, y que la elongación ocurre sin adelgazamiento de la pared, entonces al menos estas hormonas están directa o indirectamente involucradas en todos los aspectos de la deposición y rearrreglos de la pared durante el crecimiento. De hecho se ha visto que las auxinas incrementan la tasa de síntesis de compuestos no celulósicos de la pared (Kutchera y Brigs, 1987). Este incremento en la síntesis es paralelo al incremento de actividades de β -glucan sintasa y xiloglucan sintasa (Hayashi y MacLachlan, 1984 b). Simultáneamente hay un incremento en las enzimas degradadoras de la pared celular y son solubilizadas porciones de la matriz de la pared celular.

Se ha propuesto que la deposición de nuevo material mátrico es acompañado por la degradación (hidrolítica) o rearrreglo (p.ej. transglicosilación) de componentes ya existentes (Taiz, 1984). Paredes celulares aisladas experimentan autólisis perdiendo del 10-15% de su peso seco en 30 hs. Para paredes celulares aisladas de cereales se liberan principalmente β -1,3-glucanos y β -1,4-glucanos. En paredes celulares de dicotiledóneas, los polisacáridos liberados son principalmente arabinogalactanas y xiloglucanos. El tratamiento con auxinas a tejido en crecimiento antes del aislamiento de las paredes, incrementa la autólisis. Extracciones con 1.5 M a 3.0 M de LiCl remueve las enzimas responsables de la autólisis (Seara et al, 1988). Esas actividades enzimáticas son más elevadas en tejidos con más alta capacidad de crecimiento.

Se han caracterizado las endopoligacturonasas y las pectin metilesterasas aunque aún no es claro su posible papel en el crecimiento y en la maduración de frutos, donde la hidrólisis de los componentes de la pared es responsable de la suavidad del fruto. Frutos maduros de plantas de tomate transformadas con un gene antisentido de una endopoligacturonasa, son rojos, pero no suaves (Ray *et al*, 1988). Las celulasas están involucradas en tipos especiales de rearrreglos de la pared que ocurren durante la abscisión foliar y la maduración de frutos (especialmente aguacate). El tratamiento con etileno incrementa los niveles de celulasas en ambos procesos.

Las extensinas son codificadas por una pequeña familia multigénica y se acumulan diferentes transcritos en respuesta a diferentes señales. En raíces de zanahoria dos transcritos codificados por el mismo gene pero con diferente sitio de inicio 5', se acumulan en respuesta a daño (Chen y Varner, 1985b). En *P. vulgaris* se han caracterizado tres diferentes tipos de extensinas (Corbin *et al*, 1987). Esos transcritos muestran patrones de acumulación marcadamente diferentes en respuesta a daño, infección y elicitores fungales. En esas células la actividad prolin-hidroxilasa incrementa 20-30 veces en respuesta a elicitores fungales (Bolwell *et al*, 1985). Glutacion exógeno estimula la transcripción de genes de extensinas y fenil alanina amonio liasa, así como, un cambio masivo en el patrón de síntesis de proteínas en cultivos de células en suspensión de *P. vulgaris*.

1.2.2 La pared celular ensamblada.

Los datos que se tienen sobre los componentes de la pared celular se han obtenido a partir de cultivo de células en suspensión de sicomoro (Varner y Lin, 1989). No se conocen los tipos y la proporción de los componentes de pared en células diferenciadas y, en consecuencia,

en paredes celulares diferenciadas.

La arquitectura de la pared celular no es única de las plantas superiores. Los animales superiores usan colágeno como material fibroso, hongos y artrópodos utilizan quitina, en tanto que las plantas superiores contienen la celulosa. En las plantas superiores el papel de las microfibrillas de celulosa puede ser relativamente constante. Cambios en los ángulos de deposición de las capas de microfibrillas de celulosa pueden considerarse como ajustes menores. Con la escisión de las microfibrillas de una capa de xiloglucanos (o xilanos) fuertemente unida por enlaces de hidrógeno, se incrementan las posibilidades para hacer ajustes finos de las interacciones entre el complejo microfibrilla-xiloglucano y la matriz, la cual contiene varios carbohidratos complejos.

Dentro de cualquier pared celular, las posibilidades de modular las propiedades de la matriz hidrolizando algunos enlaces ésteres y/o glicosídicos es enorme. Ahora vemos que los requerimientos impuestos por los programas de desarrollo y por la respuesta a los estreses ambientales han resultado en la evolución de grupos sofisticados de genes y reguladores de estos genes que, modulan la estructura de la pared de acuerdo a la demanda. Las paredes celulares de diferentes tejidos tienen funciones diversas y por lo tanto estructuras diferentes.

Assumiendo que hay algún orden, así como cierta inmovilidad en los componentes de la pared, las enzimas involucradas en los rearrreglos deben tener alguna movilidad, ésto es, alguna capacidad de encontrar el sitio que requiere atención.

Existen algas del orden Volvocales cuyas paredes carecen de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. Las paredes están ensambladas completamente de glicoproteínas (Adair *et al.*, 1987).

1.2.3 La pared celular y el crecimiento.

El crecimiento es un proceso que requiere de la elongación celular y esta directamente relacionado a la presión de turgor (Taiz, 1991). La elongación celular básicamente consiste en un incremento del volumen celular propiciado por la captación de agua. La síntesis y degradación de los componentes de la pared celular desempeñan un papel fundamental durante el crecimiento.

Las paredes celulares que forman y parten las células en división son modificadas química y estructuralmente para proporcionar una célula con su forma funcional. La expansión

celular ocurre a través de una reorientación estrictamente regulada de cada uno de los componentes de la pared celular, que permite primeramente a la pared estirarse en direcciones específicas y concluir en una forma final (Carpita y Gibeaut 1993). Contienen componentes para señalización y comunicación por continuidad simplástica a través de los plasmodesmos (Lucas, 1999). Mantienen continuidad molecular con la membrana plasmática y con el citoesqueleto. Recientes descubrimientos han cambiado la visión de la pared celular, para considerarla como una extensión del citoplasma (Roberts 1990).

A diferencia de lo que ocurre en las plantas, en los hongos filamentosos, el crecimiento y la deposición de la pared celular son confinados en su mayor parte al ápice de la hifa en elongación. El nuevo material es depositado uniformemente en el ápice de la célula e intercalado progresivamente en los cilindros reforzados detrás del ápice. Este patrón de crecimiento ocurre en algunas células vegetales, como en el ápice de crecimiento de los pelos radiculares y en el tubo polínico. Pero para la gran mayoría de las células vegetales se deposita nuevo material uniformemente a lo largo de toda la pared celular en expansión (Preston, 1974).

Durante el crecimiento, la pared celular es un compartimiento metabólicamente activo, existe ruptura enzimática de las moléculas intercaladas y la presión osmótica empuja los componentes fibrilares. Nuevas microfibrillas y polímeros asociados son depositados en la superficie más interna de la pared celular, formando una red de fibras altamente estratificada y entrecruzada (Carpita y Gibeaut, 1993).

2 ANTECEDENTES DE LABORATORIO.

En el laboratorio se han identificado dos glicoproteínas localizadas en la fracción de pared celular de frijol, de 33 y 36 kilodaltones, denominadas p33 y p36 respectivamente. Ambas proteínas son reconocidas por anticuerpos policlonales obtenidos contra p33. A nivel de composición de aminoácidos ambas proteínas son semejantes, mas no idénticas. Estas proteínas se acumulan, en su forma soluble, en respuesta a déficit hídrico en el hipocotilo y la raíz de plántulas etioladas de frijol y en plantas adultas. Durante un estrés drástico se acumulan ambas, y durante un estrés paulatino se acumula principalmente p33 (Covarrubias et al, 1995),

También se ha observado la acumulación de estas proteínas en su forma soluble por tratamientos con ABA. La respuesta al estrés osmótico es específica, debido a que no se han encontrado evidencias de acumulación respuesta a daño ni por elicitores

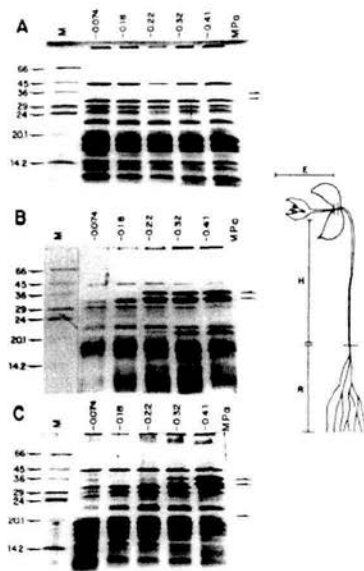


Figura 4. Patrones proteicos de extractos acídicos de tres diferentes regiones de plántulas etioladas de frijol: A) epicotilos, B) hipocotilos y c) raíz, sometidas a déficit hídrico. Tomado de Covarrubias et al, 1995. Las flechas indican a p33, p36.

HIPÓTESIS.

p33 y p36 son dos proteínas de pared celular, que participan en la respuesta de la planta al déficit hídrico, al contribuir a la modificación de la pared celular para una mejor adaptación a esta situación de estrés.

Las características bioquímicas, así como el patrón de acumulación de estas proteínas es información relevante, necesaria para entender su función.

3 OBJETIVO GENERAL.

Estudiar las características bioquímicas y los patrones de acumulación de éstas proteínas en condiciones óptimas de humedad y de estrés hídrico.

Objetivos particulares.

Diseñar una estrategia de purificación que permita el enriquecimiento de p33 y p36, con la finalidad de obtener microsecuencia de las mismas.

Determinar el punto isoeléctrico de p33 y p36, así como el peso molecular de p33 y p36 en forma nativa.

Determinar el patrón de acumulación de p33 y 36 en las diferentes regiones de crecimiento del hipocotilo.

Analizar su distribución en diferentes especies vegetales.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizó semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Negro Jamapa, la cual fue desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % (v/v)¹ durante 10 minutos y enjuagada abundantemente con agua des-ionizada. Las semillas se germinaron sobre papel absorbente húmedo, en condiciones de oscuridad en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 27 °C y una humedad relativa del 70 %. Una vez germinadas, las plántulas de cinco a ocho centímetros de longitud se transplantaron a vermiculita bien irrigada o en condiciones de sequía. Las plantas fueron regadas con agua a razón de 5 ml por gramo de vermiculita en el tratamiento de irrigación óptima (-0.8 bar), en tanto que la condición sequía se estableció con la octava parte de agua (-3.2 bar). La condición de déficit hídrico se mantuvo constante pesando diariamente las charolas y agregando agua hasta recuperar el volumen perdido por evaporación. Después de 72 horas, se cosechó y procesó el material vegetal. El mismo procedimiento se realizó para obtener el material de las variedades de frijol Negro-150, Michoacán 12-A-3, Cacahuete-72 y Flor de Mayo.

Las otras especies vegetales analizadas fueron maíz (*Zea mays* L.), algarrobo (*Prosopis*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis thaliana*. Los tratamientos aplicados a maíz y algarrobo fueron idénticos a frijol. Debido a las dimensiones de las plántulas de tabaco y *Arabidopsis* estas fueron sometidas a un estrés por deshidratación diferente. La semilla fue desinfectada como se describe previamente, y germinada sobre una malla de tela mantenida en condiciones óptimas de hidratación. Después de 4 días, las plántulas fueron colocadas bajo flujo de aire, manteniendo bien hidratada la raíz de las plántulas control, hasta que las plántulas perdieron el 30% de su peso fresco.

4.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS BÁSICAS.

El método usado en el laboratorio para enriquecer p36 y p33 es el reportado por Mazau *et al*, 1988, con algunas modificaciones. Este procedimiento, que consiste en un tratamiento

¹ A partir de una solución comercial al 6%.

ácido, se ha utilizado para purificar algunas proteínas de pared celular, dada la alta insolubilidad de estas.

El tejido (hipocotilo y raíz) se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron dos volúmenes/peso de solución de extracción para proteínas básicas, la mezcla se homogenizó y se dejó en agitación durante 48 horas a 4 °C.

Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos, en un rotor JA-14 a una temperatura de 4 °C. Tras recuperar el sobrenadante, las proteínas se precipitaron con 5 volúmenes de acetona absoluta fría (-20 °C) durante 24 horas. Las muestras se centrifugaron a 7500 rpm en rotor JS 7.5 durante 15 minutos. La pastilla se resuspendió en acetato de sodio 0.1M pH 4.5, a razón de 0.03 ml por gramo original de tejido.

Una vez extraídas, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford. Posteriormente, se procedió a la separación de las mismas en un gel discontinuo de poliacrilamida-SDS a una concentración del 12%, preparado de acuerdo al método descrito por Laemli (1970). La electroforesis se efectuó en geles de 8.2 x 7.3 x 0.15 cm a 100 volts, hasta que el frente de azul de bromofenol llegó a la base del gel (aprox. dos horas). A continuación el gel fue fijado en una solución 50% metanol-10% ac. acético glacial, durante dos horas. Se procedió a la tinción en solución de Azul de Coomassie al 0.15% w/v en solución fijadora, durante 15 minutos. El gel fue desteñido en una solución de 5 % metanol y 7 % ácido acético.

4.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La concentración de proteína se determinó por el método reportado por Bradford en 1976, usando un reactivo comercial. Para cada muestra se agregaron 800 µl de agua, 200 µl de reactivo de Bradford (BIO-RAD) y 3-5 µl de extracto. Para el blanco se agregaron 3 µl de 0.1M de acetato de NA pH 4, en sustitución del extracto. Transcurridos 5 min, las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una densidad óptica de 595 nm. La curva de calibración se hizo con seroalbúmina bovina (BSA) en un rango de 2 a 20 µg/ml.

4.3 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON SULFATO DE AMONIO.

Las proteínas precipitan específicamente a diferentes concentraciones de sulfato de amonio. El sulfato de amonio puede añadirse en forma de sal o bien a partir de una solución saturada, en el laboratorio se prefirió utilizar solución saturada. La solución saturada se preparó mezclando 767 g de sulfato de amonio en un litro de agua. Se agitó la solución

calentando ligeramente y una vez que la sal se disolvió por completo, fue filtrada (estando aún caliente), se dejó cristalizar por 12 h a 4 °C. Cuando se emplea solución saturada de sulfato de amonio (SSSA) el volumen a añadir se calcula mediante la siguiente fórmula.

$$V_a = \frac{C_i V_i - C_f V_i}{C_i - C_f}$$

V_a = volumen por añadir (sol. saturada de sulfato de amonio)

V_i = volumen inicial de la muestra

C_a = concentración de la solución por añadir (100%)

C_i = concentración inicial de la muestra

C_f = concentración final de la muestra

Se realizaron cortes de sulfato de amonio cada 10 unidades porcentuales. De acuerdo a la fórmula anterior se fue calculando el volumen de sulfato de amonio necesario para realizar cada corte.

Se midió el volumen total de extracto ácido y se calculó el volumen necesario de SSSA para precipitar al 10% de sulfato de amonio. La solución de sulfato de amonio se mezcló lentamente con la proteína, se mantuvo en agitación suave a 4 °C durante 30 min, enseguida se centrifugó a 10,000 rpm, durante 10 min. La pastilla se recuperó (ésta corresponde al corte de 10% de sulfato de amonio). Se midió el volumen recuperado del sobrenadante y se hicieron los cálculos para determinar el volumen de SSSA necesario para llevar la solución SSSA-proteína al 20% de sulfato de amonio, se procedió de igual manera que con el corte anterior, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se recuperó la pastilla (ésta corresponde al corte de 20% de sulfato de amonio) y así sucesivamente se fueron precipitando los sobrenadantes de 10 en 10 unidades porcentuales de sulfato de amonio hasta cubrir el 80% de saturación. Las pastillas fueron resuspendidas en 0.1M de acetato de Na pH 4.5, se separaron electroforéticamente para verificar su pureza. Las fracciones conteniendo a p33 y p36 se dializaron contra 200 volúmenes de 0.02 M de acetato de sodio pH 4.5, se concentraron a través de unidades de filtración marca Amicon y se reservaron para un posterior paso de purificación a través de una columna de intercambio catiónico (Cooper, 1977).

4.4 CROMATOGRAFÍA

4.4.1 Separación por intercambio catiónico.

En una columna de 2.5 ml de carboximetil-celulosa (CMC-32) previamente activada, la cual se equilibró en 0.02M de acetato de sodio pH 4.5, se cargó la proteína a una velocidad de flujo de 30 ml/h, la proteína se eluyó con 18 ml de un gradiente lineal de NaCl 0-1M en 0.02M de acetato de sodio pH 4.5. Se colectaron fracciones de 0.5 ml y se detectó la proteína haciendo experimentos tipo “western” a las mismas usando en anticuerpo anti-p33. Las fracciones conteniendo a p33 y p36 se mezclaron y dializaron contra 0.1M de acetato de amonio pH 4.5. Se concentraron utilizando centricon-30 (Amicon). Esta es la proteína que se utilizó para la separación en una columna de exclusión molecular Superdex-200.

La carboximetilcelulosa requiere ser activada, previo a su uso en cromatografía de intercambio catiónico. Es necesario tener precaución con esta resina ya que es muy frágil y se fragmenta fácilmente. Se incubaron 5 g de carboximetil celulosa en 100 ml de 1M de NaOH durante 2-5 min, se filtró. Se lavó con agua destilada 2 a 3 veces, se filtró nuevamente. Se incubó en 100 ml de 1M de HCl 2-5 min, se filtró. Se lavó con agua destilada 2 a 3 veces, se filtró. Una vez activada se equilibró en el buffer de trabajo, o bien se conservó en refrigeración con 0.005% de azida de sodio. Es importante la eliminación de partículas finas que puedan bloquear la columna e impidan la reproducibilidad de la cromatografía.

4.4.2 Separación en FPLC: columna Superdex-200.

La proteína obtenida por intercambio catiónico, fue concentrada y dializada. Se cargó en una columna de exclusión molecular SUPERDEX-200 de Pharmacia LKB. La columna se equilibró en 0.1M de acetato de sodio pH 4.5, 0.1M de NaCl, la muestra se eluyó a una velocidad de flujo de 1ml/min. Se colectaron fracciones de 1ml y la proteína se monitoreó haciendo experimentos tipo “western” a las fracciones usando el anticuerpo anti-p33. Las fracciones conteniendo a p33 y p36 fueron mezcladas, se dializaron contra 0.1M de acetato de sodio pH 4.5, y se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

4.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Dada la dificultad para obtener material de algunas de las especies diferentes a frijol, seguimos el método descrito por Hurkman y Tanaka (1986) el cual se describe a continuación con algunas modificaciones.

Un gramo de tejido se maceró con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino y se homogeneizó en 5 ml de solución amortiguadora de extracción. Se transfirió la suspensión a tubos Corex de 30 ml e incubaron a 4 °C, 10 minutos. Se agregó un volumen igual de fenol (saturado en agua) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 7000 rpm en el rotor HB4 durante 10 minutos. Se recuperó la fase fenólica. Se re-extrajo con un volumen igual de solución amortiguadora de extracción y se centrifugó nuevamente a 7000 rpm durante 10 minutos. Se separó nuevamente la fase fenólica, se midió el volumen y se colocó en tubos limpios. De cada muestra se separaron alícuotas de 100 µl en tubos para microcentrifuga, para cuantificación de proteína, a partir de aquí ambas tubos para cada muestra se procesan igual. Las proteínas se precipitaron durante toda la noche con cinco volúmenes de 0.1M de acetato de amonio en metanol a -20 °C. Se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 minutos. La pastilla formada se lavó tres veces con la misma solución de precipitación y una vez con acetona 80% y se dejó secar al vacío. Las pastillas de la alícuota se resuspendieron en 1 ml de NaOH 0.1M y se cuantificó la proteína por el método de Lowry. El resto de las pastillas se resuspendieron directamente en buffer de muestra Laemli 1X a una concentración conocida de 5 µg/µl.

4.5.1 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

Se siguió la metodología reportada por Cheif y Wensink (1981), con algunas modificaciones. Este método de cuantificación de proteínas fue reportado por Lowry *et al* en 1951. Un volumen conocido de proteína se llevó a 100 µl con NaOH 0.1M, se añadió un mililitro de CTC se mezcló y dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de reactivo de fenol diluido 1:1 en agua y se agitó vigorosamente 10 segundos. Después de 30 minutos en reposo se leyó la absorbancia a una densidad óptica a 650 nm. La curva de calibración se hizo con BSA en un rango de 10 a 100 µg/ml, y se elaboró ajustando la concentración conocida a un volumen de 100 µl con NaOH 0.1M y se procesó igual que las muestras.

4.6 Experimentos tipo “WESTERN”.

Las muestras de proteína se separaron electroforéticamente. El gel se equilibró en agitación con solución amortiguadora de transferencia (BT) durante 30-60 minutos. Se colocó un magneto en el fondo de la cámara de transferencia y se llenó con BT. Los soportes de gel para transferencia se armaron en el orden siguiente: sobre la esponja del lado negro se colocó

un papel filtro (Whatman 3MM), sobre este se colocó el gel previamente equilibrado, en seguida y evitando la formación de burbujas, se colocó la membrana de transferencia (Immobilon P, Millipore) humedecida previamente en metanol y equilibrado 10 minutos en BT, por último se coloca otra pieza de papel filtro y la otra esponja, cerrando cuidadosamente el soporte.

Se introdujo el soporte en la cámara de transferencia. Se transfirió toda la noche a 300 mA de corriente constante. Las proteínas migran del polo negativo al positivo por lo que el lado negro del soporte deberá conectarse al polo negativo.

Concluida la transferencia se desarmó el soporte y se marcó la orientación del gel en la membrana de transferencia y se procedió a la detección de las proteínas vía substratos cromogénicos.

4.6.1 Detección del antígeno.

Se siguió un protocolo estándar para la detección de la proteína, usando una dilución 1:2000 del anticuerpo policlonal anti-p33 (ver abajo).

Bloqueado. 30 min. a temperatura ambiente, con 5% de leche descremada en buffer tris salino tween (TBST).

Enlace del anticuerpo primario. 30 minutos a temperatura ambiente o bien a 4 °C toda la noche en una dilución 1:2000 en solución bloqueadora. Se lavó en TBST tres veces, 5-10 minutos cada una.

Enlace del segundo anticuerpo. La membrana de transferencia se incubó en el segundo anticuerpo, anti-conejo IgG-AP conjugado, (dilución 1:2,000 en solución bloqueadora) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó tres veces en TBST, 5-10 minutos cada una. Mientras se lava la membrana, se prepara la solución de substratos de la fosfatasa alcalina (NBT/BCIP).

Detección cromogénica de los complejos. La membrana se secó ligeramente con papel filtro 3MM y se colocó en la solución de substratos el tiempo necesario para observar el color morado de la reacción, aproximadamente 5 minutos. Una vez que se observa la coloración, la reacción se detiene enjuagando abundantemente en agua, se seca la membrana y se toma el registro fotográfico.

4.7 INMUNO HISTOQUIMICA

4.7.1 Impresiones de tejido.

Las impresiones de tejido se hicieron siguiendo la metodología reportada por Cassab y Varner, 1987. El material vegetal se preparó de acuerdo a Covarrubias *et al* (1995). Con una navaja nueva de doble filo se hicieron cortes transversales de 1mm de grueso a hipocotilos de plántulas de frijol, tomando cuidadosamente los cortes con una pinzas se colocaron sobre hojas de nitrocelulosa tratadas con CaCl_2 , protegiendo con un trozo de papel encerado se presionó con el dedo durante unos 30 segundos. El corte de hipocotilo fue retirado, las membranas se secaron al aire y fueron tratadas para detectar p33 y p36 usando el anticuerpo anti-p33. En todo momento se emplean guantes para evitar contaminar tejido y membranas. Las hojas de nitrocelulosa fueron incubadas previamente en 0.2M de CaCl_2 durante 30 min y secadas al aire.

4.7.2 Electroelusión de proteínas.

Previo al diseño de la estrategia de purificación con el fin de obtener anticuerpos, y hacer parte de la caracterización bioquímica, se procedió a la electroelusión de ambas proteínas utilizando una cámara de electroelusión marca ISCO, la cual permite la recuperación de biomoléculas como proteínas, RNA y DNA. Se hicieron geles preparativos con muestras enriquecidas en p33 y p36, los cuales se sometieron a tinción rápida no fijativa con azul de coomassie y fueron desteñidos como se describe previamente. Las bandas de proteína se cortaron y lavaron abundantemente en agua destilada a 4 °C. Una vez lavadas se incubaron toda la noche a 4 °C en el siguiente buffer de elusión: buffer de corrida 0.1X 500 µl más 125 µl SDS 10%. Los trozos de acrilamida conteniendo la proteína se colocaron en la cubeta de muestra de la cámara, el reservorio se llenó con más buffer de elusión, y el tanque de la cámara se llenó con buffer de corrida. Es importante colocar cuidadosamente las membranas para evitar fugas y pérdida de la muestra. La muestra se corrió a 3 watts constantes, cada 30 min se recuperó la proteína acumulada en el depósito, esto se repitió las veces necesarias hasta que dejó de verse azul de coomassie en las bandas de acrilamida. Las proteínas migran del polo positivo al negativo. La proteína se puede almacenar a -20 °C.

4.7.3 Obtencion de anticuerpos.

La proteína electroeluída fue aplicada por inyección subcutánea en tres aplicaciones de 50 µg c/u con adyuvante de Freund's, a intervalos de dos semanas cada uno a un conejo

hembra Nueva Zelanda. Una semana después de la segunda inmunización se sangró por punción intravenosa para monitorear el título del anti-suero. Se hicieron dos refuerzos más a intervalos de dos semanas y se procedió al sangrado del conejo por punción cardiaca. La sangre se dejó coagular a 4 °C toda la noche y al día siguiente se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. El suero se alicuotó y guardó a -20 °C para su posterior utilización.

4.7.4 Purificación de anticuerpos por inmunoafinidad.

Para verificar la especificidad del antisuero anti-p33, se purificó por inmunoafinidad, siguiendo la metodología reportada por Olmsted (1981). Esencialmente se procede como en un "western" normal con algunas excepciones. Una corrida preparativa de proteínas básicas fueron transferidas a inmobilón P, bloqueada 1 h a 37 °C en TBT con 0.25 % de gelatina. Se incubó toda la noche con una dilución 1:500 de anti-p33, se lavó. Un carril fue cortado de la membrana e incubado con el segundo anticuerpo y revelado contra sustratos cromogénicos. Este trozo de membrana se empleó para definir la migración de p33 en la membrana restante. Se recortó la porción de membrana correspondiente a p33. Los anticuerpos específicos fueron eluidos de la membrana incubando en 3 volúmenes de 0.2 M de glicina pH 2.3 durante 2 minutos en hielo. La solución fue neutralizada por adición de 1 volumen de tris base 1M y dializada contra TBS. Esta preparación del anticuerpo se usó directamente para la inmunodetección de proteínas relacionadas a p33 y p36 en otras especies vegetales.

4.8 MICROSECUENCIA.

Muestras de proteína parcialmente purificada (fracciones obtenidas de la Superdex-200) se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida-SDS cargando aproximadamente 2 µg por carril de cada banda (referida a un estándar de albúmina bovina teñido con azul de coomassie). Una vez teñido el gel con azul de coomassie se procedió a cortar las bandas correspondientes a p33. Estas se lavaron en 1 ml de acetonitrilo 50 % y dos veces con 1 ml de agua milli-Q, se decantó el exceso de agua y se congelaron las bandas. Estas bandas fueron enviadas para su secuencia a Harvard Microchem (Cambridge MA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

5.1.1 Purificación de p33 y p36.

El esquema de la Figura 5 presenta de manera general el protocolo de purificación diseñado para obtener p33 y p36 con el mayor grado de pureza. En los párrafos siguientes se describe cada uno de los pasos de purificación que en la misma se señalan.

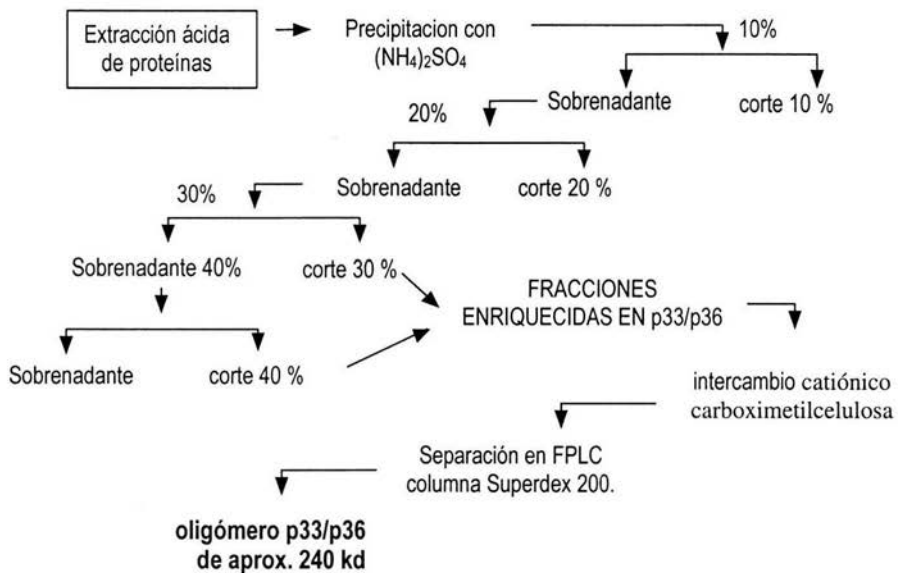


Figura 5. Diagrama de flujo que señala los diferentes pasos de purificación a que fueron sometidas las proteínas básicas de frijol sometido a déficit hídrico.

5.1.1.1 Precipitación con sulfato de amonio

Se obtuvo el material vegetal de acuerdo a Covarrubias *et al* (1995). Una vez obtenido el material vegetal éste se sometió a una extracción ácida, como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos obtenidos fueron sometidos a un fraccionamiento diferencial con sulfato de amonio, precipitando con concentraciones crecientes a partir de una solución saturada. Al analizar los patrones electroforéticos de cada corte, p33 y p36 mostraron un fuerte

enriquecimiento en las fracciones correspondientes al 30% y 40% de sulfato de amonio (Fig. 6). Estas fracciones fueron dializadas contra 400 volúmenes de acetato de Na 0.02M, pH 4.5 y analizadas en geles de poliacrilamida-SDS.

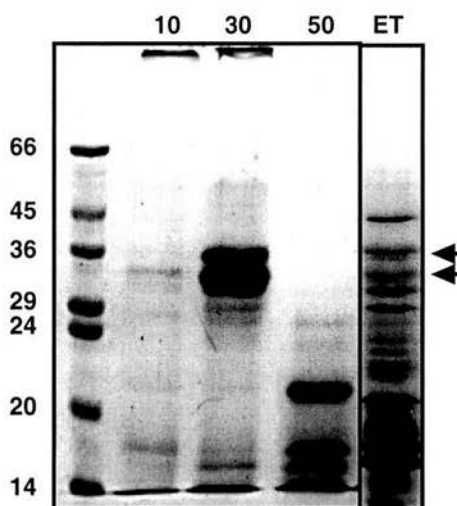


Figura 6. Fraccionamiento diferencial con sulfato de amonio, a la izquierda se señalan los marcadores de peso molecular. En la parte superior la concentración de sulfato de amonio a que corresponde cada carril. Las puntas de flecha señalan a p33 y p36. ET, extracto total, corrida representativa de un extracto ácido completo, previo al fraccionamiento.

5.1.1.2 Separación por intercambio catiónico.

Dado que el fraccionamiento con sulfato de amonio dio como resultado una muestra aún muy compleja, se procedió a una separación en una columna de intercambio catiónico. Las fracciones correspondientes al 30-40 % de sulfato de amonio se dializaron y pasaron a través de una unidad de filtración (centrífuga-30, marca Amicon, límite de exclusión de 30,000 da). Esta muestra fue cargada a una columna de 2.5 ml, con carboximetil celulosa (CM32) previamente activada y equilibrada como se detalla en Materiales y Métodos. La columna se empacó con auxilio de una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 30 ml/h. Una vez cargada la muestra se lavó la columna con 10 ml de buffer, y se procedió a eluir la proteína con 18 ml de un gradiente lineal de 0-1.0 M de NaCl en acetato de Na 0.02 M, pH 4.5.

Después de separar las diferentes fracciones en geles de poliacrilamida-SDS, se observó que p33 y p36 coeluyen a una concentración de 0.3-0.4M de NaCl (Figura 7.)

La pureza de las muestras se verificó por análisis con geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de coomassie. Como se aprecia en la Figura 7 aún se obtuvo un mayor enriquecimiento de las proteínas de interés, sin embargo, este paso de purificación no fue eliminado debido a que en una electroforesis 2D de la fracción 30-40% de sulfato de amonio, se detectó la presencia de una proteína de 33 kDa, cuyo pI es ácido y es reconocida por los anticuerpos anti-p33.

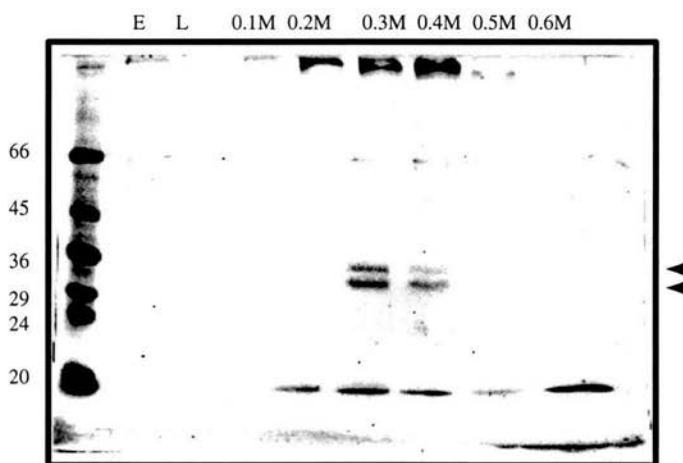


Figura 7. Fracción enriquecida de p33 y p36, a partir de una columna de intercambio catiónico. Gel de poliacrilamida SDS teñido con azul de coomassie. Se utilizó como eluyente NaCl, en acetato de Na 0.02M pH 4.5. Las concentraciones de NaCl se señalan en cada carril. Las flechas indican la posición de p33 y p36, a la derecha se indican los marcadores de peso molecular. E, eluado; L, lavado.

Las fracciones conteniendo p33 y p36 se recolectaron y dializaron contra 400 volúmenes de acetato de Na 0.1 M pH 4.5 y, posteriormente, se concentraron a través de centrífuga 30. La muestra de proteína así tratada se empleó para pasos posteriores de purificación en cromatografía líquida de baja presión.

5.1.1.3 Separación por cromatografía líquida de baja presión.

Debido al ligero enriquecimiento alcanzado con la cromatografía de intercambio catiónico y a la pequeña diferencia en peso entre las dos proteínas de interés decidimos emplear una columna de exclusión molecular con el objeto de separar a p33 y p36, una de la otra, así como del resto de las proteínas presentes en la fracción proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico.

Una fracción enriquecida mediante cromatografía de intercambio catiónico fue cargada en una columna de exclusión molecular en cromatografía líquida de baja presión, Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) cuyo rango de exclusión es de 3 a 75 kDa. Contrario a lo esperado en base al peso molecular de las proteínas de interés, al analizar las fracciones p33 y p36 se encontraron en el volumen de exclusión. Esto llevó a sugerir que p33 y p36 se encontraban interactuando en un oligómero del alto peso molecular. El empleo de esta columna se descartó y fue necesario el empleo de una columna de exclusión molecular con un rango de exclusión más amplio (los datos no se muestran).

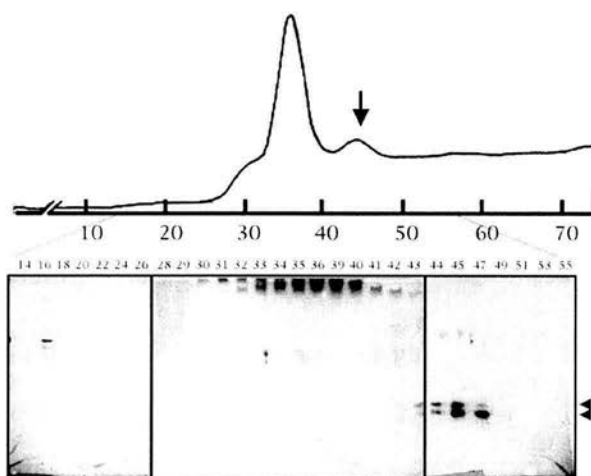


Figura 8. Cromatograma obtenido al inyectar una fracción enriquecida de p33 y p36 en una columna de exclusión molecular Superdex 200. En el eje x se indican los números de fracciones. Eluyente: 0.1M NaCl, 0.1M acetato de Na pH4.5. Velocidad de flujo 1 ml/min. Las flechas indican la posición de p33 y p36. Abajo del cromatograma se ve el patrón electroforético de muestras representativas de cada fracción.

Nuevamente se procedió a inyectar una fracción enriquecida en carboximetilcelulosa, a través de otra columna de exclusión molecular Superdex 200 (Pharmacia), con un rango de resolución de 3 a 600 kDa. La presencia de la proteína se rastreó haciendo "dot blot" de las fracciones obtenidas empleando el anticuerpo anti-p33. El pico correspondiente a p33 y p36 se señala en el cromatograma de la Figura 8; ahí mismo se observa la separación electroforética de algunas de las fracciones obtenidas a lo largo de la columna. Se puede apreciar el grado de pureza obtenido para ambas proteínas, así como su co-purificación en todos los pasos de purificación previos.

Las fracciones conteniendo p33 y p36 se dializaron, concentraron y separaron en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de coomassie, para verificar la pureza.

La Figura 9 muestra fracciones representativas de los diferentes pasos de purificación de p33 y p36, así como el grado de pureza obtenido. Como se aprecia, con la fracción obtenida de la columna Superdex-200 finalmente se logró obtener una fracción de p33 y p36 libre de otras contaminantes, aunque estas continúan copurificando. Esta fracción fue utilizada para llevar a cabo la caracterización funcional de estas proteínas (García – Gómez et al, 2000).

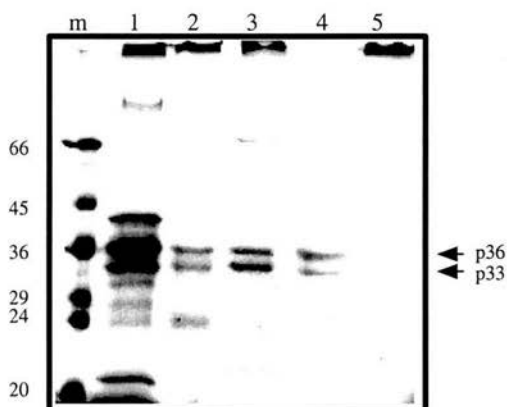


Figura 9. Gel de acrilamida-SDS, al 12%, conteniendo fracciones representativas de los diferentes pasos de purificación de p33 y p36, a partir de extractos ácidos obtenidos de plántulas etioladas de frijol sometidas a sequía. m, marcadores de peso molecular en kDa (1), proteínas básicas. (2) fracción enriquecida con 30-40% de sulfato de amonio. (3) fracción obtenida a partir de una columna de intercambio catiónico (cmc 32) y eluida con 0.3 M de NaCl. (4) Fracción obtenida de la columna de exclusión Super Dex 200 conteniendo a p33 y 36. (5) Fracción obtenida de la columna de exclusión Super Dex 200 que no contiene a p33 y p36.

A partir de un análisis densitométrico con el programa “Diversity One”, se determinó el porcentaje de enriquecimiento de p33 y p36 en cada una de las fracciones obtenidas durante los diferentes pasos de purificación. En la Tabla 1 se detalla el rendimiento de p33 y p36 obtenido en cada paso de purificación. En el extracto ácido la abundancia relativa de p33 y p36 es de 5 %, en la fracción de 30-40 % de sulfato de amonio, p33 y p36 constituyen el 48%; la fracción obtenida a partir de la carboximetilcelulosa está integrada por el 70% de p33 y p36. El último paso de purificación a partir de una columna de exclusión molecular Superdex-200,

la fracción contiene más del 90% de p33 y p36. En esa misma tabla, los datos de rendimiento de proteína por gramo de tejido indica la escasa abundancia en un extracto total, de las proteínas purificadas en este trabajo.

Tabla 1. Rendimiento de proteína en las diferentes fracciones.

Fracción proteica	Rendimiento ^a	% de p33 y p36 ^b
Extracto total	1.81	ND
Extracto ácido	0.03	5
30-40 (NH ₄) ₂ SO ₄	-----	48
(CMC52) ^c	-----	≈ 70
Superdex 200	-----	≈ 90

^a mg de proteína/g de tejido; ^b en cada fracción; ^c intercambio catiónico con carboximetilcelulosa.

5.1.2 Composición de aminoácidos y secuencia parcial.

Como se reportó previamente (Covarrubias *et al.*, 1995), p33 y p36 son dos glicoproteínas que tienen relación inmunológica entre sí, son similares a nivel de composición de aminoácidos y con el extremo amino terminal bloqueado. Estas proteínas son resistentes a la proteólisis, como lo indicaron los intentos de digestión sin éxito, por varios métodos y con diversas proteasas.

Para poder obtener una secuencia interna de la proteína, se procedió a purificar p33 y p36 como se describe en la sección 5.1 (ver Materiales y Métodos para más detalle). Las bandas separadas electroforéticamente se trataron como se indica en Materiales y Métodos y se enviaron para su microsecuencia a Harvard Microchem (Cambridge, MA).

Los resultados obtenidos del análisis de la composición de aminoácidos mostraron diferencias con los reportados (Covarrubias *et al.* 1995), como se puede ver en la Tabla 2. Las diferencias fundamentales consisten en el contenido de glicina, ac. glutámico y glutamina, cuyos valores son considerablemente menores con respecto a los valores obtenidos previamente, así como valores más altos para prolina, valina y lisina.

Además de la composición de aminoácidos se obtuvo la secuencia de un péptido de 20 aminoácidos, el cual corresponde al decámero **PPVEKPPVYK** que en reiteraciones perfectas constituye las proteínas ricas en prolina de soja PRP1 Y PRP2.

Recientemente se reportaron (Colmenero et al 1997) dos genes de frijol, inducidos por sequía, que codifican para proteínas con características similares.

Tabla 2. Composición aminoácida de p33.

Aminoácidos ^a	PRP2 soya ^b	p33 ^c	p33 ^d
	mol %		
Pro	19.0	20.3 ^c	9.68 ^c
Hyp	16.8	ND ^c	ND ^c
Lys	14.8	18.4	9.68
Val	14.7	19.3	6.92
Tyr	7.4	7.7	4.84
Ser	1.4	3.2	7.95
His	0.4	0.9	1.38
Glx	9.8	9.0	12.45
Ile	1.9	1.3	1.73
Thr	1.3	2.5	2.76
Gly	2.9	8.8	15.91
Asx	3.9	2.2	7.61
Leu	1.0	2.4	5.19
Arg	0.8	0.7	6.22
Met	0.2	-	0.8
Phe	0.3	0.9	2.12
Ala	3.0	2.3	5.19

^a: Asx=Asn and Asp; Glx= Gln and Glu. ^b:PRP2 de soya Kleis-San Francisco and Tierney (1990)

^c: Composición obtenida en 1997, por Harvard Microchem. ^d: Covarrubias *et al* (1995)

^e: Hidroxiprolina es una modificación postraduccional de prolina y requiere una determinación específica.

La secuencia obtenida es consistente con el contenido de valina y lisina, cuya concentración molar (Tabla 2) es semejante. Sin embargo, el contenido de prolina debiera ser dos veces el contenido de valina y lisina, este hecho no es concluyente ya que el contenido de hidroxiprolina no fue determinado y una porción considerable del contenido de prolina en la pared celular está modificado.

En la Tabla 2, se muestra una comparación de la composición de aminoácidos entre p33 y PRP's de soya. A diferencia de las PRP's de soya, p33 tiene un alto porcentaje de otros

aminoácidos, lo que nos hace suponer que p33 está integrada en un alto porcentaje de su cadena por repetidas del dominio PPVEXK.

5.1.3 Determinación del estado oligomérico.

Dado que al utilizar una columna de exclusión molecular con una resolución de 3 a 70 kDa, p33 y p36 eluyeron en el volumen de exclusión, se sugirió que p33 y p36 podrían estar interactuando para formar un oligómero de peso molecular desconocido (ver sección 5.1). Para precisar lo anterior, nos dimos a la tarea de determinar el peso molecular del oligómero de p33 y p36 en condiciones nativas.

Se siguió un procedimiento estándar para determinar el peso molecular del oligómero, con el empleo de marcadores nativos y determinando el coeficiente de retardamiento de éstos y de p33 y p36, (Bolletín Sigma MKR 137).

Una fracción enriquecida con sulfato de amonio al 30% se sometió a electroforesis nativa. Como se aprecia en la Figura 10 ambas proteínas migran a un peso molecular alto, y lo mismo ocurrió con proteínas electroeluidas corridas bajo las mismas condiciones electroforéticas.

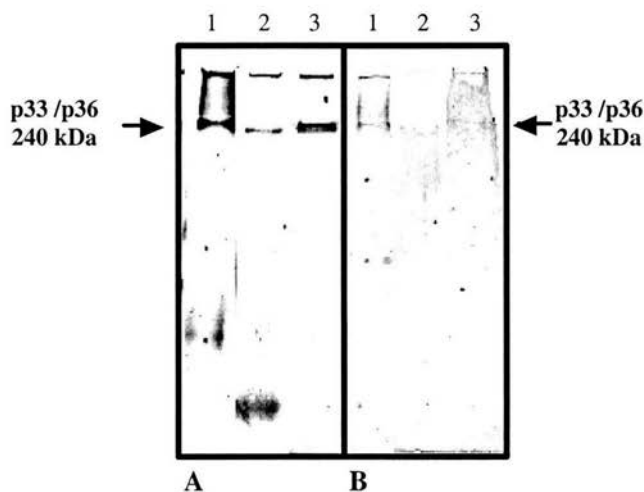


Figura 10. Estado oligomérico de p33 y p36 en condiciones nativas. A, gel al 7% de acrilamida conteniendo una fracción enriquecida con 30% de sulfato de amonio (1), p33 y p36 purificadas por electroelusión (2 y 3 respectivamente). B, western blot usando anti p33 dil. 1:200, el oligómero esta indicado con la flecha.

Se encontró que p33 y p36 interactúan entre sí formando un oligómero de alto peso molecular (figura 10, carril 1A y 1B). Si bien la fracción de proteína utilizada para este ensayo no fueron p33 y p36 purificadas a homogeneidad, los carriles 2A, 3A, 2B y 3B en los que se empleó proteína electroeluida (ver Materiales y Métodos), el corrimiento electrofrético es semejante.

Separando las proteínas a diferentes concentraciones de acrilamida, se calculó el peso molecular del oligómero. La Figura 11 muestra el gráfico obtenido y la ecuación lineal a partir de la cual se determina que el oligómero p33 y p36 tiene un peso molecular de 240 kDa.

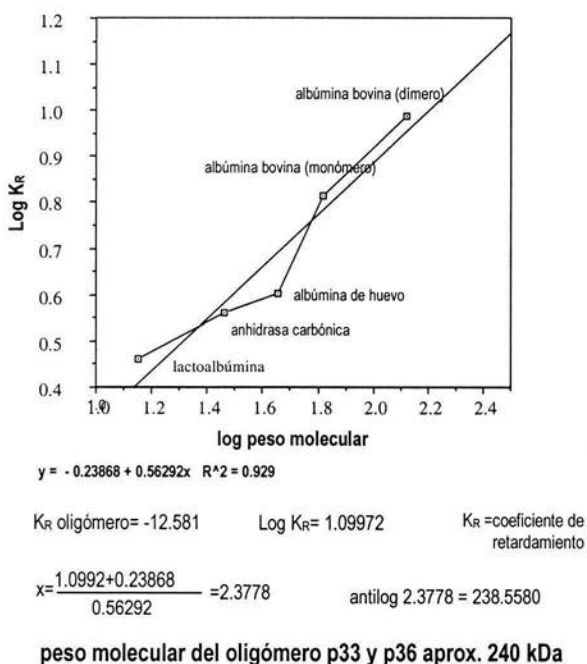


Figura 11. Curva de calibración obtenida a partir de marcadores de peso molecular nativos, por medio de la cual se estima el peso molecular del oligómero p33 y p36 en función del coeficiente de retardamiento del oligómero.

Este resultado es corroborado por los datos obtenidos a partir de la columna de exclusión molecular Superdex 200 en la que empleando marcadores de peso molecular se determinó que p33 y p36 eluyen en un hombro que corresponde a 240 kDa (Figura 12). De lo anterior y considerando el peso molecular de ambas proteínas sugerimos que p33 y p36 son capaces de formar un posible hexámero.

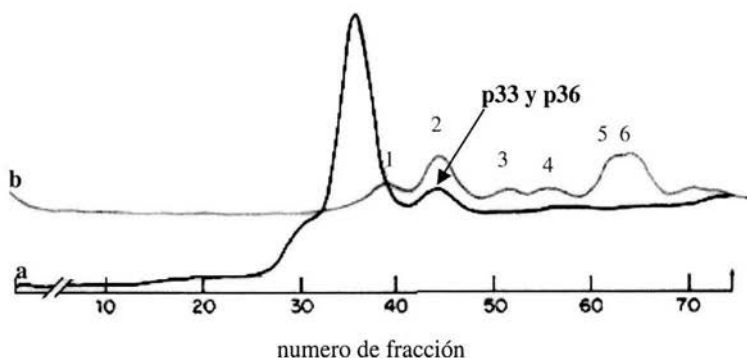


Figura 12. Cromatograma obtenido al inyectar una fracción enriquecida de p33 y p36 (a) en una columna de exclusión molecular Superdex 200. b, marcadores de peso molecular: 1, 450 Kda; 2, 240 Kda; 3, 158 Kda; 4, 68 Kda; 5, 45 Kda; 6, 25 y 12.5 KDa. La flecha indica la posición de p33 y p36.

5.1.4 Estimación del punto isoeléctrico (pI) de p33 y p36.

5.1.4.1 Separación de p33 y p36 a partir de geles catiónicos.

Se siguió la metodología reportada por Thomas y Hodes (1981). Este es un protocolo especial para proteínas muy básicas, se basa en que a pH 6.8 las proteínas con pI alto migran hacia el cátodo. Básicamente se trata de un gel reductor no desnaturizante (ver Materiales y Métodos para mayor detalle). Muestras de proteína enriquecida fueron cargadas en un gel catiónico al igual que marcadores de punto isoeléctrico.

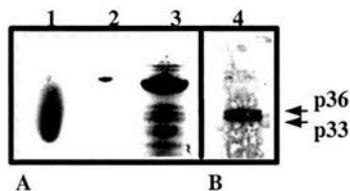


Figura 13. Gel catiónico. A, gel teñido con azul de coomassie. B, western blot usando anti-p33 dil 1:2000. Carril 1, marcador pI 6.8-7.2 (mioglobina); 2, marcador pI 8.6 (lentil lectin); 3 y 4 proteínas básicas de frijol negro jamapa sometido a sequía. La flecha señala el doblete correspondiente a p33 y p36.

Como se muestra en la Figura 13, la migración relativa de ambas proteínas se encuentra a una distancia intermedia entre los marcadores utilizados (mioglobina y lentil lectina). Este experimento confirma la naturaleza bioquímica de p33 y p36 e indica que se trata de proteínas básicas.

5.1.4.2 Estimación del pI de p33 y p36, a partir de geles de doble dimensión a no equilibrio.

Si bien existen diversas metodologías para la estimación y determinación del punto isoeléctrico de las proteínas, inicialmente se hizo una doble dimensión a equilibrio en la que se logró abrir un gradiente de pH de 5.6 a 7.9, y se encontró que p33 y p36 no enfocan dentro del gel (los datos no se muestran), por lo cual se siguió la metodología para geles de doble dimensión a no equilibrio de acuerdo a Ausubel 1994, con algunas modificaciones. En la Figura 14, se muestra a p33 y p36 cuyo pI estimado de acuerdo a la migración relativa de marcadores de punto isoeléctrico, es similar entre ellas, y superior a 9.3.

Como se sabe, no es posible determinar punto isoeléctrico a partir de geles a no equilibrio; debido precisamente a esa condición, el gradiente de pH no se estabiliza y por lo tanto las proteínas nunca encuentran su carga neta.

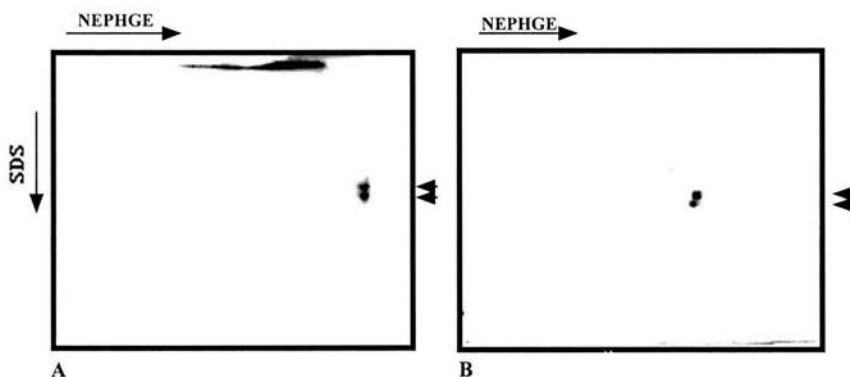


Figura 14. Electroforesis bidimensional a no equilibrio. El panel A es un gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de coomassie y el panel B el western blot utilizando anti-p33 como primer anticuerpo y anti-conejo de cabra acoplado a fosfatasa alcalina, como segundo anticuerpo.

5.1.5 CONCLUSIONES

Se diseñó una estrategia que ha permitido purificar a homogeneidad a p33 y p36, y tener algunos avances en la caracterización de dichas proteínas.

p33 y p36 tienen propiedades similares por ello no fue posible purificar cada una de ellas de manera independiente.

De acuerdo a la estimación realizada a partir de electroforesis bidimensional a no equilibrio, p33 y p36 poseen un punto isoeléctrico mayor a 9.3.

p33 y p36 interactúan entre sí formando un oligómero de ≈ 240 kDa.

La secuencia parcial obtenida de p33, corresponde a un péptido altamente conservado en las PRP's de soya.

La composición de aminoácidos de ambas proteínas revela que son similares, pero no idénticas.

5.2 INMUNOCARACTERIZACION DE p33 y p36

5.2.1 Producción de anticuerpos y purificación por inmunoafinidad.

Con la finalidad de tener una mejor herramienta para realizar parte de la caracterización de p33 y p36, procedimos a obtener anticuerpos policlonales. Se inmunizó un conejo Nueva Zelanda hembra con 50 µg de p33 purificada por electroelusión (ver Materiales y Métodos para más detalle), emulsificada en adjuvante completo, con dos refuerzos más de 50 µg de proteína cada uno. Después del segundo refuerzo se tomó muestra sanguínea, la cual se tituló. Puesto que el título obtenido fue aceptable, se procedió al sangrado del conejo, obteniéndose 25 ml de suero específico para p33 y p36, según ensayos de titulación.

En la Figura 15 se muestra la titulación del suero anti-p33, la detección de p33 y p36 es altamente específica, pese a que en el extracto ácido existen al menos seis proteínas glicosiladas (Covarrubias *et al*, 1995), que podrían ser reconocidas inespecíficamente. Como se observa, se logró la obtención de anticuerpos de calidad, con una alta especificidad por p33 y p36.

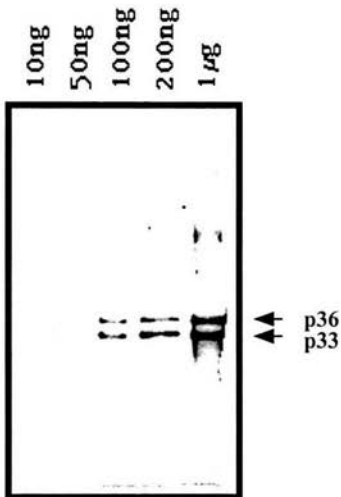


Figura 15. Titulación del anticuerpo anti-p33. Se transfirió un extracto de proteínas básicas de frijol negro Jamapa sometido a sequía. La cantidad de proteína se indica en cada carril. Las flechas señalan a p33 y p36. Se utilizó una dilución 1:2000 del anticuerpo anti-p33, usando anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo.

5.2.1.1 Purificación de anticuerpos por inmunoafinidad.

El antisuero obtenido fue purificado, con el objetivo de efectuar una localización más específica de proteínas relacionadas a p33 y p36 en otros géneros vegetales (ver siguiente apartado). Se siguió la metodología descrita en Materiales y Métodos, que consiste en la

transferencia del antígeno a una membrana de PVDF y elusión de anticuerpos con glicina ácida, el anticuerpo así purificado se usa directamente. Como se reportó previamente (Covarrubias et al 1995), existe relación antigénica entre p33 y p36, ya que el anticuerpo obtenido contra p33 reconoce a p36. En la Figura 16 se muestra un experimento de competencia en el cual el antisuero purificado se incuba con p33 haciendo evidente la relación antigénica que existe entre ambas proteínas.

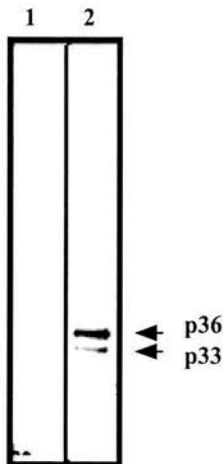


Figura 16. Western blot utilizando 1 μ g de proteínas básicas por carril. 1, membrana incubada con anticuerpo purificado por inmunoafinidad y competido una noche con p33 inmovilizada en PVDF. 2, membrana incubada con anticuerpo purificado por inmunoafinidad. Se utilizó anticuerpo de conejo acoplado a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. Las flechas señalan a p33 y p36.

5.2.2 Análisis de polipéptidos relacionados inmunológicamente a p33 y p36 en diferentes géneros vegetales.

Con el objeto de determinar la distribución de p33 y p36 en diferentes especies vegetales, nos dimos a la tarea de localizar proteínas relacionadas inmunológicamente a p33 y p36 en otros géneros vegetales. Las especies seleccionadas fueron tabaco, *Arabidopsis thaliana*, maíz y algarrobo.

Se obtuvieron proteínas totales de plántulas etioladas sometidas a sequía, se separaron electroforéticamente y se sometieron a detección en experimentos "tipo western" utilizando anticuerpos anti-p33 purificados por inmunoafinidad.

En la Figura 3 se muestran las proteínas relacionadas inmunológicamente a p33 y p36 en todas las especies vegetales analizadas. Sin embargo, los polipéptidos relacionados difieren en peso molecular (≈ 60 kDa) como se observa en tabaco y *Arabidopsis*. En maíz se observan

dos polipéptidos del mismo peso molecular a los detectados en tabaco y *Arabidopsis* polipéptidos relacionados únicamente en coleoptilo y no en raíz. El caso del algarrobo es interesante ya que al parecer se acumulan dos polipéptidos de ≈ 60 kDa y dos proteínas de ≈ 33 y 36 kDa.

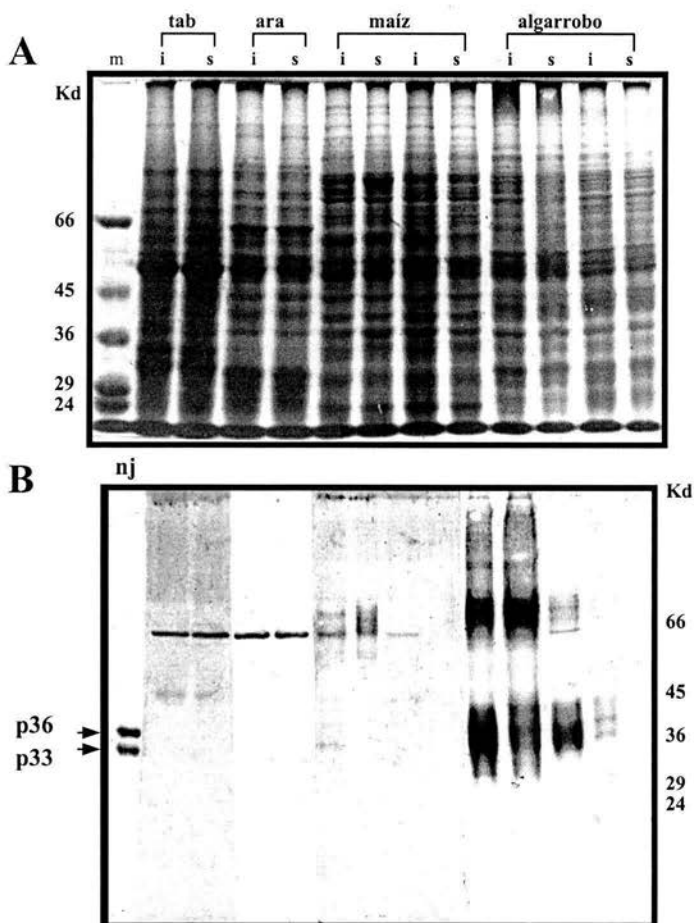


Figura 17. Proteínas relacionadas a p33 y p36 en otros géneros vegetales. A, gel teñido con azul de coomassie, conteniendo. B. Experimento tipo "Western" utilizando anti-p33 purificado por inmuno-afinidad, (i) irrigada; (s) sequía, (m) marcadores de peso molecular, (nj) 500 ng de proteínas básicas de frijol Negro Jamapa, como control positivo. 20 μ g /carril de proteínas totales.

En todos los casos no parece haber relación entre la acumulación de los polipéptidos relacionados y el tratamiento de sequía, esto puede deberse al hecho de que durante la germinación o durante el desarrollo del experimento aún cuando se tomaron todas las medidas necesarias para mantener las condiciones adecuadas, pudieran haber sido sometidos a estrés hídrico o bien a que en estas especies vegetales desempeñan funciones diferentes a frijol.

Aún cuando la secuencia interna obtenida de p33 (Sección 5.1) corresponde a proteínas ricas en prolina, resultaba de primordial importancia determinar la presencia de proteínas relacionadas inmunológicamente a p33 en soya. Sin embargo, desafortunadamente las semillas de soya disponibles no fueron de la calidad requerida, por lo que este experimento no se llevó a cabo.

5.2.3 Análisis de polimorfismo de p33 y p36 en otras variedades de frijol.

En trabajos previos (Hernández, 1994), se identificaron polipéptidos relacionados a p33, en otras variedades de frijol, en los que se observó cierto polimorfismo de tales proteínas entre las diferentes variedades. Aquí se muestra un experimento tipo “western” de extractos totales de diferentes variedades de frijol sometidos a sequía, en los que se observa claramente la diferencia en peso molecular de los polipéptidos relacionados, dependiendo de la variedad. Como se aprecia en la Figura 18, la variedad negro 150 acumula dos polipéptidos de ≈ 35 y 37 KDa. En tanto que las otras variedades solo un polipéptido de 33 kDa, a diferencia de Negro Jamapa en que tenemos a p33 y p36

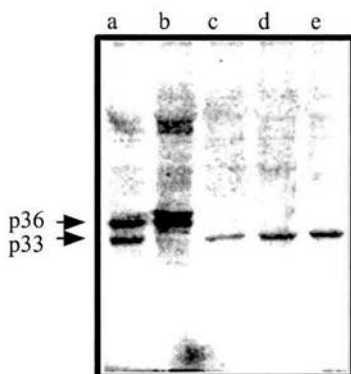


Figura 18. Experimento tipo “western” de proteínas totales de diferentes variedades de frijol, sometidos a sequía. Se usó anticuerpo anti-p33 (dil 1:200). Las puntas de flecha señalan a p33 y p36. a, variedad Negro Jamapa; b, variedad Negro 150; c, variedad Michoacán 12-A-3; d, variedad Cacahuatate 72; e, variedad Flor de Mayo.

5.2.4 Inmunolocalización de p33 y p36 en las diferentes regiones de crecimiento del hipocotilo.

Como se sabe la pared celular desempeña un papel importante durante el crecimiento. El fenómeno de expansión celular requiere fundamentalmente de la extensibilidad de la pared celular y de la presión de turgor.

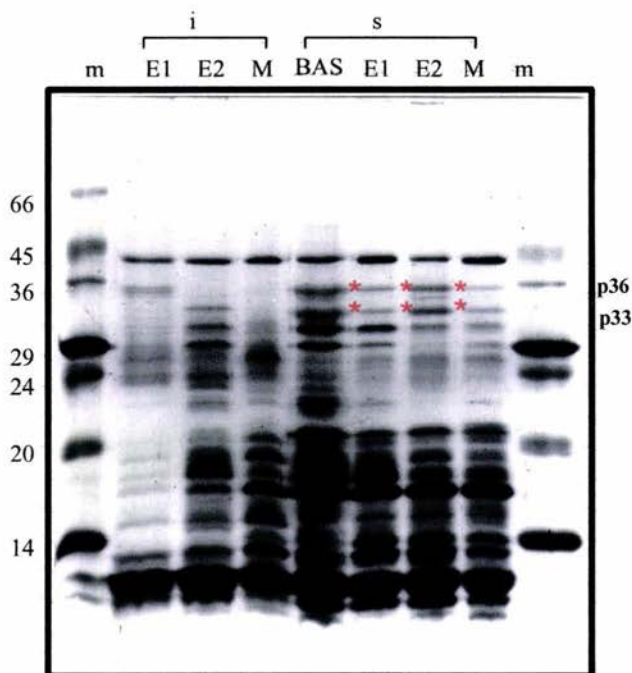


Figura 19. Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de coomassie. Proteínas básicas de las diferentes regiones de crecimiento de hipocotilos de frijol obtenidos de plantas irrigadas (i) o en condiciones de sequia (s). E1, región de elongación 1; E2, región de elongación 2; M, región madura; m, marcadores de peso molecular, a la derecha se señalan los pesos en kDa; BAS, extracto ácido de proteína a partir de hipocotilos completos. Los asteriscos indican la posición en que migran p36 y p33.

En estudios previos de crecimiento en diferentes zonas de hipocotilos de soya (Nonami y Boyer, 1989; Creelman y Mullet, 1991) se diferenciaron tres regiones principales de acuerdo a las características de crecimiento de las células que las integran: región de elongación 1 (E1), los primeros 5 milímetros inmediatamente bajo el cotiledón, en los que la tasa de elongación es más bien baja; región de elongación 2 (E2), región subapical caracterizada por la alta tasa

de elongación celular; y una región madura (M), localizada en la base del hipocotilo y compuesta por células maduras incapaces de elongarse.

En hipocotilos de frijol, se identificaron regiones de crecimiento similares (Colmenero *et al*, 1997) en las que se determinó que la región de crecimiento posee un potencial osmótico e hídrico menor al de la región madura; por otro lado, en esa misma región se observa la acumulación de una proteína de estrés PvLEA 18. Por estas razones se procedió a hacer el análisis del patrón de acumulación de proteínas en el hipocotilo de plántulas de frijol en condiciones de déficit hídrico y bien irrigadas.

En la Figura 19 se presentan extractos ácidos de las diferentes regiones de crecimiento de hipocotilos de frijol bien irrigados (i) o en condiciones de sequía (s). Como se observa, p33 y p36 se acumulan fuertemente en la región de elongación (E1 y E2) de hipocotilos de frijol de plántulas estresadas. Así mismo se detectó la acumulación de otro polipéptido de 22 KDa, cuyo patrón de acumulación a lo largo del hipocotilo difiere de p33 y p36, ya que éste se acumula en forma creciente de la región de elongación a la región madura del hipocotilo.

Con este antecedente bioquímico se procedió a la inmunodetección de dichas proteínas, empleando como estrategia la impresión de cortes de tejido en nitrocelulosa reportada por Cassab y Varner en 1987. El material vegetal, fue sometido a déficit hídrico como se detalla en Materiales y Métodos, fue seccionado transversalmente en las diferentes regiones de crecimiento que se han señalado. En la Figura 20 se presentan algunos cortes representativos de los obtenidos a partir de hipocotilos de plántula estresadas o bien irrigadas.

Cortes transversales de las diferentes regiones del hipocotilo se imprimieron y sometieron a inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-p33, y anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. Se detectó a p33/36 en la pared celular de todas las células, presentando una mayor acumulación en los haces vasculares, particularmente y de forma abundante en el floema, de la región de elongación del hipocotilo como lo muestran los datos en la figura 20 (E2 y E2A). Estas observaciones correlacionan con la evidencia bioquímica de la acumulación de p33 y p36 a lo largo del hipocotilo (Figura 19), así como datos recientes de microscopía de luz.

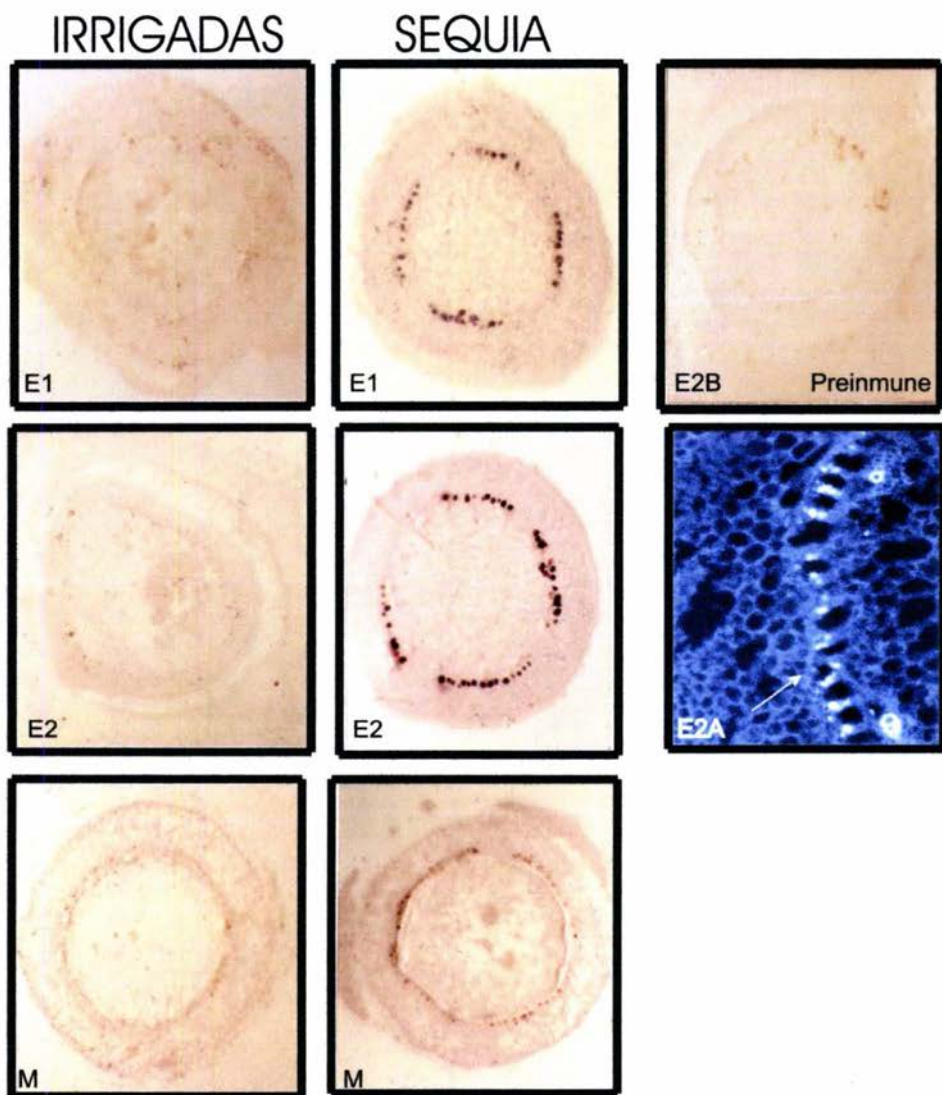


Figura 20. Inmunodetección de p33/36, en hipocotilos de plántulas etioladas de frijol, utilizando anti-p33 y anticonejo acoplado a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. (E1) y (E2) región de elongación. (M) región madura. (E2A) tinción específica con azul de anilina, la flecha indica la fluorescencia en células de floema. (E2B) detección con suero preimmune.

5.2.5 CONCLUSIONES.

p33 y p36 están relacionadas inmunológicamente, y esta relación es específica, ya que al realizar experimentos de competencia con p33, el anticuerpo deja de reconocer ambos polipéptidos.

Existen proteínas relacionadas inmunológicamente a p33 y p36 en otras especies vegetales, sin embargo dada la identidad de p33 con PRP2 de soya se hace de primordial importancia buscar la presencia de proteínas relacionadas inmunológicamente en soya.

p33 y p36 se acumulan principalmente en la región de elongación de hipocotilos de frijol, de acuerdo a evidencia bioquímica e inmunolocalizaciones.

p33 y p36 se acumulan principalmente en el floema en la región de elongación de hipocotilos de frijol, así como en las células de la epidermis.

6 DISCUSIÓN

A partir del método de purificación establecido, se obtuvieron datos bioquímicos interesantes sobre p33/p36. En primer lugar se confirma su naturaleza básica, tanto en su migración en geles catiónicos y con la electroforesis a no equilibrio, encontramos que se trata de dos proteínas básicas cuyos puntos isoeléctricos son muy cercanos. A lo largo de todo el protocolo de purificación no ha sido posible separar una proteína de la otra a homogeneidad, pues copurifican en todos y cada uno de los pasos de purificación a que son sometidas, esto es indicativo de que poseen propiedades bioquímicas semejantes, lo cual es consistente con la alta similitud que presentan a nivel de secuencia y composición de aminoácidos.

Aun cuando no fue posible la separación independiente de estas proteínas, es importante destacar la eficiencia del método de purificación establecido. Este método ha sido fundamental para la caracterización funcional de estas proteínas. La proteína así purificada, nos permitió demostrar que éstas interactúan con la membrana plasmática, así como sugerir el tipo de interacción (García-Gómez, 2000).

También a partir de método de purificación se consiguió determinar que en condiciones nativas estas proteínas forman oligómeros. La formación de un oligómero de alto peso molecular fue determinada tanto en cromatografía líquida de baja presión en condiciones nativas, como en electroforesis nativa, en ambos casos el peso molecular estimado para el oligómero es el mismo. Se ha calculado forman oligómeros de aproximadamente seis unidades. Recientemente mediante ensayos de entrecruzamiento químico se pudieron obtener oligómeros de alto peso molecular, así como intermediarios, siendo el oligómero de mayor peso de aproximadamente 260 kDa, estos datos correlacionan con las evidencia obtenidas en el presente trabajo (Cuellar S., comunicación personal).

Se sugiere que al menos una de las funciones de estas proteínas requiere de su conformación, *in vivo*, de su forma oligomérica. La concordancia entre los valores experimentales obtenidos, tanto en la electroforesis nativa, como en la cromatografía líquida, así como la ausencia de oligómeros de mayor peso molecular, demuestra que tal agregación no es inespecífica, si no más bien una organización en la que la proteína se encuentra en su forma estequiométricamente más estable y esta es, por lo tanto, su conformación funcional.

El alto grado de pureza obtenido con el método descrito en ésta tesis nos permitió no solo obtener una composición de aminoácidos más confiable, sino la secuencia parcial de las mismas.

La nueva composición de aminoácidos difiere de la reportada previamente para ésta proteína (Covarrubias et al 1995). Las diferencias fundamentales consisten en el contenido de glicina, ácido glutámico y glutamina, los cuales disminuyen considerablemente, acompañados de un incremento en el contenido de prolina, valina y lisina. El alto contenido de glicina en el primer reporte puede explicarse, si consideramos que en tal caso la proteína analizada se electroeluyó y cabe la posibilidad, pese a las pruebas de pureza, que estuviera contaminada con un exceso de glicina procedente del buffer de electro-elusión, lo cual dio como resultado que el contenido de glicina en el análisis de la composición de aminoácidos fuera más alto y con ello se desviarán los valores normales del resto de los aminoácidos que la componen.

La secuencia parcial obtenida consiste de un decapeptido PPVEKPPVYK el cual es una secuencia altamente repetida en las proteínas ricas en prolina de soya (PRP's) (Hong *et al*, 1987; Kleis-San Francisco y Tierney, 1990; Lindstrom y Vodkin, 1991). lo que coloca a estas proteínas dentro de la familia de las PRP's de frijol. Consistente con las observaciones anteriores, la inmuno-caracterización de p33 y p36 mostró que estas proteínas están antigénicamente relacionadas entre sí. El anticuerpo policlonal fue purificado por inmunoafinidad contra p33, aun así p36 fue reconocida, lo que ratifica la alta similitud que existe entre estas proteínas.

Por otro lado, resulta interesante el hecho de que hay proteínas antigénicamente relacionadas a p33 y p36 en otras especies vegetales, las cuales no parecen acumularse en respuesta a sequía. Esto puede deberse al hecho de que durante la germinación o durante el desarrollo del experimento aún cuando se tomaron todas las medidas necesarias para mantener las condiciones adecuadas de irrigación, pudieran haber sido sometidos a estrés hídrico. Alternativamente, otra posibilidad es que el tratamiento utilizado no provoque la misma situación de estrés en las otras especies debido a sus diferentes historias evolutivas.

También se exploró la presencia de proteínas relacionadas en otras variedades de frijol y se encontró que en todas las variedades analizadas *P. vulgaris* acumula a p33 en respuesta a sequía. Sin embargo encontramos un polimorfismo en relación a los polipéptidos reconocidos por anti-p33 en dichas variedades. En la variedad Negro 150 se observa un doblete de aproximadamente 36 y 37 kDa, mientras que Cacahuete-72, Michoacán 12-A-3 y Flor de

Mayo presentan solo el polipéptido de 33 kDa. Llama la atención la ausencia de uno de los polipéptidos en casi todas las variedades y que el Negro 150 presente el doblete con diferente peso molecular. Dado que las variedades empleadas provienen de cruces de mezcla genéticas, cuyos ancestros se desconocen, es posible que una de las proteínas del doblete sea la forma alélica del gen adquirida de otro genoma. Otra razón para estas diferencias, es que uno de los genes resulte de una duplicación génica en algún momento de la evolución de la familia génica.

De acuerdo a datos reportados en los que el hipocotilo se divide en diferentes regiones de acuerdo a su tasa de división y elongación celular (Creelman y Mullet, 1991). Seccionamos diferentes regiones de crecimiento del hipocotilo, y al analizar los patrones electroforéticos obtenidos para cada región encontramos que la mayor acumulación de p33 y p36 se presenta en la región de elongación del hipocotilo, en segundo lugar una acumulación en la región de división celular que es la pequeña región más cercana a los cotiledones y por último en la región madura del hipocotilo, hay una menor acumulación de estas proteínas.

Con la finalidad de tener un panorama más claro del patrón de acumulación de p33 y p36, se procedió a la realización de improntas de tejido de acuerdo a Cassab et al (1987). La inmunodetección en las impresiones de tejido reveló un patrón de acumulación en concordancia con el perfil electroforético.

La diferencia en el patrón de acumulación entre las dos zonas de elongación puede deberse a que las células de la zona de división celular (E1) posean paredes celulares primarias y que aún no han completado su desarrollo por lo tanto el aporte de proteína no es tan significativo como en el caso de la región de elongación. La localización de p33 y p36 también corresponde parcialmente a la obtenida por microscopia de luz (datos no publicados), en la que se aprecia señal en la pared de todas las células, especialmente en la epidermis y los haces vasculares. Aún queda por elucidar las razones para tales diferencias en las diferentes metodologías utilizadas.

Por otro lado, los experimentos de impresión en tejidos arrojaron datos adicionales, se encontró una acumulación en las células de la epidermis, así como una importante acumulación en las células del floema. A la fecha, en el laboratorio (datos no publicados) se han realizado estudios que indican que p33 y/o p36 no se transportan a través del floema, simplemente existe una mayor acumulación en las paredes celulares de éstas células.

Esta localización particular en floema podría ser resultado de cambios osmóticos a los que está sujeto este tejido dado que a través de él circulan concentraciones elevadas de nutrientes (sustancias osmóticamente activas). Esto provocaría entonces cambios constantes en el estatus hídrico de las células que constituyen este sistema vascular.

Por otro lado aún cuando se detectan estas proteínas en los haces del xilema esta acumulación no es tan abundante en comparación a la que se presenta en el floema aun cuando a través de él circulan iones con actividad osmótica (Na, K etc), en este caso la baja acumulación de p33 y p36 es congruente con la estructura de estas células, dado que están constituidas solo de paredes celulares maduras sin protoplastos, por lo tanto no requieren de un mecanismo de protección.

Estas proteínas tienen función activa en la respuesta al déficit hídrico de manera importante en la región de elongación, dado que en respuesta a la sequía la plántula disminuye su velocidad de crecimiento, éstas proteínas podrían acumularse más abundantemente en dicha región, con la finalidad de modificar las propiedades de la pared para controlar la elongación celular. En contraparte, su acumulación es menor en la región madura dado que ésta tiene paredes celulares más rígidas que han dejado de alongarse, por lo cual no se requeriría p33 y p36 en abundancia.

Adicionalmente de acuerdo a los datos obtenidos por García-Gómez et al (1995) proponemos que p33 y p36 llevan a cabo más de una función como se menciona arriba una sería modificar las propiedades de la pared, sin embargo dado que son capaces de interactuar con la membrana plasmática podrían también ser un elemento importante para mantener el contacto entre la pared y el protoplasto así como para inducir señalización hacia el interior de la célula en respuesta a la limitación de agua.

Finalmente cabe hacer notar que todas las conclusiones del presente trabajo se hacen en relación a la fracción soluble de p33 y p36.

Es importante resaltar, que en la literatura se ha descrito la presencia de proteínas ricas en prolina, en respuesta a patógenos, daño y reguladas por el desarrollo (Hong *et al*, 1987; Kleis-San Francisco and Tierney, 1990; Lindstrom y Vodkin, 1991), sin embargo poco se conoce sobre su participación en la respuesta a sequía.

Se ha demostrado que proteínas tipo PRP se acumulan en la pared celular en una forma insoluble. Por otro lado se ha propuesto que la insolubilización de estas proteínas es debido al entrecruzamiento generado por el H₂O₂ acumulado en la pared celular como una respuesta

primaria a la presencia del patógeno (Wojtaszek *et al*, 1995). Esos datos en conjunto y los obtenidos en este trabajo sugieren que las PRP's, al menos en frijol podrían estar en más de un estado conformacional, por un lado encontrarse entrecruzadas con otros elementos de pared y por otro en forma soluble para interactuar con la membrana plasmática, de esta forma podrían llevar a cabo dos funciones diferentes en respuesta a diferentes estímulos, de hecho nosotros hemos sido incapaces de detectar la insolubilización de ésta proteína en respuesta a sequía.

Como se menciona a lo largo de esta tesis la mayor acumulación en respuesta a sequía se detecta en la fracción soluble de la pared celular. Esto último apoya la idea de que, en sequía, es más relevante la función de proteger en su forma soluble, en tanto que en respuesta a patógenos es más relevante la función en su forma insoluble o entrecruzada en la pared celular.

Todas las conclusiones derivadas del presente trabajo se hacen en relación a la fracción soluble de p33 y p36. No se descarta la posibilidad de que existan entrecruzamientos debido a esta condición de estrés. Sin embargo, el patrón de acumulación que la proteína insolubilizada puede presentar en la pared celular, es otro tema de estudio.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. **Acevedo E.**, Fereres E. (1993). Resistance to abiotic stresses. In Plant Breeding, ed. MD Hayward, NO Bosemark, I Romagosa, pp.406-21. London: Chapman & Hall.
2. **Adair**, W.S., Steinmetz, S.A., Mattson, D.M., Goodenough, U.W. and Heuser, J.E. (1987). Nucleated assembly of *Clamydomonas* and *Volvox* cell walls. J. Cell Biol. 105, 2373-2382.
3. **Alberts**, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J.D. (1989). Molecular Biology of the Cell. Second Edition. Garland Publishing, Inc. New York & London.
4. **Ausubel F. M.**, Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. 1994. Current Protocols in molecular Biology. John Wiley and & Sons, Inc. 10.4.8.
5. **Bohlmann,H.**, Clausen,S. Behnke,S., Giese, H., Hiller,C. Reimann-Philipp, U., Schader, G., Barkholt, V., and Apel, K. (1988). Leaf-specific thionins of barley- a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. EMBO J. 7, 1559-1565.
6. **Bohnert HJ**, Nelson DE, Jensen RG. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. Plant Cell. Jul; 7(7):1099-1111.
7. **Bolletín Sigma**. MKR 137, Nondenatured Protein Molecular weight
8. **Bolwell**, G.P., Robbins, M.P., and Dixon, R.A. (1985). Elicitor-induced prolyl hydroxylase from French bean (*Phaseolus vulgaris*). Localization, purification and properties. Biochem. J. 229. 693-699.
9. **Bowles DJ**. (1990). Defense-related proteins in higher plants. Annu Rev Biochem.; 59:873-907.
10. **Boyer J. S.** (1992). Plant productivity and environment. Science. 218: 443-448.
11. **Bradford MM**. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. May 7; 72: 248-54.

12. **Bray**, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
13. **Bulletin** Sigma MKR 137, Nondenatured Protein Molecular weight Markers.
14. **Carpita**, N.C. and Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
15. **Cassab** GI, Varner JE. 1987. Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J Cell Biol. Dec*; 105: 2581-8.
16. **Cassab** GI. (1998). Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Jun; 49:281-309.
17. **Cassab**, G.I., and Varner, J.E. (1988). Cell wall proteins. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 321-353.
18. **Cassab**,G.I. (1986). Arabinogalactan proteins during the development of soybean root nodules. *Planta* 168, 441-446.
19. **Cheif** R. F. and Wensink P. C. (1981). *Practical methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag.
20. **Chen**, J. and Varner, J.E. (1985b). An extracellular matrix protein in plants: characterization of a genomic clone for carrot extensin. *EMBO J.* 4, 2145-2151.
21. **Colmenero-Flores**, J.M., Campos, F., Garcíarrubio, A. and Covarrubias, A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology.* 35:393-405.
22. **Condit**, C. and Meagher, R.B. (1987). Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4273-4279.
23. **Cooper**, J. B., Chen,J.A.,van Holst,G.-J., and Varner, J.E. (1987). Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. *Trends Biochem. Sci.* 12, 24-27.
24. **Cooper**, T. G. (1977). *The tools of Biochemistry*. A Wiley-InterScience Publication. p 371.

25. **Corbin** D.R., Sauer N., Lamb C.J. (1987). Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell Biol.* 7:4337-4345.
26. **Covarrubias**, A.A., Ayala, J.W., Hernández, M., Reyes, J.L. and Garciarrubiuo, A. (1995). Cell wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Plant Physiol.* 107: 1119-1128.
27. **Creelman**, R.A. and Mullet, J.E. (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new β -tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Molecular Biology.* 17: 591-608.
28. **Delmer**, D.P. (1991). The biochemistry of cellulose synthesis. In *The cytoskeletal Basis of plant Growth and form.* Academic Press Limited.
29. **Esquerré-Tugayé**, M.T., Lafitte, C. Mazau, D. Toppan, A., and Touze, A. (1979). Cell surfaces in plant-microorganism interactions. II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant physiol.* 64, 320-326.
30. **García-Gómez** B. I., Campos F., Hernández M. and Alejandra 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.* 22 (4), 277-288.
31. **Giddings**, T.H.Jr. and Staehelin, L.A. (1991). The biochemistry of cellulose synthesis. In *The cytoskeletal Basis of plant Growth and form.* Academic Press Limited. pp 85-99.
32. **Greacen**, E.L. and Oh, J.S. (1972). Physics of root growth. *Nature New Biol.* 235: 24-35.
33. **Hanson**, A.D. and Hitz, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 163-203.
34. **Hayashi**, T and MacLachlan, G. (1984). Pea xyloglucan and cellulose. III. Metabolism during lateral expansion of pea epicotyl cells. *Plant Physiol.* 76: 739-742.
35. **Hayashi**, T. (1991). Biochemistry of xyloglucans in regulating cell elongation and expansion. In *the Cytoskeletal Basis of Growth and Form.* Academic Press Limited. pp 131-144.

36. **Hayashi**, T., Marsden, M.P.F., and Delmer, D.P. (1987). Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-celulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol.* 83: 384-389.
37. **Hayashi**, T., Wong, Y.S., and MacLachlan, G. (1984 b). Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo-1, 4- β -glucanases. *Plant Physiol.* 75: 605-610.
38. **Hernández Ortiz**, M. (1994). Proteínas que se inducen por déficit hídrico en diferentes cultivares de frijol. Tesis de licenciatura.
39. **Hoggart**, R.M. and Clarke, A.E. (1984). Arabinogalactans are common components of angiosperm styles. *Phytochemistry.* 23, 1571-1573.
40. **Hong** JC, Nagao RT, Key JL. (1987). Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. *J Biol Chem.* 1987 Jun 15; 262(17):8367-76.
41. **Hong** JC, Nagao RT, Key JL. (1990). Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. A comparative analysis. *J Biol Chem.* Feb 15; 265(5): 2470-5.
42. **Hsiao**, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:519-70.
43. **Hurkman** WJ, Tanaka CK. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* 81: 802-806.
44. **Ingram** J, Bartels D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Jun; 47:377-403.
45. **Jones**, M.M. and Rawson, H.M. 1979. Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. *Physiol Plant.* 45:103-111.
46. **Keller** B, Sauer N, Lamb CJ. (1988). Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7(12): 3625-33
47. **Kutschera**, U. and Briggs, W.R. (1987). Rapid auxin-induced stimulation of cell wall synthesis in pea internodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 2747-2751.
48. **Laemli**, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

49. **Lindstrom** JT, Vodkin LO. (1991). A soybean cell wall protein is affected by seed color genotype. *Plant Cell*. Jun; 3(6):561-71.
50. **Lowry** O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the pholin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193: 265-275.
51. **Lucas** W. J. (1999). Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Bot.* 50: 979-987.
52. **Mazau**, D., Romeau D. and Esquerre-Tugaye, M.T. (1988). Two different families of hydroxyproline-rich glycoproteins in melloid callus. *Plant Physiol.* 69: 1145-1149.
53. **McCann**, M.C., Wells, B. and Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary cell wall. *J. Cell Sci.* 96, 323-334.
54. **McNeil** M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem.* 53:625-63.
55. **Michelena**, V.A. and Boyer, J.S. (1982). Complete turgor maintenance at low water potential in the elongation region of maize leaves. *Plant Physiol.* 69: 1145-1149.
56. **Moore**,P.J. and Staehelin, L.A. (1988). Immunogold localization of the cell wall matrix polysaccharids rhamnogalacturonan-I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pretense* L.: implications for secretory pathway. *Planta* 174, 433-445.
57. **Morgan**, J.M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 299-319.
58. **Morgan**, M. (1978). Osmotic adjustment in the spikelets and leaves. *J. Experimental Botany.* 31: 655-665.
59. **Nardu**, B.P., Jones, G.P., Paleg, L.G., and Pljakoff-Myber A. (1987). Proline analogues in *Melaleuca* species: response of *Melaleuca lanceolata* and *M. uncinata* to water stress and salinity. *Aust. J. Plant. Physiol.* 14: 669-677.
60. **Nelson** D, Salamini F, Bartels D. (1994). Abscisic acid promotes novel DNA-binding activity to a desiccation-related promoter of *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* Apr; 5(4):451-8.

61. **Nonami H**, Boyer JS. (1989). Turgor and growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 89: 798-804.
62. **Nonami H**, Boyer JS. (1993). Direct Demonstration of a Growth-Induced Water Potential Gradient. *Plant Physiol.* May; 102(1): 13-19.
63. **Olmsted**, J.B. (1981). Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J. Biol. Chem.* 256: 11955-11957.
64. **Palm CJ**, Costa MA, An G, and Ryan CA. (1990). Wound-Inducible Nuclear Protein Binds DNA Fragments that Regulate a Proteinase Inhibitor II Gene from Potato. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 1990 January 15; 87(2): 603-607.
65. **Parsons**, L.R. and Howe, T.K. (1984). Effects of water stress on the water relations of *Phaseolus vulgaris* L. and the drought resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiol Plant.* 60: 197-202.
66. **Preston R.D.** (1974). *The physical biology of plant cell walls.* London Chapman & Hall. 491 pp.
67. **Ray J.**, Knapp J., Grierson D., Bird C, Schuch W. (1988). Identification and sequence determination of a DNA clone for tomato pectin esterase. *Eur. J. Biochem.* May 16; 174 (1): 119-24.
68. **Roberts K.** (1990). Structures at the plant cell surface. *Curr Opin Cell Biol.* Oct; 2 (5): 920-8.
69. **Seara, J.**, Nicolás, G. and Labrador, E. (1988). Autolysis of cell wall. Its possible role in endogenous and IAA-induced growth in epicotyls of *Cicer arietinum*. *Physiol Plantarum* 72,769-774.
70. **Sheng, J.**, Jeong, J., and Mehdy, M.C. (1993). Developmental regulation and phytochrome-mediated induction of mRNAs encoding a proline-rich protein, glycine-rich proteins, and hydroxyproline-rich glycoproteins in *Phaseolus vulgaris* L. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 90: 828-832.
71. **Showalter AM.** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Sep; 58(10): 1399-417.

72. **Showalter**, A.M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The plant Cell* 5:9-23.
73. **Showalter**, A.M. and Varner, J.E. (1989). Plant hydroxyproline-rich glycoproteins. En: *The Biochemistry of plants*. P.K. Stumpf and E.E. Conn, E. (eds.) (New York: Academic Press). 15: pp 485-520.
74. **Singh**, T.N., Paleg L.G., and Aspinall D. (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature*. 236: 188-190.
75. **Skriver**, K. and Mundy, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*. 2: 503-512.
76. **Taiz**, L. (1984). Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 585-657.
77. **Taiz**, L. and Zeiger, E. (1991). Water balance of the plant. En: *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, I. (eds). Redwood City, California. Pp 81-99.
78. **Thomas** JM, Hodes ME. (1981). A new discontinuous buffer system for the electrophoresis of cationic proteins at near-neutral pH. *Anal Biochem*. Nov 15; 118(1): 194-6.
79. **Tierney**, M.L. and Varner, J.E. (1987). The extensions. *Plant Physiol.* 84, 1-2.
80. **Turner**, N.C. (1986). Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:175- 190
81. **Turner**, N.C. and Jones, M.M. (1980). Turgor maintenance by osmotic adjustment. A review and evaluation. In *adaptation of plants to water and high temperature stress*. Turner, N.C. and Kramer, P.J. eds. pp 87-103. Wiley New York.
82. **Varner**, J.E. and Lin, L.S. (1989). Plant Cell Wall Architecture. *Cell* 56:231-239.
83. **Velasco** R, Salamini F, Bartels D. (1994). Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol*. Oct; 26(1):541-6

84. **Wojtaszek P**, Trethowan J, Bolwell GP. (1995). Specificity in the immobilisation of cell wall proteins in response to different elicitor molecules in suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol Biol. Sep*; 28(6):1075-87.
85. **Zhu, J.K.**, Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1993). Loss of arabinogalactans-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells. *Planta*. 190: 221-222

8 APENDICE.

Solución de extracción para proteínas básicas.

Etanol absoluto: HCl 1.25N, en proporción 3:1
4mM de metabisulfito de sodio
10 mM 2-mercaptoetanol
1 mM PMSF (Fenil-metil-sulfóxido)
0.5 mM ácido ϵ -aminocaproico
0.1 mM bebzamidina
1% PVPP (polivinil poli-pirrolidona)

Solución de extracción para proteínas totales.

0.7 M sacarosa
0.5 M trizma base (tris[hidroximetil]aminometano)
0.1 M KCl
30 mM HCl
50 mM EDTA (ácido etilen diamino tetra acético)
2% 2-mercaptoetanol
12 mg/ml PVPP

Buffer de muestra Laemli 2X

0.8 ml de Tris-HCl 2.5 M pH 6.8
4.0 ml SDS 20% (dodecil sulfonato de sodio)
2.0 ml 2-mercaptoetanol.
4.0 ml glicerol
azul de bromofenol trazas.

Soluciones para Lowry.

- A. CuSO_4 2% (p/v)
- B. Tartrato de potasio 4% (p/v)
- C. Na_2CO_3 3% (p/v) en NaOH 0.1M
- D. Reactivo de fenol (1:1) en agua, fresco.

La solución CTC, se prepara al momento de usar mezclando dos partes de la solución A, dos partes de la solución B, y 98 partes de la solución C.

Solución amortiguadora de transferencia (BT)

0.025 M trizma-base
0.192 M glicina
20% metanol

Buffer tris salino (TBST)

10 mM tris HCl, pH 8.0
150 mM NaCl
0.05% Tween 20 (polioxietilen sorbitan monolaurato)

Solución de sustratos para fosfatasa alcalina.

En 5 ml de (100mM de tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) mezclar 33 μl de NBT (nitroblue tetrazolium) y 16.5 μl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).