



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE
MEMBRANA DE CAPA DE ALEURONA
CUYO ESTADO REDOX SE MODIFICA
POR EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA



Tutor: DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE CAPA DE ALEURONA CUYO ESTADO REDOX SE MODIFICA POR EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Wilhelm Hansberg Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Missouri por el apoyo en la microsecuenciación de las proteínas.

Se reconoce la asesoría del Dr. León Patricio Martínez Castilla.

Se reconoce el apoyo técnico de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Se reconoce el apoyo de la Sra. Leticia García, secretaria de apoyo de la Entidad Académica.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (40599-Z) y PAIP-UNAM (6290-01). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Wilhelm Hansberg Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	INCMNSZ, SS
Vocal	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM

DEDICATORIA

*A Chepe,
mi razón de ser y hacer.*

AGRADECIMIENTOS

A mi Papá, Ade, Mau y Pamoli.

A Claudia, Efrén y Fer.

A la Dra. Bernal, por muchos años de trabajo compartido, por su apoyo en todo momento, su confianza y por su amistad.

A Carolina, Darita y Juan Pablo, por muchos años de amistad.

A Karinita, por tu frescura, optimismo y sonrisa, por compartir parte de este camino conmigo.

A la Dra. Patricia Coello, por su apoyo en la realización de las “dobles dimensiones”.

A la Dra. Marina Gavilanes por su confianza y apoyo.

Al Dr. Javier Plasencia por su generosidad y su eterna disposición de ayudar.

A Lety García, quien nos facilita enormemente el paso por el posgrado con su buena disposición y eficiencia.

A Adriana Pastrana, por su ayuda y apoyo en todo momento.

A todos mis compañeros y amigos del departamento de Bioquímica: Mayte, Laurel, Laura, Rubén, Adrianita, Alaide, Javier Andrés, Grethel, Valeria, Goyo, Andrea, Alejandra, Karina, Yuridia, Martín y los todos los demás.

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Irma Bernal, Dr. Wilhelm Hansberg y Dr. Felipe Cruz por sus invaluable observaciones y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado y sus valiosos comentarios realizados durante la revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de estudios de Posgrado por la beca otorgada para la realización de este progrado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades y apoyo que me ha brindado en mi formación académica.

A Chepe, por tu amor, tu paciencia, tu apoyo incondicional y tu generosidad. Te amo.

CONTENIDO

1. RESUMEN

2. ABSTRACT

3. INTRODUCCIÓN

4. ANTECEDENTES

4.1. LA CAPA DE LA ALEURONA

4.1.1. Percepción del AG₃

4.1.2. Transducción de la señal

4.1.3. Regulación de la expresión génica

4.1.4. Metabolismo en la aleurona

4.2. REGULACIÓN REDOX

4.2.1. Señalización por redox

5. HIPÓTESIS

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EFECTO DE LA MODIFICACIÓN DEL ESTADO REDOX DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA SOBRE LA RESPUESTA DE LA ALEURONA AL AG₃

7.1.1. Actividad de α -amilasa

7.2 ESTABLECIMIENTO DE LA METODOLOGÍA PARA EVALUAR CAMBIOS REDOX EN PROTEÍNAS MEMBRANALES DE LA CAPA DE ALEURONA

7.2.1. Establecimiento de las condiciones experimentales para la obtención de proteína membranal solubilizada (PMS)

7.2.2. Establecimiento de las condiciones experimentales para la separación de PMS de capa de aleurona por isoelectroenfoque y SDS-PAGE

7.2.3. Establecimiento de las condiciones experimentales para la detección de grupos sulfhidrilo en PMS

7.2.4. Establecimiento de las condiciones experimentales para la obtención de una fracción enriquecida de PMS con grupos sulfhidrilo

7.2.5. Establecimiento de los parámetros de análisis de patrones electroforéticos en dos dimensiones a través del programa PD-QUEST

7.3. EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE EL ESTADO REDOX DE LAS PROTEÍNAS MEMBRANALES DE LA CAPA DE ALEURONA

7.3.1. Contenido de sulfhidrilos en proteínas microsomales (ARTÍCULO)

7.3.2. Detección de posibles blancos de regulación redox (ARTÍCULO)

7.3.3. Identificación de las proteínas que modifican su estado redox por efecto del AG₃

7.3.4. Proteína blanco identificada: Proteína con manos EF de unión a Ca²⁺

8. CONCLUSIONES

9. PERSPECTIVAS

10. ANEXOS METODOLÓGICOS

10.1. PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS Y OBTENCIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA

10.2. INCUBACIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA AISLADAS

10.3. OBTENCIÓN DE PROTEÍNA MEMBRANAL SOLUBILIZADA (PMS)

10.4. MARCAJE DE GRUPOS SULFHIDRILO CON MONOBROMO BIMANO (MBRB) *IN VITRO*

10.5. MARCAJE DE SULFHIDRILOS CON MBRB DURANTE LA HOMOGENIZACIÓN

10.6. ENSAYO DE VIABILIDAD

10.7. MICROSECUENCIACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

10.8. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE CAPA DE ALEURONA DE CEBADA

10.9. CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL

10.10. ELIMINACIÓN DE ADN CONTAMINANTE

10.11. RT-PCR

10.11.1. Síntesis de cDNA

10.11.2. PCR

11. BIBLIOGRAFÍA

12. ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO

ÍNDICE DE DIAGRAMAS, TABLAS Y FIGURAS

- Diagrama 1.** Esquema de la estructura de una semilla de cebada.
- Diagrama 2.** Estructura del AG₃ y su análogo el AG₄.
- Tabla 1.** Respuestas inducidas por AG₃ en la aleurona.
- Tabla 2.** Efecto de diferentes detergentes y urea sobre la extracción de proteínas membranales.
- Tabla 3.** Número de manchas de proteína presentes en los patrones electroforéticos de proteínas membranales con grupos sulfhidrilo.
- Tabla 4 .** Análisis bioinformático de las secuencias parciales de las proteínas 6, 13 y E obtenidas por Nanospray MS/S.
- Tabla 5.** Secuencias con homología a la secuencia de nucleótidos y traducida de FR200.
- Tabla 6.** Procesos celulares en los que participan algunas proteínas con manos EF de unión a calcio.
- Figura 1.** Efecto de los bloqueadores de sulfhidrilos que no penetran a la membrana plasmática de la aleurona sobre la actividad de la α -amilasa.
- Figura 2.** Efecto de la modificación de los grupos sulfhidrilo de proteínas de la membrana plasmática en la viabilidad de las células de aleurona.
- Figura 3.** Efecto de la solubilización de la fracción microsomal con CHAPS (2%) y urea (4 M) sobre la abundancia y distribución de proteínas entre PMS y FI.
- Figura 4.** Comparación de condiciones de concentración de poliacrilamida y método de tinción con plata en la separación de PMS por IEF/SDS-PAGE.
- Figura 5.** Efecto de la cantidad de proteína cargada sobre la resolución de manchas de proteína en el IEF/SDS-PAGE.
- Figura 6.** Separación por IEF/SDS-PAGE de PMS de capas de aleurona incubada en ausencia y presencia del AG₃.
- Figura 7.** Marcaje de grupos sulfhidrilo de PMS con monobromo bimano (mBrB) *in vitro*.
- Figura 8.** Marcaje de sulfhidrilos con mBrB durante la homogenización.
- Figura 9.** Marcaje de grupos sulfhidrilo con ¹⁴C-NEM *in vivo*.
- Figura 10.** Marcaje de grupos sulfhidrilo con yodo-acetil[125I] tirosina (IA125IT).
- Figura 11.** Patrón electroforético de SDS-PAGE de proteínas contenidas en las diferentes fracciones obtenidas de la resina PAO-sefarosa.
- Figura 12.** Patrones electroforéticos de IEF/SDS-PAGE de PMS con grupos sulfhidrilo de aleuronas incubadas en ausencia y presencia del AG₃.

- Figura 13.** Identidad entre proteínas que presentan diferencia en peso molecular mayor al 5% asignada de acuerdo a su pI y entorno.
- Figura 14.** Ejemplos de proteínas que presentaron cambios de intensidad y bajo enfoque.
- Figura 15.** Proteínas microsecuenciadas por Nanospray MS/MS. Patrón electroforético de IEF/SDS-PAGE de proteínas membranales con grupos sulfhidrilo de aleuronas tratadas con AG₃.
- Figura 16.** Secuencia de aminoácidos obtenida de la traducción del EST de cebada TC132674 (proteína con manos EF de unión a Ca²⁺).
- Figura 17.** Secuencias de los oligonucleótidos diseñados
- Figura 18.** Amplificación por RT-PCR del cDNA de HvRRP-6 de aleuronas de cebada en ausencia de AG₃.
- Figura 19.** El cDNA parcial de HvRRP-6 presenta alto porcentaje de identidad con TC132674 de cebada.

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico	H ₂ O ₂ : peróxido de hidrógeno
AG ₃ : ácido giberélico	H ₂ O-DEPC: agua libre de RNAsas
AO: ácido okadaico	IA ¹²⁵ IT: yodo-acetil-[¹²⁵ I] tirosina
CaM: calmodulina	IEF: isoelectroenfoque
CDPK: cinasa dependiente de Ca ²⁺	IP ₃ : inositol 1,4,5-trisfosfato
CK2: fosfotransferasa de serina / treonina	IPG: Immobilized pH gradient
CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio	mBrB: monobromo bmano
CHAPS: propansulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]	MCP: muerte celular programada
DE: desviación estándar	NEM: N-etilmaleimida
dNTP: desoxirribonucleótidos	PAO: óxido de fenilarsina
DTNB: ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico	PCI: fenol:cloroformo:isopropanol
DTT: ditioneitol	PCMBs: ácido p-cloromercuribencensulfónico
DEPC: dietil pirocarbonato	PDI: disulfuro isomerasa de proteína
EDTA: ácido etilendiamino N,N'-tetraacético	PKC: proteína cinasa C
EGTA: ácido etilenglicol-bis-(β-amino-eter	PMS: proteína membranal solubilizada
EM (MS): espectrometría de masas	PVPP: polivinil polipirrolidona
ERO: especies reactivas de oxígeno	R3: oligonucleótido antisentido
EST: expressed sequence tag	SDS: dodecil sulfato de sodio
F1: oligonucleótido sentido	TA: temperatura ambiente
FI: fracción insoluble	TCA: ácido tricloroacético
FR200: Fragmento amplificado por RT-PCR/ cDNA parcial de TC132674	TTC: 2,3,5-trifeniltetrazolio
GMPc: guanosín monofosfato cíclico	
GSH: glutatión	
GSSG: disulfuro de glutatión	

1. RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) están involucradas en la regulación redox por su capacidad de oxidar a los residuos de cisteína de las proteínas. Esta regulación es utilizada en las células para modular e integrar diferentes respuestas a los estímulos externos. En la capa de la aleurona de cebada (*Hordeum vulgare* L.), el ácido giberélico (AG_3) se percibe en la membrana plasmática e induce la síntesis y secreción de la α -amilasa. Todos los sistemas membranales (la membrana plasmática y las endomembranas) de la aleurona participan en la elaboración de esta respuesta. En este proceso, se generan las ERO como producto de un metabolismo de lípidos muy intenso. Hemos planteado la hipótesis de que la regulación redox podría estar participando en los procesos que llevan a la respuesta de la aleurona al fitorregulador. Para probar esta hipótesis, se utilizaron tres diferentes enfoques.

Para la primera estrategia, las aleuronas se trataron con diferentes reactivos que bloquean los sulfhidrilos, después se incubaron en presencia y ausencia del AG_3 para luego evaluar la actividad de la α -amilasa y la viabilidad celular. Se encontró que la actividad de la enzima disminuyó casi en un 50%; aún cuando la viabilidad celular se mantuvo en presencia del AG_3 .

El segundo enfoque consistió en determinar el contenido de los grupos tiol en las membranas de las aleuronas que fueron inducidas con el fitorregulador. Se observó un incremento significativo en la cantidad de tioles ante la inducción de las aleuronas con AG_3 .

Finalmente, se lograron detectar cambios redox inducidos por el AG₃ en 22 proteínas específicas que están asociadas a las membranas de la aleurona. De estas proteínas, 17 se redujeron y 5 se oxidaron por efecto del fitorregulador. Las secuencias de algunas de estas proteínas permitieron identificar tres de ellas: una proteína que tiene dominios de mano EF para la unión a calcio, una 1,6-bifosfato aldolasa y una piruvato descarboxilasa.

Se realizaron estudios preliminares para confirmar la identidad y la expresión de la proteína que tiene dominios de unión a calcio, dada su posible relevancia en el sistema. Los resultados confirman que se trata de una proteína que pertenece a la familia de proteínas con dominios de mano EF.

Los resultados de este trabajo indican que el AG₃ promueve cambios redox específicos en las proteínas membranales de la aleurona por lo que es factible que en este sistema opere un mecanismo de regulación redox.

2. ABSTRACT

REDOX-SENSITIVE TARGETS DETECTION IN GA₃-INDUCED BARLEY ALEURONE LAYER

Reactive oxygen species (ROS) are involved in redox regulation by their capacity to reversibly oxidize cysteine residues. This regulation is used by cells to modulate and integrate different responses to extracellular stimuli. In barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer, gibberellic acid (GA₃) is perceived at the plasma membrane and induces the synthesis and secretion of α -amylase. All aleurone membrane systems participate in the elaboration of this response. During these events, ROS are generated as a by-product from intense lipid metabolism. Therefore, we hypothesized that redox regulation may be operating in the GA₃-induced response. To test this hypothesis, we measured if GA₃ treatment induced changes in the redox state of aleurone membrane associated proteins. Membrane proteins with sulfhydryl and disulfide groups were isolated from a reduced and an *in situ* NEM-alkylated microsomal fractions, respectively. Each fraction was enriched by thiol affinity chromatography and separated by two dimensional electrophoresis. The *in vivo* redox state of each membrane protein present in GA₃ treated and untreated tissue was determined. Results showed that GA₃ induced the reduced state in 17 constitutive proteins and oxidized state in another five. These data indicate that redox changes occur in membrane proteins after GA₃ signaling in aleurone layer.

3. INTRODUCCIÓN

La capa de la aleurona se ha estudiado extensamente como un modelo biológico de la transducción de señales y de la expresión génica en plantas debido a que su función es regulada por una hormona y su respuesta es de fácil seguimiento. Al inicio de la germinación, el embrión de la semilla sintetiza al AG₃, el cual difunde a través del endospermo almidonoso hasta la capa de la aleurona. Ahí, el AG₃ desencadena una serie de respuestas fisiológicas que promueven la degradación de las proteínas y lípidos de reserva de este tejido. Posteriormente, se promueve la síntesis y secreción de diferentes hidrolasas, principalmente α -amilasa, que inician y luego sostienen la movilización de las reservas del endospermo almidonoso para el crecimiento de la plántula después de la germinación (Jones y Jacobsen, 1991).

Durante este tiempo, el metabolismo energético de los lípidos se activa importantemente, por lo que también se incrementa la proliferación de las ERO principalmente en las mitocondrias y en los glioxisomas (Palma y Kermode, 2003). Se ha demostrado que la capacidad enzimática antioxidante se mantiene durante el período de síntesis de la α -amilasa (Fath *et al.*, 2001; Palma y Kermode, 2003). Esto sugiere que, durante la función secretora del tejido, existen niveles moderados de las ERO que podrían fungir como mensajeros celulares (Bailly, 2004), o bien podrían ser capaces de modificar el estado redox de algunas proteínas. En este sistema se han identificado diversos elementos que están

relacionados tanto con la transducción de señales como con la regulación de la expresión génica (Lovegrove y Hooley, 2000).

Existen diferentes estudios que indican que el reconocimiento del AG₃ se lleva a cabo en la membrana plasmática (Hooley *et al.*, 1991; Gilroy y Jones 1994). Otros estudios sugieren una participación de las proteínas G heterotriméricas (Wang *et al.*, 1993; Jones H.D. *et al.*, 1996; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2000), de la fosfolipasa C (Kashem *et al.*, 2000) y de la guanilato ciclasa (Penson *et al.*, 1996) en la señalización del AG₃ en la aleurona. Uno de los procesos estudiados con más detalle en la aleurona es el incremento del Ca²⁺ citosólico dentro de un período muy corto de inducción con el fitorregulador. Este incremento del Ca²⁺ se concentra principalmente en la periferia de la membrana plasmática debido a la actividad de canales de Ca²⁺ en esta membrana (Bush, 1996).

Dados los elementos de transducción identificados en la aleurona, así como su naturaleza secretora, resulta claro que los sistemas membranales de las células de la aleurona son cruciales para una respuesta correcta al AG₃.

Junto con la activación pronunciada del metabolismo energético y de la producción de las ERO, resulta de interés que algunos de estos elementos membranales pudiesen ser blanco de una regulación redox. La aleurona es un sistema idóneo para el estudio del papel del estado redox de los grupos tiol de proteínas como un mecanismo de regulación de la señalización y de la respuesta al AG₃.

Aprovechando las características particulares de la capa de aleurona, el objetivo de este trabajo fue determinar si el AG₃ promueve cambios redox en algunas proteínas asociadas con las membranas de la capa de la aleurona.

Se utilizaron tres diferentes enfoques: a) evaluar la capacidad de la respuesta del sistema al AG₃ (actividad de α -amilasa y viabilidad) cuando los grupos sulfhidrilo de la membrana plasmática de la aleurona se modificaron químicamente, b) determinar si existen cambios en el contenido de los grupos sulfhidrilo de las proteínas membranales de la aleurona cuando ésta se ha inducido con el AG₃, y c) detectar si el AG₃ induce cambios redox en algunas proteínas de aleurona asociadas a las membranas.

Este es el primer trabajo que explora la participación de un mecanismo de regulación redox en la señalización y en la respuesta de la aleurona al AG₃.

4. ANTECEDENTES

4.1. LA CAPA DE LA ALEURONA

La capa de la aleurona constituye parte del endospermo de la semilla de un cereal (Diagrama 1). Este tejido está formado de una a tres capas de células con una pared celular rígida (Jacobsen y Chandler, 1988).

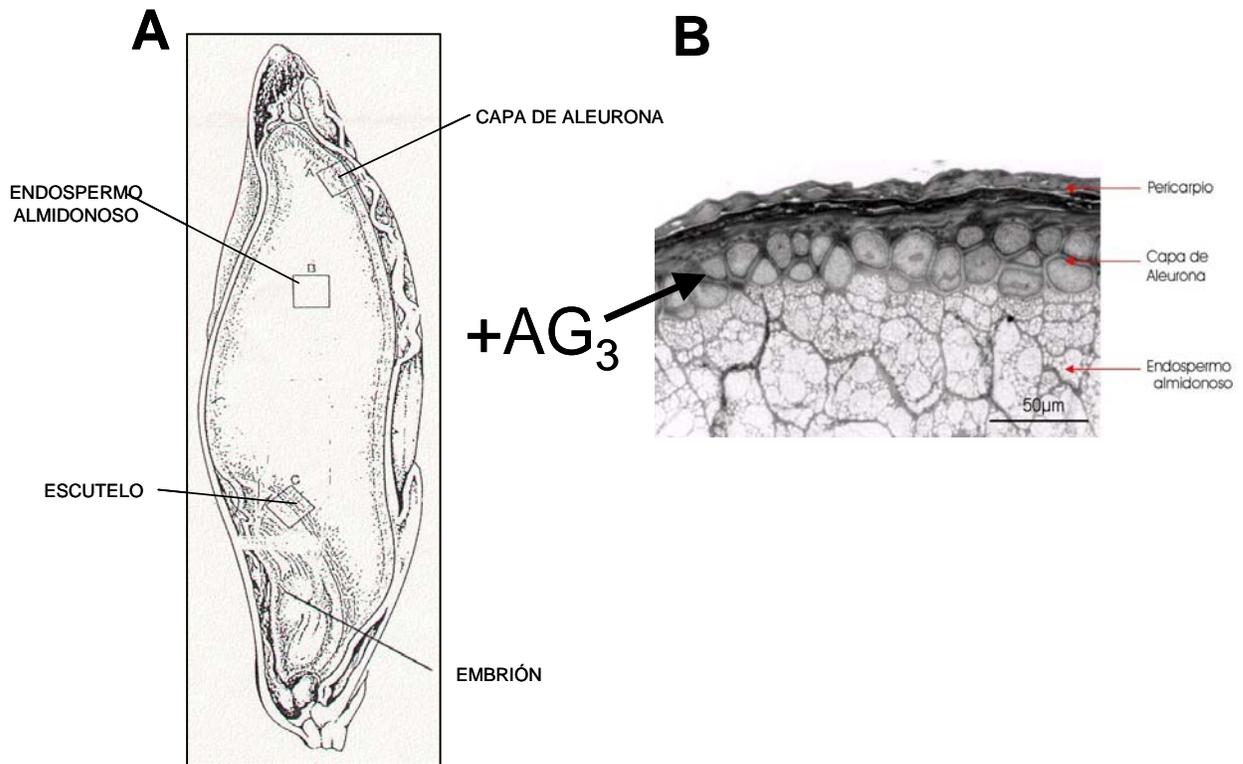


Diagrama 1. Esquema de la estructura de una semilla de cebada. A. Partes de la semilla. B. Micrografía del endospermo de la semilla.

La capa de la aleurona juega un papel muy importante en el crecimiento del embrión, ya que es la responsable de la movilización de reservas del endospermo almidonoso en las primeras etapas de este proceso. La movilización de reservas por medio de este tejido se estimula a través de un fitorregulador que es el ácido

giberélico (AG_3) y se inhibe por el ácido abscísico (ABA; Jacobsen y Chandler, 1988). Esto ha convertido a la capa de aleurona en un importante sistema de estudio de la acción de fitorreguladores y mecanismos de transducción de señales en plantas.

Al inicio de la germinación de la semilla, el embrión sintetiza AG_3 . Este fitorregulador difunde hacia el endospermo almidonoso hasta llegar a la capa de aleurona. Una vez ahí, induce la hidrólisis de la reserva de la aleurona y consecuentemente la síntesis *de novo* de una serie de enzimas hidrolíticas, de las cuales predomina la α -amilasa (Hill y MacGregor, 1986). También se sintetizan glucosidasas, proteasas, lipasas y fosfatasas (Jacobsen y Chandler, 1988). Estas enzimas son secretadas hacia el endospermo almidonoso donde inician la degradación de las reservas. Los productos de hidrólisis viajan al embrión donde son aprovechados para su desarrollo (Jacobsen y Chandler, 1988).

La aleurona se ha utilizado ampliamente como modelo para dilucidar los diferentes factores que participan en la percepción, transducción de señales y respuesta al AG_3 . Algunos de ellos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Respuestas inducidas por AG₃ en la aleurona. (Adaptada de Bethke *et al.*, 1997).

Parámetro	Respuesta	Elementos involucrados	Ref.
Moléculas señal			
[Ca ²⁺] _i	Incremento sostenido	Canal Ca ²⁺ , ATPasa de Ca ²⁺	Bush, 1996; Lovegrove y Hooley, 2000
pH	Decremento transitorio	H ⁺ -ATPasa	Heimovaara-Dijkstra, 1994
GMPc	Incremento transitorio	Guanilato ciclasa	Penson <i>et al.</i> , 1996
IP ₃	Incremento transitorio	PLC	Chen <i>et al.</i> , 1997
Calmodulina (CaM)	Incremento sostenido		Schuurink <i>et al.</i> , 1996
Expresión génica			
CaM	Incremento		Schuurink <i>et al.</i> , 1996
α-amilasa	Incremento		Chandler <i>et al.</i> , 1984
Factor de transcripción GAMYB	Incremento		Gubler <i>et al.</i> , 1995
Efectos fisiológicos			
Secreción de hidrolasas	Incremento		Jones y Jacobsen, 1991
NADH oxidasa	Decremento		Maya, 2000
Actividad de proteasas	Incremento		Bethke <i>et al.</i> , 1996
Vacuolación	Acelerada		Hooley, 1982
Muerte celular	Promovida	Especies reactivas de oxígeno	Fath <i>et al.</i> , 2001
Efectos Metabólicos			
Metabolismo energético	Incremento		Palma y Kermode, 2003
Degradación de lípidos	Incremento		Arnalte <i>et al.</i> , 1991
β-oxidación	Incremento		Doig, <i>et al.</i> 1975; Newman y Briggs 1976
Ciclo del glioxilato	Incremento		Eastmond y Jones, 2005
Enzimas detoxificadoras especies reactivas de oxígeno	Incremento		Fath <i>et al.</i> , 2001; Palma y Kermode, 2003

4.1.1. Percepción del AG₃

Existen dos líneas de evidencia que indican que el AG₃ se detecta a través de la membrana plasmática de las células de la aleurona. En un primer enfoque utilizó el AG₄ (análogo de AG₃, Diagrama 2) unido a perlas de sefarosa, de manera tal que el fitorregulador no penetrara al protoplasto de la aleurona. Se observó que los protoplastos y el tejido íntegro tratados con este derivado respondían al fitorregulador con la síntesis y secreción de α -amilasa (Hooley *et al.*, 1991).

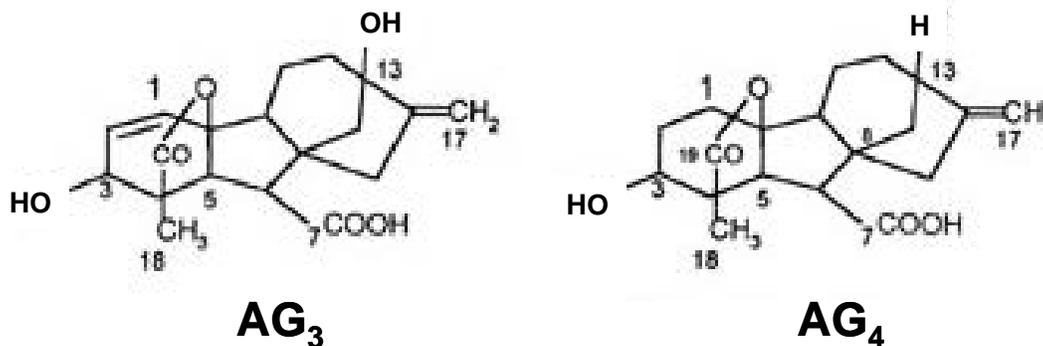


Diagrama 2. Estructura del AG₃ y su análogo el AG₄.

El otro enfoque utilizado para determinar el sitio de reconocimiento del AG₃, fue el de microinyectar el fitorregulador en el protoplasto de células de aleurona, evitando su contacto con la parte externa de la membrana plasmática. Los protoplastos tratados de esta forma no respondieron al fitorregulador; es decir, no presentaron ninguna de las respuestas tradicionales evaluadas, como la síntesis y secreción de α -amilasa, vacuolación y la expresión del gen reportero de la β -glucuronidasa fusionado a un promotor de α -amilasa (Gilroy y Jones, 1994).

Con el uso de reactivos de fotoafinidad del $^{125}\text{I-AG}_4$ se identificaron dos polipéptidos de membrana plasmática de aleurona de 18 y 68 kDa que se unen específicamente al $^{125}\text{I-AG}_4$ (Lovegrove *et al.*, 1998). Dado que ambos péptidos se marcan con el reactivo de fotoafinidad, se sugirió que el receptor al AG_3 podría ser un complejo de al menos dos proteínas.

4.1.2. Transducción de la señal

Uno de los efectos del AG_3 mejor estudiados en la aleurona es el aumento del Ca^{2+} dentro de la célula. Se sabe que la concentración de este catión se incrementa cinco veces por efecto del AG_3 (Bush, 1996). El incremento de Ca^{2+} se detecta principalmente en la periferia de la membrana plasmática y se cree que se lleva a cabo por la actividad de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (Bethke *et al.*, 1997) y por la liberación de calcio intracelular (Lovegrove y Hooley, 2000). La heterogeneidad espacial de la concentración del Ca^{2+} se genera aparentemente por los canales de Ca^{2+} modulados posiblemente por proteínas G heterotriméricas (Schroeder y Hagiwara, 1990) y por una ATPasa de Ca^{2+} (Bush y Wang, 1995) de membrana plasmática, cuyas actividades serían moduladas por el fitorregulador. Dado que el único proceso que depende de la modificación de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es la secreción de α -amilasa (Gilroy, 1996), se propone que el cambio en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no es el único elemento que dirige la respuesta del sistema al ácido giberélico.

Uno de los genes cuya expresión es regulada por AG_3 es una ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplásmico. La sobreexpresión de este gen induce la expresión

de α -amilasa en ausencia del AG₃. De forma tal que, el movimiento de Ca²⁺ producto de la actividad de esta enzima podría también resultar importante en la transducción de la señal del fitorregulador (Chen *et al.*, 1997).

Por otra parte, Chen, *et al.* (1997) encontraron que el AG₃ provoca un incremento pronunciado en la concentración de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) en la célula a los 25 min de inducción. Sin embargo, este incremento no está relacionado con el aumento del [Ca²⁺]_i (Lovegrove y Hooley, 2000). No obstante, la presencia e inducibilidad del IP₃ indica que la fosfolipasa C (PLC) está involucrada en el proceso de la transducción de la señal (Kashem *et al.*, 2000).

Además del incremento en la concentración de IP₃ citoplásmico, se encontró que los niveles de GMPc aumentan aproximadamente a las 2 h de tratamiento con AG₃. La inhibición del incremento en la concentración del GMPc disminuyó en un 50% la capacidad del sistema para producir α -amilasa. Por lo que se propuso que el GMPc puede ser un elemento más en la transducción de la señal del AG₃ (Penson *et al.*, 1996).

Otro elemento de la vía de transducción de señales identificado en la membrana plasmática de la aleurona de cebada son las proteínas G (Wang *et al.*, 1993; Jones H.D. *et al.*, 1996; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2000). A través de estudios farmacológicos con Mas7, GTP- γ -S y GDP- β -S, Jones *et al.*, (1998) demostraron que estas proteínas están implicadas en la inducción de la expresión de la α -amilasa en aleurona de avena. Por otra parte, Ueguchi-Tanaka *et al.* (2000), reportaron una mutante enana de arroz defectuosa en una subunidad G α de proteína G heterotrimérica. Esta mutante presenta una baja inducción de α -

amilasa (*Ramy1A*) y del factor de transcripción *OsGAMYB* en comparación a la silvestre.

Los procesos de fosforilación son importantes en la señalización del AG₃ en aleurona. Se sabe que el ácido okadaico (AO), un inhibidor de fosfatasa de serina-treonina suprime la respuesta de la aleurona al AG₃. Esto sugiere la participación de las fosfatasa de proteína del tipo 1 y 2A en la transducción de la señal (Kuo *et al.*, 1996).

El ácido abscísico (ABA) es un fitorregulador con un efecto antagónico al AG₃. En general, en las semillas el ABA establece y mantiene la dormancia; mientras que el AG₃ estimula la germinación (Grappin *et al.*, 2000; Rock y Quantaro, 1995). En la capa de la aleurona, el ABA promueve un incremento en la actividad de la cinasa MAP (MAPK; Knetsch *et al.*, 1996). Esta enzima forma parte de una cascada de amplificación de señales por fosforilación que desemboca en la activación de cinasas, de factores de transcripción, y de elementos de citoesqueleto entre otros (Johnson y Vaillancourt, 1994). Hasta el momento, no se ha podido comprobar si existe algún efecto de AG₃ sobre la actividad de MAPK, tan solo se ha logrado determinar que el fitorregulador reduce la acumulación del ARNm de un homólogo de esta cinasa en aleurona de avena (Knetsch *et al.*, 1996).

Ante toda esta información, es claro que el mecanismo de transducción de la señal del AG₃ y del ABA en la aleurona es complejo. De hecho, al parecer existen múltiples factores participando en él, de manera simultánea, secuencial o concertada.

4.1.3. Regulación de la expresión génica

Una respuesta inequívoca del sistema ante la presencia del AG₃ y el ABA es la expresión específica de algunos genes. El gen más estudiado en este sistema es el de la α -amilasa. Esta enzima se requiere para la degradación de la amilosa y la amilopectina del almidón del endospermo. Existen dos grupos de isoenzimas que se separan en función de sus puntos isoeléctricos (pI; Jacobsen y Higgins, 1982). La síntesis de los dos grupos de isoenzimas está dirigida por dos poblaciones separadas de ARNm, que son producto de por lo menos dos genes cada una (Lazarus *et al.*, 1985). El AG₃ promueve la acumulación de ARNm de la α -amilasa de ambos grupos de isoenzimas y el ABA la inhibe (Jacobsen y Chandler, 1988). Los genes de los diferentes grupos son regulados diferencialmente por el AG₃ (Rogers y Milliman, 1984) ya que el ARNm de la α -amilasa de pI ácido se incrementa de 10 a 20 veces durante las primeras 24 h y responde a niveles bajos del fitorregulador (aproximadamente 10^{-8} M). Por otra parte, el mensajero de la enzima de pI básico se incrementa de 50 a 100 veces de las 12 a las 16 h en presencia del AG₃ y requiere de altas concentraciones del fitorregulador (10^{-6} M).

Se sabe que la regulación de la expresión de la α -amilasa por el AG₃ y el ABA se lleva a cabo a nivel transcripcional (Jacobsen y Beach, 1985; Zwar y Hooley, 1986). Se han descrito regiones conservadas en los promotores de sus genes que les confieren inducibilidad por AG₃. Estas regiones son el complejo de respuesta a AG₃ (GARC; Gubler y Jacobsen, 1992) y el elemento de respuesta a AG₃ (GARE; Skriver, *et al.*, 1991). Los elementos de respuesta, en conjunto con

otras secuencias (llamadas elementos acoplantes) como la O2S, la caja de pirimidinas y la caja I, permiten el incremento en la transcripción de los genes de la α -amilasa de alto y bajo pl (Sutliff *et al.*, 1993).

Además, se han identificado proteínas de unión específica a los elementos de respuesta como GAB1 y GAMYB. La primera es un factor trans capaz de unirse a GARE e inhibir la transcripción de los genes de α -amilasa en ausencia de AG₃ (Rogers y Rogers, 1992). GAMYB, cuya transcripción también es inducible por AG₃, se une a GARE y regula positivamente la expresión de los genes de las enzimas (Gubler *et al.*, 1995).

El análisis de la expresión génica en la aleurona de arroz a través de microarreglos sugiere que el número de genes regulados específicamente por el AG₃ es relativamente pequeño. En este estudio se reportan 129 genes cuya expresión es inducida, mientras que la de 60 es reprimida. Los genes que se inducen por el fitorregulador están clasificados en cinco grupos de acuerdo a su función: hidrólisis, proteólisis, movilización de lípidos, transporte membranal y señalización. Asimismo, los genes cuya expresión disminuye por efecto del AG₃ están relacionados con el estrés, el metabolismo, proteólisis y metabolismo de oleosomas entre otros (Bethke *et al.*, 2006).

4.1.4. Metabolismo en la aleurona

La movilización de reservas del endospermo almidonoso depende de la capacidad de la aleurona para sintetizar y secretar las enzimas hidrolíticas necesarias para su degradación. Este proceso es energéticamente muy

demandante, ya que implica el establecimiento de condiciones adecuadas para sostener la transcripción de diversos genes, una intensa síntesis *de novo* de proteínas, así como la preparación del sistema para iniciar la secreción. Por ende, el tratamiento de la aleurona por el AG₃ induce necesariamente un incremento pronunciado del metabolismo energético.

El aumento en la actividad mitocondrial, medido como consumo de oxígeno, se incrementa pronunciadamente durante las primeras 24 h de inducción de tejido con el fitorregulador (Palma y Kermode, 2003). Al igual que otros tejidos heterotróficos (embrión y escutelo), en la aleurona, los sustratos para obtener la energía provienen de los compuestos de reserva. La composición de la reserva de la aleurona es muy similar a la de las semillas oleaginosas, ocupando los lípidos la mayor parte del volumen celular (Jones, 1969; Eastmond y Jones, 2005).

El AG₃ estimula la degradación de los lípidos y su conversión a sacarosa en la aleurona de trigo y cebada (Doig et al, 1975; Newman y Briggs, 1976). Estos trabajos también presentan evidencia sobre la estimulación de la β -oxidación y el ciclo del glioxilato. Recientemente, se determinó que el AG₃ estimula la actividad de enzimas como la acilCoA oxidasa y la 3-cetoacilCoA tiolasa (β -oxidación), la isocitrato liasa y la malato sintasa (ciclo del glioxilato) en el cultivar Himalaya y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (gluconeogénesis) en el cultivar Golden Promise (Eastmond y Jones, 2005). Además, la isocitrato liasa es regulada a nivel de transcripción (Eastmond y Jones, 2005). Este grupo propuso un modelo en el que el catabolismo de los lípidos se requiere para producir la energía y los esqueletos

carbonados requeridos para iniciar la síntesis y la secreción de las hidrolasas; así como también para generar el extenso sistema endomembranal para la secreción.

La producción de ERO está íntimamente asociada al metabolismo energético intenso en la aleurona tratada con AG₃. La capacidad de la aleurona de lidiar con estas especies ha sido estudiada principalmente asociándolas al proceso de muerte celular programada que inicia en la aleurona después de la fase de síntesis y secreción de la α -amilasa. La aleurona es capaz de contener exitosamente con las ERO durante las primeras 24 a 30 h de inducción por el fitorregulador. Esto se debe a que el AG₃ induce la expresión y actividad de diversas enzimas detoxificadoras de ERO, como la ascorbato peroxidasa (Fath *et al.*, 2001), la catalasa glioxisomal y la Mn-superóxido dismutasa (Palma y Kermode, 2003). Estas enzimas son capaces de mantener la concentración de las ERO en niveles no tóxicos para las células.

Cabe mencionar que varios de los genes y proteínas inducidos por AG₃ en aleurona recientemente identificados por microarreglos (Bethke *et al.*, 2006) están involucrados en el metabolismo energético de este tejido. Esto sugiere que es importante retomar el estudio del metabolismo básico de la aleurona, ya que también parece estar involucrado en la capacidad de respuesta al fitorregulador.

4.2. REGULACIÓN REDOX

Los puentes disulfuro son considerados como una parte importante para mantener la estructura terciaria de las proteínas. En algunos casos este tipo de enlace es el que permite la formación de la estructura cuaternaria de las proteínas

(Ghezzi, 2005). La formación de un enlace disulfuro involucra la oxidación del grupo tiol de dos cisteínas para generar un grupo cistina (Jones *et al.*, 2004). Otras formas de oxidación de estos tioles pueden considerarse como dañinas, ya que a diferencia con los disulfuros, estas son irreversibles. Un ejemplo de esto es la oxidación de un sulfhidrilo a ácido sulfónico (SO_3H). Se sabe que varias formas de oxidación de tioles son reversibles, tal como los disulfuros (intra e intermoleculares), los disulfuros mixtos, los N-nitrosotioles (SNO), los ácidos sulfénicos (SOH) y sulfínicos (SO_2H) (Ghezzi, 2005).

La reversibilidad de la oxidación de los grupos sulfhidrilo ha cobrado interés desde el punto de vista de la regulación redox. Los grupos químicos que pueden participar en la regulación funcional de las proteínas pueden ser de dos tipos: los sulfhidrilos que pueden formar disulfuros mixtos y los que se denominan tioles vecinos que pueden formar un disulfuro entre ellos.

La reacción de S-tiolación forma disulfuros mixtos con glutatión o con cisteína. En el primer caso, las proteínas glutationadas pueden formarse por oxidación directa con el glutatión, o bien por un intercambio tiol/disulfuro (O'Brian y Chu, 2005). Este tipo de disulfuro mixto se asociaba con eventos de estrés oxidativo. Sin embargo, actualmente se sabe que es una reacción que ocurre comúnmente en estados fisiológicos sin estrés (Ghezzi, 2005). La glutationilación es la principal reacción de S-tiolación intracelular, mientras que la forma predominante de disulfuro mixto extracelular es con la cisteína (O'Brian y Chu, 2005).

Los tioles vecinos son grupos sulfhidrilo de dos cisteínas que se encuentran a una distancia de enlace de aproximadamente 10 Å. Estos pueden sufrir

conversiones oxidativas reversibles para formar disulfuros intra o intermoleculares. Los disulfuros entre tioles vecinos pueden formarse entre cisteínas que se encuentran próximas en una secuencia (Cis-(X)_n-Cis, donde n=2-6), o bien por la yuxtaposición de cisteínas presentes en segmentos distantes o incluso en diferentes polipéptidos (Gitler *et al.*, 1997).

La reversibilidad de la oxidación de los grupos tiol depende de diferentes mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que protegen a las proteínas o regeneran el estado reducido de las mismas. Algunas de las enzimas que catalizan la oxidorreducción de los disulfuros mixtos o entre tioles vecinos son la glutarredoxina, la tioredoxina y las disulfuro isomerasas de proteínas. Estas enzimas contienen motivos CXXC en su sitio activo y la oxidorreducción de sus cisteínas son parte de su mecanismo catalítico (Holmgren, 1985; Holmgren, 1989).

Diferentes líneas de evidencia indican que las reacciones de óxido-reducción celulares están íntimamente involucradas en el control de diversos procesos biológicos (Yano *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004), como actividades enzimáticas, interacción proteína-proteína y unión a ADN (Jones *et al.*, 2004). La mayoría de las proteínas sensibles a regulación redox se han estudiado como casos aislados y varias de ellas se relacionan con procesos de señalización celular (Kamata y Hirata, 1999; Baty *et al.*, 2002). Las reacciones de oxidación-reducción de los sulfhidrilos están involucradas, por ejemplo, en el control de la función de factores de transcripción (Hata *et al.*, 2001), de canales y ATPasas de Ca²⁺ (Suzuki y Ford, 1999), y de elementos asociados a la secreción y función de algunas hormonas (Hata *et al.*, 2001). La modificación del estado redox de una proteína a través de la oxidación de sus grupos tioles, o bien de la reducción de

sus puentes disulfuro le brinda la posibilidad de responder rápidamente y de manera reversible a diferentes estímulos, y le da también una mayor flexibilidad en su capacidad de control, además de conferirle un enorme potencial de amplificación de su respuesta.

4.2.1. Señalización por redox

4.2.1.1. Papel de las ERO

Dado que la regulación redox involucra la oxidación reversible de residuos de cisteína, ésta puede ser mediada por las ERO (O'Brian y Chu, 2005). Las ERO funcionan como segundos mensajeros en la transducción de señales. La transmisión efectiva de la información requiere especificidad. Sin embargo, la señalización por este tipo de compuestos sin la generación de daño oxidativo sigue sin ser bien comprendida. La especificidad de los procesos biológicos se determina normalmente por características como la afinidad, la reactividad y la distribución espacial de los componentes involucrados. Para la especificidad de la señalización por redox, se requiere de generadores y sensores de ERO; así como también de macromoléculas blanco que contengan elementos oxidables, como las cisteínas o las metioninas (Hansen *et al.*, 2006).

4.2.1.2. Sistemas regulados por redox

A continuación se mencionan diversos ejemplos de proteínas que se regulan por su estado redox y que son relevantes en la bioseñalización (reconocimiento y transducción de señales) y las respuestas fisiológicas.

Con respecto a la detección de las señales extracelulares, algunos datos de la literatura sugieren que algunos receptores tienen grupos sulfhidrilo en sus sitios activos (Jia y Zhang, 2000) o importantes para promover su dimerización ante la unión de su ligando (Labrecque *et al.*, 1999). Por ejemplo, en plantas, la acumulación del ABA ante el estrés hídrico es inhibida por la adición de agentes reductores o modificadores de grupos tiol impermeables a la membrana. Esto sugiere que la proteína que percibe la señal a nivel de membrana plasmática contiene grupos sulfhidrilo extracelulares críticos para su función (Jia y Zhang, 2000).

Otro modelo de receptor sensible a modulación por grupos tiol es el SRK (S-locus receptor kinase), participante en la respuesta de autoincompatibilidad en la polinización. La autofosforilación de esta proteína es inhibida por la acción de una tiorredoxina (THL1 y THL2), previniendo la activación espontánea de la vía de señalización de la autoincompatibilidad (Cabrillac *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha documentado la activación de la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas a través de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en cardiomiocitos de rata, lo que repercute en la activación de la respuesta de este sistema al estrés oxidativo a través de ERK (Moller y Crane, 1990). Otras proteínas relacionadas a la transducción de señales y modulables por su estado

redox son las proteínas G_i , G_{α_0} y las fosfatasas de tirosina (Nishida *et al.*, 2000; Rusnak y Reiter, 2000; Chiarugi y Cirri, 2003).

Uno de los eventos mejor documentados y más ubicuos en cuanto a la respuesta celular ante distintos estímulos es el incremento del $[Ca^{2+}]_i$. Los movimientos de Ca^{2+} en la célula son promovidos tanto por los canales iónicos como por las ATPasas de Ca^{2+} . Una gran parte del estudio de la regulación redox de este tipo de proteínas se ha realizado en músculo esquelético. La contracción muscular requiere la liberación del Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y se ha documentado que este proceso es sensible al estado redox. De estos estudios, se propone un modelo para la regulación redox de los canales de Ca^{2+} , en el cual la oxidación de tioles a disulfuros en el canal permite la interconversión de su estado cerrado a abierto (Suzuki y Ford, 1999). Asimismo, se ha descrito la inhibición específica de la ATPasa de Ca^{2+} por oxidación a través del radical superóxido (Ishibashi *et al.*, 1996).

Se ha encontrado que algunos sistemas de regulación por redox responden a hormonas. En el caso de plantas, se reportó la actividad de una NADH oxidasa inducida por auxinas (Morré, 1994). Su estimulación se inhibe por reactivos modificadores de grupos tiol (Morré *et al.*, 1995a). Además, se sabe que esta enzima presenta actividad de disulfuro isomerasa de proteína (PDI), que es sensible también a los reactivos antes mencionados (Morré *et al.*, 1995b). Esta enzima no tiene actividad en presencia del NADPH, por lo que se distingue de la oxidasa del NADPH, relacionada con la explosión oxidante de defensa contra patógenos.

Otro de estos sistemas es el estoma, cuyo cierre para control de intercambio gaseoso en la hoja es regulado por ABA. Aquí los canales de Ca^{2+} son activados por ERO, cuya producción requiere NAD(P)H y es estimulada por el mismo fitorregulador (Murata *et al.*, 2001).

Diversos estudios sobre la exocitosis en diferentes sistemas revelan que la regulación redox es importante para que la exocitosis se lleve a cabo adecuadamente (Aitken *et al.*, 2004; Nardai *et al.*, 2005; Niedowicz y Daleke, 2005).

5. HIPÓTESIS

Si los cambios redox en las proteínas de la capa de aleurona son parte de la señalización y las respuestas promovidas por el AG₃, entonces se podrán detectar algunas proteínas que cambian de estado redox ante el estímulo del fitorregulador.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el AG₃ promueve cambios redox en algunas proteínas asociadas con las membranas de la capa de aleurona.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar la capacidad de respuesta de la aleurona al AG₃ ante la modificación de los grupos sulfhidrilo de la membrana plasmática.
- b) Establecer la metodología para evaluar cambios redox en proteínas membranales de la capa de aleurona.
- c) Determinar el contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas membranales de la aleurona en ausencia y presencia del AG₃.
- d) Detectar si el AG₃ induce cambios redox en algunas proteínas de la aleurona que están asociadas con las membranas.
- e) Identificar algunas de las proteínas cuyo estado redox se modifica por efecto del fitorregulador.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EFECTO DE LA MODIFICACIÓN DEL ESTADO REDOX DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA SOBRE LA RESPUESTA DE LA ALEURONA AL AG₃

Una estrategia utilizada para identificar el papel del estado redox de las proteínas en diferentes procesos fisiológicos es la de modificar artificialmente el estado redox de dichas proteínas y evaluar alguna respuesta propia del sistema modelo estudiado.

La actividad de la α -amilasa es la respuesta final y más representativa del la aleurona al AG₃. Esta representa la culminación de todos los eventos de señalización y de respuesta del tejido al AG₃ para lograr la movilización de las reservas del endospermo almidonoso. La α -amilasa es secretada al medio de incubación de las aleuronas, por lo que se puede detectar en el mismo a partir de las 12 h de incubación en presencia del AG₃. El ensayo de la actividad de esta enzima es relativamente sencillo y ha sido ampliamente utilizado para evaluar la capacidad de respuesta de la aleurona al AG₃ en diferentes condiciones.

Con la finalidad de determinar si la alteración del estado redox de las proteínas de la membrana plasmática de la aleurona repercute en la capacidad del sistema para responder al fitorregulador, se realizó la modificación química de los grupos tiol expuestos a la superficie extracelular del tejido. Para esto se utilizaron tres reactivos modificadores de grupos sulfhidrilo: el ácido ditionitrobenzónico (DTNB), el mersalil y el p-cloromercuribencensulfonato (PCMBS). Estos

compuestos tienen diferentes estructuras químicas y mecanismos de bloqueo de los grupos tiol. El primero es un disulfuro aromático que puede formar disulfuros mixtos con los sulfhidrilos de las proteínas, o bien inducir la formación de disulfuros entre tioles vecinos (Jocelyn, 1987; Gitler y Londner, 1995). El mersalil y el PCMBs son mercuriales orgánicos que forman monomercapturos (Boyer, 1959; Riordan y Vallee, 1972). La utilización de dos organomercuriales radicó en la posibilidad de que cada uno tuviera diferente acceso a las proteínas membranales debido a su estructura química.

Ninguno de los reactivos bloqueadores atraviesa a las membranas biológicas, por lo que se espera que la modificación sea únicamente en los sulfhidrilos de la capa externa de la membrana plasmática de la aleurona. De esta manera se evitaron efectos inespecíficos sobre el funcionamiento normal de la aleurona o sobre proteínas citoplásmicas de la misma.

El bloqueo de los grupos sulfhidrilo con estos reactivos se realizó mediante una preincubación del tejido por 15 min en presencia de dichos compuestos. Después de este tratamiento, el tejido se lavó profusamente con amortiguador de incubación para evitar la alteración de los grupos sulfhidrilo de las proteínas secretadas por el tejido. Después de eliminar los reactivos bloqueadores, se incubó el tejido en ausencia y presencia del AG₃ durante diferentes tiempos. Las respuestas del sistema evaluadas fueron la actividad de la α -amilasa y la viabilidad celular.

7.1.1. Actividad de α -amilasa

La actividad de la α -amilasa se determinó con el método de almidón-yodo/yodurado (I_2KI) (Chrispeels y Varner, 1967) después de 16 h de incubación. La actividad de α -amilasa detectada en el medio de incubación de aleuronas tratadas únicamente con AG_3 se consideró como la máxima capacidad de inducción de la aleurona (Figura 1). Se observó que los tres bloqueadores de sulfhidrilo utilizados produjeron un decremento de aproximadamente el 50% en la capacidad de respuesta al AG_3 .

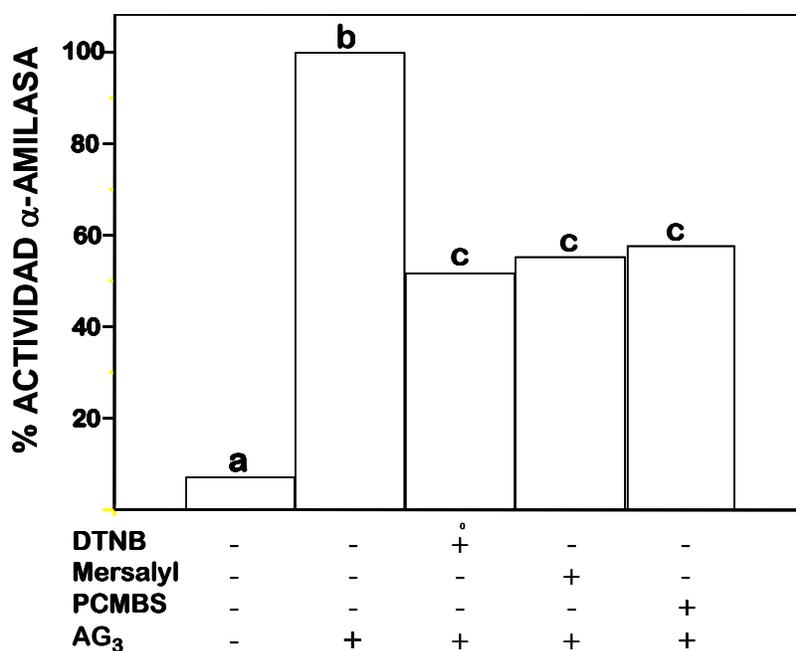


Figura 1. Efecto de los bloqueadores de sulfhidrilos que no penetran a la membrana plasmática de la aleurona sobre la actividad de la α -amilasa. DTNB 2 mM; mersalyl 50 μ M; PCMBS 150 μ M; AG_3 1 μ M. Las letras diferentes sobre las columnas representan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.01$ para el tratamiento con DTNB y Mersalyl y $p < 0.05$ para el tratamiento con PCMBS).

La similitud en la magnitud del efecto de los bloqueadores en la capacidad de respuesta del tejido al AG_3 sugiere que, aún teniendo diferencias químicas y estructurales, tuvieron el mismo acceso a los sulfhidrilos membranales. La reproducibilidad del efecto con reactivos que tienen diferente mecanismo de bloqueo demuestra que éste es específico sobre los sulfhidrilos. Estos resultados sugieren que en la membrana plasmática de la aleurona existen grupos sulfhidrilos importantes para la percepción del AG_3 . Las posibles implicaciones se discuten en el artículo.

Un posible efecto de los bloqueadores de sulfhidrilos sobre las proteínas de la membrana plasmática podría ser el de afectar la afinidad o la capacidad de unión del receptor al AG_3 . En este caso, la disminución en la actividad de la α -amilasa podría deberse a que la célula sintiera una concentración efectiva menor del AG_3 . Esto se traduciría en una menor inducción de los genes de la α -amilasa; o bien, la transcripción únicamente de los genes de las isoenzimas ácidas, que se inducen a bajas concentraciones de AG_3 . La ausencia de las isoenzimas básicas podría responder a la baja en la actividad de la enzima.

La inactivación de la α -amilasa por efecto directo del bloqueador de tioles es improbable, ya que estos compuestos se eliminaron eficientemente del tejido por lavados repetidos. Un control de esto fue que, en el caso de la preincubación con DTNB, al último lavado de las aleuronas se le adicionó una alícuota de una disolución de 1 mM de β -mercaptoetanol. La disolución no presentó absorbencia a 412 nm. La reacción del DTNB con tioles libera el anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^{2-}) que tiene un coeficiente de absortividad alto a esta longitud de onda. Esto

aseguró que no había remanentes de este reactivo que pudiera inactivar a la enzima. La alteración de la capacidad de responder al AG₃ también se pudo reflejar a nivel de la transcripción de la α -amilasa; o bien en la síntesis de la proteína. Estas posibilidades deberán explorarse experimentalmente.

7.1.2. Viabilidad

Una de las posibles razones de una disminuida capacidad de respuesta al AG₃ ante el bloqueo de los sulfhidrilos podría ser la inducción de la muerte celular inespecífica por el tratamiento. Con la finalidad de descartar esta posibilidad; así como también para evaluar otra respuesta específica del tejido al fitorregulador, se determinó la viabilidad celular a diferentes tiempos de incubación en ausencia y presencia del AG₃ (5 y 18 h) después del pretratamiento con los bloqueadores de tioles. La viabilidad se determinó por el método del 2,3,5-trifeniltetrazolio (Palma y Kermode, 2003).

Una respuesta normal de la aleurona al AG₃ es la muerte celular después de la secreción máxima de α -amilasa (Palma y Kermode, 2003). Esto se pudo corroborar pues se observó que a las 18 h en presencia del AG₃, la viabilidad de las células de la aleurona disminuyó significativamente ($p < 0.01$) (Figura 2, control). Cabe mencionar que se consideró como el 100% de viabilidad la presentada por las aleuronas incubadas 5 h en ausencia del fitorregulador y que los valores de viabilidad mayores al 100% son producto de diferencias no significativas debidas al método experimental.

El efecto de los bloqueadores de los sulfhidrilos evitó la disminución de la viabilidad en presencia del fitorregulador (Figura 2, DTNB, PCMBS). Cabe recordar que aun cuando hay un mayor porcentaje de células vivas, no se detecta el 100% de la actividad de la α -amilasa. Esto sugiere que los bloqueadores del tioles están interfiriendo con la señal del AG₃, ya que ambas respuestas se alteraron. También cabe la posibilidad de que el efecto de los bloqueadores sea retrasar ambas respuestas. Para descartar esto, se deberán evaluar las respuestas a tiempos más largos. La reversibilidad del efecto de los bloqueadores a tiempos más largos podría resultar en el retraso del establecimiento de la señal del AG₃; ya sea por la eliminación paulatina del bloqueo químico en las proteínas modificadas o por el reemplazo de las mismas.

Estos resultados permitieron corroborar la conclusión de que existen grupos sulfhidrilo en la superficie membranal de la aleurona que son relevantes para la percepción y respuesta al AG₃. Así como también sirvieron para eliminar la posibilidad de que el tratamiento con los bloqueadores de sulfhidrilo provocara la muerte del tejido.

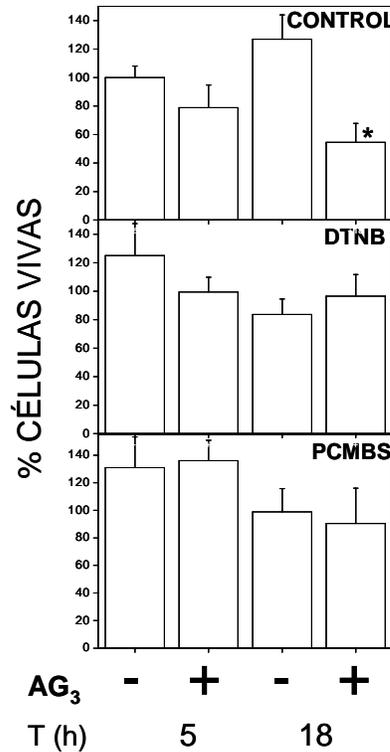


Figura 2. Efecto de la modificación de los grupos sulfhidrilo de proteínas de la membrana plasmática en la viabilidad de las células de aleurona. DTNB 2 mM; PCMBS 150 μ M; AG₃ 1 μ M. El asterisco representa la diferencia significativa presentada por este tratamiento, $p < 0.01$)

7.2 ESTABLECIMIENTO DE LA METODOLOGÍA PARA EVALUAR CAMBIOS REDOX EN PROTEÍNAS MEMBRANALES DE LA CAPA DE ALEURONA

7.2.1. Establecimiento de las condiciones experimentales para la obtención de proteína membranal solubilizada (PMS)

El estudio de las proteínas membranales se ha visto impedido debido a los problemas que se presentan para su extracción y mantenimiento en estado soluble. Por esto en primera instancia se realizó la optimización de las condiciones de extracción y solubilización de proteínas membranales de la capa de aleurona.

El procedimiento general utilizado para la obtención de las fracciones de proteína membranal solubilizada (PMS) se presenta en el Anexo Metodológico.

Para la resuspensión de la fracción microsomal se utilizaron combinaciones de detergentes no iónicos, como el Tritón X-100 y el CHAPS, y como agente caotrópico a la urea. La eliminación de fosfolípidos que pudiesen interferir con la separación de las proteínas fue necesaria. Para ello se realizó una precipitación con TCA al 10% en acetona. La selección de la mejor condición de extracción de proteínas se realizó en función de la recuperación de la proteína solubilizada y de la recuperada después de la precipitación (Tabla 2).

Se observó que la mejor extracción de proteína se obtuvo en presencia de CHAPS 4% y urea 8 M (CU (4%/ 8M), Tabla 2). Sin embargo, la proteína que se recuperó después de la precipitación fue muy baja, por lo que no resultó práctico utilizar estas condiciones. La combinación de los Tritón X-100, CHAPS y urea (TCU, Tabla 2) resultó en una baja recuperación de proteína, tanto solubilizada como precipitada. El uso de β -mercaptoetanol en la solubilización, para ayudar a la mejor extracción de las proteínas membranales fue descartado, ya que este reductor interfiere con la cuantificación de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y modifica el estado redox original de los sulfhidrilos de las proteínas. La mejor recuperación de proteína solubilizada y precipitada se obtuvo con CHAPS 2% y urea 4 M (CU (2% / 4M), Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de diferentes detergentes y urea sobre la extracción de proteínas membranales.

TRATAMIENTO	% PROTEÍNA MEMBRANAL SOLUBILIZADA (PMS)	% RECUPERACIÓN PROTEÍNA PRECIPITADA ¹
TCU (2% / 2% / 4 M)	58.8	41.0
TU (2% / 4 M)	71.4	N.D.
CU (2% / 4 M)	78.8	72.2
CU (4% / 8 M)	86.9	19.4

T, Tritón X100; C, CHAPS; U, urea. N.D. no determinada.

¹ Calculada con respecto a la PMS.

Para determinar la distribución de las proteínas entre la fracción insoluble y la solubilizada con CHAPS 2% y urea 4 M, se separaron muestras de cada una de ellas por SDS-PAGE (Figura 3A). Con el tratamiento utilizado, la proteína se repartió preferentemente a la fracción solubilizada (PMS, Figura 3A); mientras que sólo se detectaron un número reducido de bandas en la fracción insoluble (FI, Figura 3A). En cuanto a cantidad de proteína, se recuperó casi en 80% en la PMS (PMS vs FI, Figura 3A). Con el fin de determinar si la extracción de las proteínas era diferencial, se separaron por SDS-PAGE iguales cantidades de proteína de PMS y FI, respectivamente. Se comparó el conjunto de proteínas extraídas (PMS) contra las proteínas que permanecían en la FI (Figura 3B). Se detectó que las proteínas que se encuentran solubilizadas son las mismas que permanecen en baja proporción en la FI. Excepto por unos péptidos de 57, 44 y 29 kDa que sólo se presentan en la FI, el patrón de proteínas de PMS es prácticamente igual al de FI. Con estos resultados, se decidió realizar la extracción de las proteínas membranales con CHAPS 2% y urea 4M.

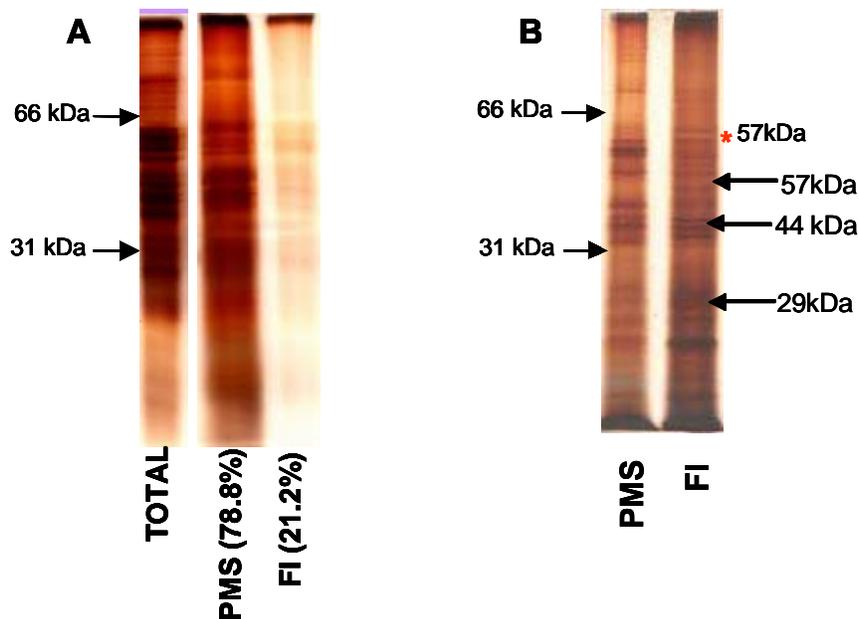


Figura 3. Efecto de la solubilización de la fracción microsomal con CHAPS (2%) y urea (4 M) sobre la abundancia y distribución de proteínas entre PMS y FI. A. Abundancia de proteínas en PMS y FI. Patrón electroforético SDS-PAGE de la proteína microsomal total (3 μ g), la PMS y la FI (se utilizaron volúmenes iguales de las fracciones PMS y FI, 2 μ l). B, Distribución de proteínas entre la PMS y FI. Patrón electroforético SDS-PAGE de PMS y FI (se utilizaron iguales cantidades de proteína, 3 μ g). Tinción con nitrato de plata.

7.2.2. Establecimiento de las condiciones experimentales para la separación de PMS de capa de aleurona por isoelectroenfoque y SDS-PAGE

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la obtención de la PMS, se procedió a establecer las condiciones adecuadas para su separación por IEF/SDS-PAGE. La descripción del procedimiento general utilizado se presenta en la sección de Materiales y Métodos del artículo publicado.

Los parámetros considerados fueron: el intervalo de pH para el isoelectroenfoque (IEF), el porcentaje de los geles de SDS-PAGE, el método de tinción de las proteínas y la cantidad de proteína cargada. Las separaciones

iniciales por IEF se realizaron en el intervalo de pH 3 a 10. Las concentraciones de acrilamida probadas en el SDS-PAGE fueron 10 y 12.5%; así como también se probaron dos técnicas de tinción con nitrato de plata. Los resultados del isoelectroenfoque, del SDS/PAGE y de las tinciones de los geles pueden observarse en la Figura 4. Comparando los geles (Figura 4A y 4B), se observó que la mejor separación de las proteínas membranales de la aleurona se llevó a cabo en geles de acrilamida al 10%. También, se detectó que un conjunto importante de proteínas se enfocó principalmente en el intervalo de pH de 4 a 7.7 aproximadamente. Un conjunto más discreto se enfocó en la zona más básica del gel.

Los geles fueron revelados por diferentes procedimientos de tinción con nitrato de plata. El primero (Figura 4A) involucra un complejo de AgNO_3 con NH_4OH y revelado con citrato (Rabilloud et al, 1994); mientras que el segundo (Figura 4B) incluye una sensibilización con ditionita (Rabilloud et al, 1988), previa a la tinción con AgNO_3 y revelado con Na_2CO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Los mejores resultados, es decir mejor definición y menor fondo, se obtuvieron mediante el segundo procedimiento.

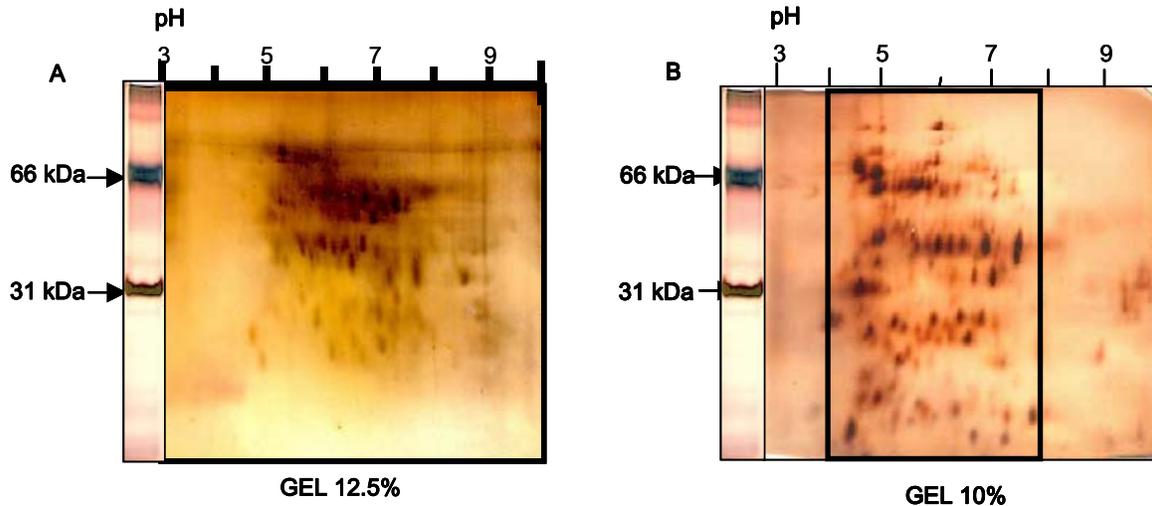


Figura 4. Comparación de condiciones de concentración de poliacrilamida y método de tinción con plata en la separación de PMS por IEF/SDS-PAGE. A: SDS-PAGE 12.5% acrilamida y tinción con $\text{AgNO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$. B: SDS-PAGE 10% acrilamida y tinción de nitrato de plata con sensibilización con ditionita. Las tiras de acrilamida con un gradiente de pH inmovilizado empleadas tuvieron un intervalo de pH 3-10. Se utilizaron muestras de $100 \mu\text{g}$ de PMS. El recuadro en B muestra la zona de pH donde se enfocaron principalmente las PMS.

Los primeros geles realizados presentaron un alargamiento vertical en las manchas de proteína, sugiriendo que había un problema con el enfoque de las proteínas, o bien, la presencia de algún contaminante en los amortiguadores del SDS-PAGE. Sin embargo, al separar muestras con menor cantidad de proteína, se observó que el alargamiento disminuyó, por lo que esta deformación se debió a un exceso en la cantidad de proteína cargada. En la Figura 5 se muestra un ejemplo. En el recuadro de la Figura 5B, se observa una mancha alargada verticalmente; no obstante, al separar la misma muestra en menor cantidad (Figura 5A) se ve que en realidad son dos manchas de proteína, que ahora se definen mejor. Por ello, en los subsecuentes experimentos se utilizaron $50 \mu\text{g}$ de proteína.

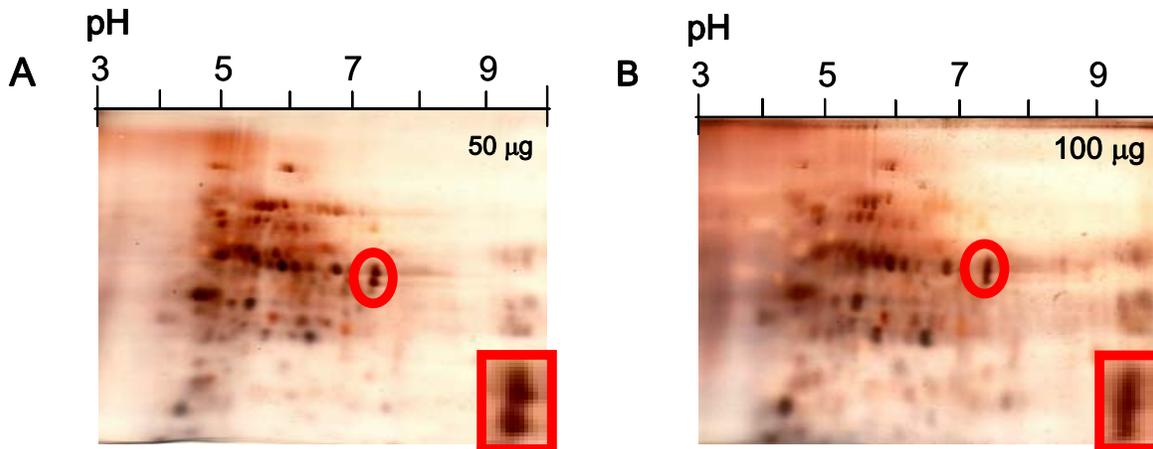


Figura 5. Efecto de la cantidad de proteína cargada sobre la resolución de manchas de proteína en el IEF/SDS-PAGE. A, IEF/SDS-PAGE gel 10% con 50 μg de PMS. B, IEF/SDS-PAGE gel 10% con 100 μg de PMS. Tinción con nitrato de plata.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la separación de proteínas por IEF-SDS-PAGE, se prepararon y separaron las muestras de PMS de aleuronas tratadas en ausencia y presencia de ácido giberélico. La obtención de las capas de aleurona y el tratamiento se describen en el Anexo Metodológico. Se realizaron dos experimentos independientes con dos réplicas para cada tratamiento.

La imagen de los geles generados de cada uno de los tratamientos se capturó en un equipo FLOUR-S Multiimager (programa Quantity One) y se analizaron por medio del programa PD-QUEST. El programa permitió la generación de un gel maestro con el que se pudo determinar el número de manchas, sus coordenadas y diferencias en intensidad. Este tipo de análisis permitió conocer qué tan reproducibles resultaron los experimentos, así como también brindó un patrón de comparación para cada tratamiento.

Con este mismo tipo de análisis se compararon geles representativos de cada tratamiento (-AG₃ vs +AG₃), para detectar las manchas de proteínas comunes para ambos tratamientos, las que cambiaron en intensidad, así como aquellas que sólo se encontraban en uno de los tratamientos. En la Figura 6, se muestran geles representativos de cada uno de los tratamientos.

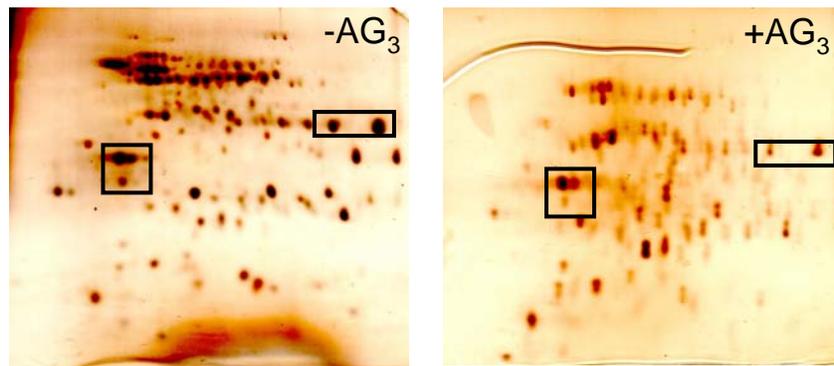


Figura 6. Separación por IEF/SDS-PAGE de PMS de capas de aleurona incubada en ausencia y presencia del AG₃. Isoelectroenfoque en tiras de gradiente inmobilizado pH 4-7, geles de poliacrilamida al 10%, 50 µg PMS, tinción con nitrato de plata. Los recuadros muestran manchas de referencia entre los dos patrones electroforéticos.

Cabe mencionar que el número de manchas de proteína detectadas en el tratamiento con AG₃ fue importantemente menor que el detectado en ausencia del fitorregulador. La disminución en el número de proteínas podría deberse a que la aleurona tratada con el AG₃ inicia una degradación de sus proteínas para sostener la síntesis *de novo* que permitirá la producción de hidrolasas para la movilización de reservas. Una parte de estas proteínas pueden provenir de las vacuolas de almacén de proteínas y otras podrían ser parte del recambio de proteínas ya existentes en las células de la aleurona. El cambio en la composición protéica de las membranas de las aleruonas tratadas con el AG₃ también podría responder a

la necesidad de un cambio hacia un sistema principalmente secretor. Además se detectaron proteínas cuya presencia es independiente del tratamiento con AG₃ (Figura 6, recuadros), que sirvieron como referencia para la alineación y comparación de los patrones electroforéticos.

7.2.3. Establecimiento de las condiciones experimentales para la detección de grupos sulfhidrilo en PMS

7.2.3.1. Marcaje de grupos sulfhidrilo con monobromo bimano (mBrB) *in vitro*

Para este procedimiento, las proteínas membranales fueron aisladas de la fracción microsomal de aleuronas incubadas por 5 h en ausencia y presencia de AG₃. Estas PMS fueron reducidas con ditioneitol (DTT) y marcadas con el mBrB. El monobromo bimano es una sonda fluorescente que reacciona con los tioles de las proteínas (Wright y Viola, 1998). Para detectar los grupos que *in vivo* se encontraban formando grupos disulfuro, se realizó la alquilación de los grupos tiol con N-etilmaleimida (NEM). Dado que los grupos sulfhidrilo de las proteínas pueden combinarse con compuestos que contienen un doble enlace activado para formar tioéteres, el uso de la NEM permitió formar un derivado alquilo estable con los tioles de las proteínas (Gltler *et al.*, 1997, Riordan y Vallee, 1972). Los resultados se muestran en la Figura 7. En los carriles 1 y 3 se pueden observar todas las proteínas que contienen grupos sulfhidrilo, dado que las proteínas fueron totalmente reducidas antes de la adición del mBrB. En el caso de las proteínas aisladas de tejido incubado con AG₃, no se logró distinguir con precisión las

bandas de proteína marcadas (carril 3, Figura 7). En los carriles 2 y 4, se aprecian las proteínas que se encontraban formando puentes disulfuro. Se observó que existe un mayor número de estas proteínas en el caso de las proteínas de tejido no inducido (carril 2, Figura 7), mientras que en el de tejido tratado con AG₃ (carril 4, Figura 7) se detectaron alrededor de 8 bandas conspicuas que se encontraban en estado oxidado (S-S). En el carril 5 (Figura 7) se muestra un control en el que las proteínas bloqueadas con NEM no fueron reducidas antes del marcaje, con lo que se puede observar que el NEM está reaccionando eficientemente con los grupos sulfhidrilo libres.

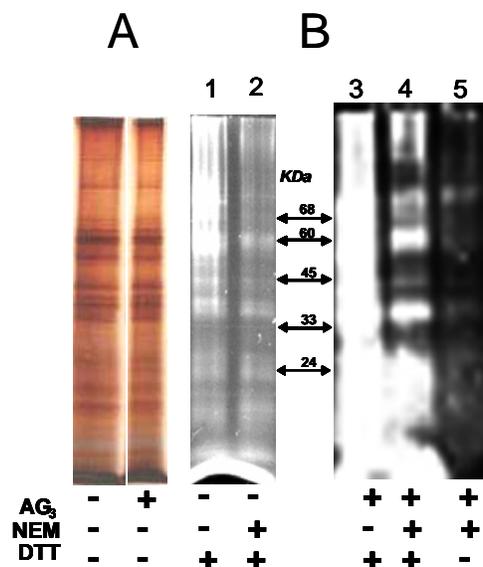


Figura 7. Marcaje de grupos sulfhidrilo de PMS con monobromo bimano (mBrB) *in vitro*. A. Patrón electroforético SDS-PAGE de PMS (5 μ g) de aleuronas incubadas 5 h en ausencia y presencia de AG₃ teñidas con nitrato de plata. B. Patrón electroforético SDS-PAGE de PMS (5 μ g) de aleuronas incubadas en ausencia y presencia de AG₃ con mBrB *in vitro* detectadas por incidencia de luz UV en Fluor-S Multilmager. Según se indica en la figura: 1 μ M AG₃, 25 mM NEM 15 min al término de la incubación, 5 mM DTT.

Desafortunadamente, este tipo de experimento no permitió calcular por densitometría el contenido de grupos sulfhidrilo en cada tratamiento. Esto se debió a que la intensidad de fluorescencia de las bandas fue muy tenue, por lo que se debieron captar las imágenes con distintas condiciones de exposición para poner de manifiesto las diferencias cualitativas.

7.2.3.2. Marcaje de sulfhidrilos con mBrB durante la homogenización

Una de las desventajas que presentó el marcaje *in vitro* de los grupos sulfhidrilo fue que únicamente se pudo hacer evidente el total de sulfhidrilos y disulfuros (bloqueo con NEM). Sin embargo, no es un método que detecte los grupos tiol en su forma original *in vivo*. Por esto realizamos el marcaje de los tioles durante la homogenización de las aleuronas (Anexo Metodológico). Posteriormente, las PMS marcadas de este modo se separaron por SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la Figura 8.

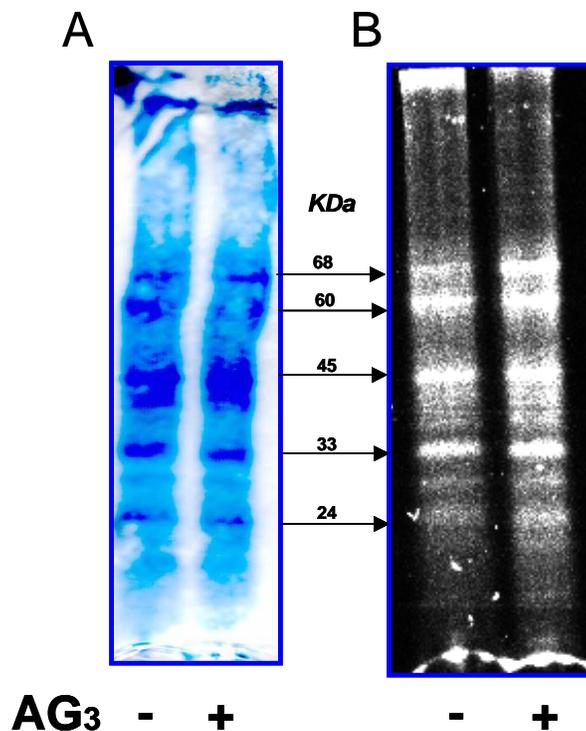


Figura 8. Marcaje de sulfhidrilos con mBrB durante la homogenización. Patrón electroforético SDS-PAGE de PMS (10 μ g) de aleuronas tratadas en ausencia y presencia de 1 μ M AG₃. A, Tinción con Azul de Coomasie. B, Detección de bandas de proteínas marcadas con mBrB con luz UV.

Se observó que este procedimiento de marcaje brindó una mejor resolución de las bandas de proteína, además de que permitió detectar los grupos tiol en su estado redox original. Resultó evidente que los patrones de proteínas con sulfhidrilos de ambos tratamientos (en ausencia y presencia del AG₃) son muy similares. Se detectó un patrón parecido de proteínas marcadas a las encontradas como disulfuros mediante el marcaje *in vitro*. Así como también se detectó un discreto incremento en la fluorescencia de algunas bandas de proteína de tejido tratado con AG₃.

De los experimentos realizados con mBrB, se pudo observar que aún cuando logramos obtener una mejor resolución de las bandas de proteínas

marcadas, el marcaje no es estable con el paso del tiempo. Después de 48 h de realizada la obtención de las proteínas membranales, ya no fue posible distinguir las proteínas marcadas en los geles de SDS-PAGE. Asimismo, fue imposible detectar fluorescencia alguna después de la separación de las proteínas por IEF/SDS-PAGE.

7.2.3.3. Marcaje de grupos sulfhidrilo con ^{14}C -N-etilmaleimida (^{14}C -NEM) *in vivo*

Debido a la inestabilidad de la sonda fluorescente, se procedió a realizar el marcaje de los grupos sulfhidrilo con ^{14}C -NEM. En primera instancia, se añadió el compuesto radiactivo durante los últimos 30 min de la incubación de las aleuronas en ausencia y presencia del AG_3 . Sin embargo, la incorporación de marca en proteínas fue muy baja; lo que implicaba tiempos de exposición en placa fluorográfica muy prolongados. Se optó entonces por llevar a cabo el marcaje adicionando ^{14}C -NEM a las aleuronas congeladas con nitrógeno líquido, como se describió anteriormente para el mBrB. Una vez obtenidas las proteínas membranales, fueron separadas por SDS-PAGE. Los geles fueron tratados con una disolución que contenía 55% de ácido acético, 0.4% de PPO, 15% de etanol y 30% de xileno, con el propósito de intensificar la señal del ^{14}C para la exposición en placa fotográfica. Después de una exposición de 20 días, se reveló la placa y se muestra en la Figura 9.

El patrón de proteínas marcadas con este método fue muy similar a aquel encontrado con la sonda fluorescente. Se observaron bandas de proteína cuya

intensidad de marcaje disminuyó en presencia del fitorregulador, como la de 68 KDa. Asimismo, las bandas de 24 y 10 KDa presentaron un ligero incremento en intensidad. No obstante, al igual que en el caso del mBrB, no fue posible detectar cambios pronunciados en la intensidad de marcaje entre ambos tratamientos (- y + AG₃).

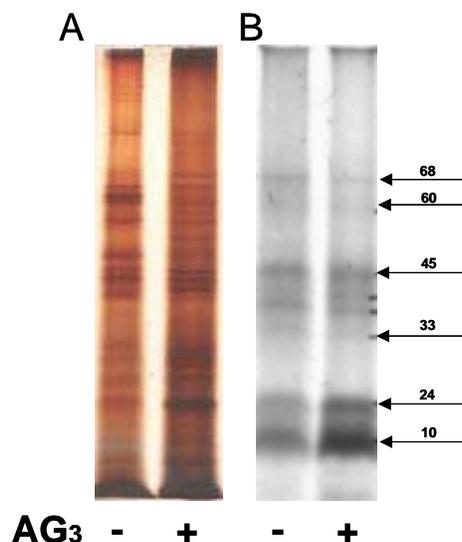


Figura 9. Marcaje de grupos sulfhidrilo con ¹⁴C-NEM *in vivo*. Patrón electroforético SDS-PAGE de PMS (10 µg) de aleuronas tratadas en ausencia y presencia de 1 µM AG₃. A, Tinción con nitrato de plata. B, Fluorografía de PMS marcadas con ¹⁴C-NEM; 20 días de exposición.

7.2.3.4. Marcaje de grupos sulfhidrilo con yodo-acetil[¹²⁵I] tirosina (IA¹²⁵IT)

La síntesis del IA¹²⁵IT, el marcaje de las proteínas y la determinación cuantitativa de los grupos sulfhidrilo se realizó conforme a la metodología reportada por Gitler et al. (1994) y el procedimiento se detalla en el artículo publicado. Los resultados de estos experimentos mostraron un incremento significativo en el contenido de grupos sulfhidrilo en las proteínas membranales de

las aleuronas (control, 27.16 ± 4.14 pmol SH / mg proteína; con AG₃, 58.34 ± 13.24 pmol SH / mg proteína; media \pm DE, n = 6, p < 0.001). Cabe mencionar que la cuantificación del contenido de grupos sulfhidrilo también se realizó con el DTNB y con ¹⁴C-NEM. Los resultados fueron similares, no obstante, la sensibilidad y reproducibilidad de estos métodos no fueron muy buenas.

Las proteínas membranales de aleurona marcadas con IA¹²⁵I también se separaron por SDS-PAGE y los geles se expusieron en placa fotográfica. Aún cuando se probaron diferentes tiempos de exposición no se logró obtener una buena resolución de las bandas (Figura 10). Sin embargo, fue posible observar que hubo un mayor marcaje en las proteínas membranales de aleuronas incubadas en presencia del fitorregulador. Dado que el marcaje se realizó en presencia de un reductor, la mayor intensidad del marcaje refleja un mayor número de grupos tiol disponibles al reactivo.

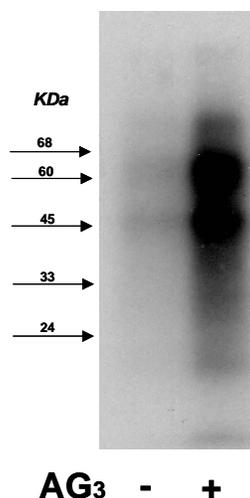


Figura 10. Marcaje de grupos sulfhidrilo con yodo-acetil[125 I] tirosina (IA 125 IT). Placa fotográfica del patrón electroforético SDS-PAGE de proteína microsomal (10 μ g) de aleuronas tratadas 5 h en ausencia y presencia de 1 μ M AG₃ y marcadas con IA 125 IT.

De los resultados obtenidos del marcaje de grupos SH por distintas metodologías (mBrB *in vitro* e *in vivo*, 14 C-NEM e IA 125 IT) fue posible distinguir consistentemente un grupo pequeño de proteínas con sulfhidrilos, el cual se pudo detectar tanto en la aleurona que ha sido tratada con el fitorregulador como en su ausencia. Se detectó un discreto incremento en la fluorescencia de algunas bandas de proteína de tejido tratado con AG₃; sin embargo, los cambios en el estado redox de estas proteínas fueron muy sutiles. La cuantificación más confiable de grupos sulfhidrilo se llevó a cabo con IA 125 IT, aunque los resultados de los demás métodos también sugieren el incremento en el contenido de sulfhidrilos en las proteínas membranales de tejido tratado con AG₃.

El hecho de que los cambios en el estado redox de estas proteínas haya sido muy sutil puede deberse a que las metodologías utilizadas no sean lo suficientemente sensibles para distinguir los cambios contundentemente.

Asimismo, es posible que los elementos que promuevan y mantengan el cambio en el estado redox de estas proteínas se estén perdiendo a lo largo de la obtención de las proteínas membranales, además de que hay que considerar que estos cambios pueden ser reversibles.

Ante estos resultados y la imposibilidad de detectar el marcaje fluorescente de las proteínas en sus grupos tiol después de una separación por isoelectroenfoque y SDS-PAGE, se optó por enriquecerlas a través de una resina de afinidad por grupos sulfhidrilo (THIOBOND, PAO-sefarosa), para posteriormente separarlas en una electroforesis de doble dimensión (IEF/SDS-PAGE).

7.2.4. Establecimiento de las condiciones experimentales para la obtención de una fracción enriquecida de PMS con grupos sulfhidrilo

Como ya se mencionó, la estrategia para obtener una fracción enriquecida de PMS con grupos sulfhidrilo fue la de utilizar una resina de afinidad por dichos grupos. La resina utilizada (THIOBOND, PAO-sefarosa) fue sefarosa unida a grupos de óxido de fenilarsina (PAO). El procedimiento detallado se presenta en el artículo publicado.

Una de las modificaciones realizadas al protocolo sugerido por el fabricante fue sobre la eliminación de la proteína inespecíficamente unida a la resina. Para esto, se recomendaba realizar dos lavados con el amortiguador de elución con 1 mM de β -mercaptoetanol. Sin embargo, en experimentos previos se había detectado que dos lavados no eran suficientes para limpiar adecuadamente la

resina. Para asegurar que toda la proteína eluida de la columna estaba fuertemente unida a través de sus grupos tiol, se realizaron 6 lavados. La elución final se llevó a cabo con DTT, que aunque es un reactivo que inactiva la resina para posterior uso, es el reductor más eficiente para este proceso (Gitler *et al.*, 1997).

Para evaluar la eficiencia de los lavados de la resina, se conservaron las fracciones de proteína no unida, los lavados 1, 3 y 6; así como una pequeña fracción de la proteína unida específicamente. Alícuotas similares de estas fracciones fueron separadas por SDS-PAGE (Figura 11).

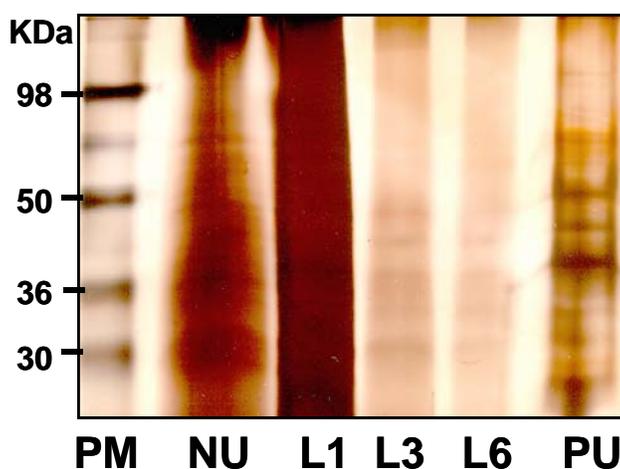


Figura 11. Patrón electroforético de SDS-PAGE de proteínas contenidas en las diferentes fracciones obtenidas de la resina PAO-sefarosa. (PM: pesos moleculares, NU: proteína no unida, L: proteína en los lavados 1, 3 y 6, PU, proteína unida a la resina). La proteína de estas fracciones (excepto la proteína eluida) fue precipitada con 10% de TCA en acetona y resuspendida en amortiguador de muestra para SDS-PAGE. Una alícuota de cada una de estas fracciones fue separada por SDS-PAGE.

Se observó que con seis lavados de la resina se eliminó gran parte de la proteína inespecíficamente unida, por lo que en lo sucesivo el procedimiento se

realizó en estas condiciones. Cabe mencionar que no se realizó la determinación de la cantidad de proteína obtenida de la elución de la columna, dado que ésta es muy pequeña; aunque suficiente para obtener buena resolución en su separación en dos dimensiones.

7.2.5. Establecimiento de los parámetros de análisis de patrones electroforéticos en dos dimensiones a través del programa PD-QUEST

La separación por IEF/SDS-PAGE de la proteína membranal con sulfhidrilos se realizó por duplicado con tres muestras independientes en las condiciones anteriormente optimizadas. Los seis geles obtenidos para cada tratamiento se utilizaron para generar un gel maestro por medio del programa PD-QUEST. En cada caso, uno de los geles fue eliminado, debido a un alto fondo en la tinción con plata. Los geles se muestran en la Figura 12.

Se tomó en consideración un error del 5% de diferencia en peso molecular para asignar la identidad de manchas en la comparación de los dos tratamientos. Este porcentaje se calculó a través de la diferencia de pesos moleculares obtenidos de los estándares (3 repeticiones).

En la Tabla 3 se presentan los resultados del análisis con respecto al número de manchas.

Tabla 3. Número de manchas de proteína presentes en los patrones electroforéticos de proteínas membranales con grupos sulfhidrilo.

	-AG ₃	+AG ₃
	No. de manchas	
Proteínas presentes en ambos tratamientos	85	85
Específicas ¹ (presentes sólo en un tratamiento)	26	15
TOTAL	111	100

¹ Proteínas enmarcadas en la figura 12.

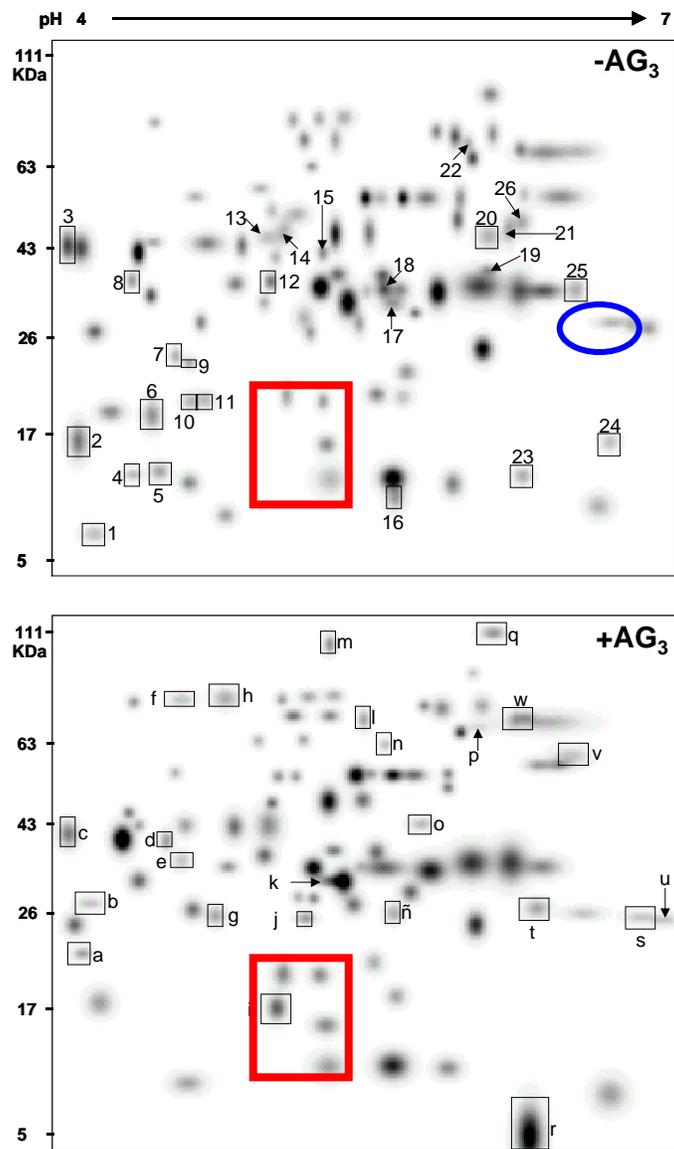


Figura 12. Patrones electroforéticos de IEF/SDS-PAGE de PMS con grupos sulfhidrilo de aleuronas incubadas en ausencia y presencia del AG₃. Imágenes generadas como patrón a través de PD-QUEST. Las manchas de proteína señaladas con números representan las proteínas detectadas exclusivamente en el tratamiento sin AG₃ y con letra se señalan aquellas detectadas exclusivamente en el tratamiento con AG₃. El recuadro grande muestra la zona analizada en la figura 14. El óvalo muestra una zona de enfoque deficiente (Figura 14).

Se pudo observar la coincidencia total en el número de manchas de proteína que se encuentran en ambos tratamientos. Al realizar el análisis de identidad, encontramos que en 14 de las manchas presentes en ambos tratamientos hubo una diferencia en peso molecular mayor al 5%. Sin embargo, tomando en cuenta el punto isoeléctrico y la posición relativa del entorno, se pudo concluir que todas ellas se encuentran en ambos tratamientos. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 13.

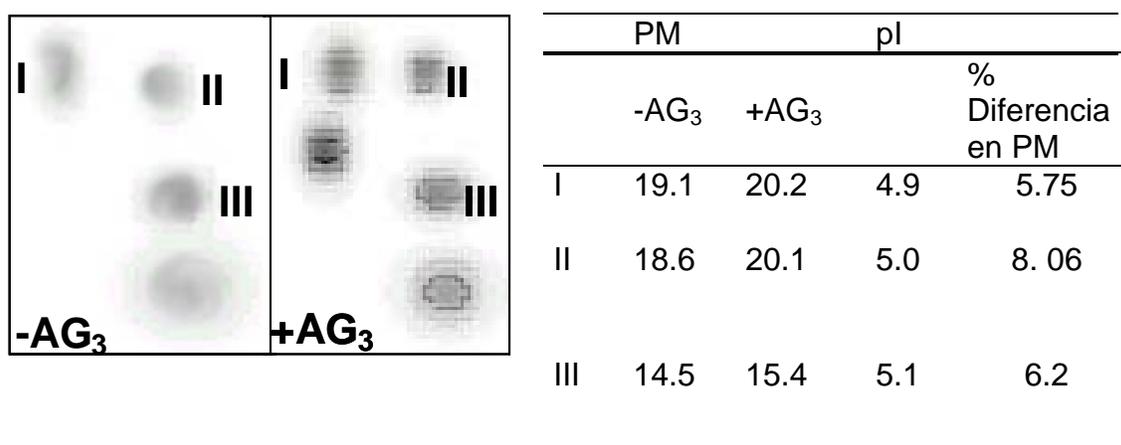
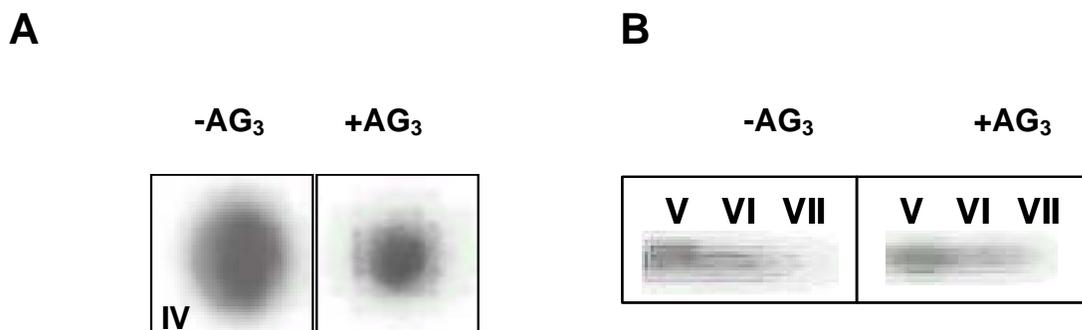


Figura 13. Identidad entre proteínas que presentan diferencia en peso molecular mayor al 5% asignada de acuerdo a su pI y entorno.

Resulta importante resaltar que en cuanto a cambios en la intensidad sólo se encontró diferencia, más de dos veces en intensidad, en 9 manchas (ejemplo en la Figura 14 A). Esto sugiere que el error en el cargado de los geles es mínimo, por lo que la diferencia en la intensidad de estas proteínas podría deberse al tratamiento. Cabe mencionar que tres de estas manchas de proteína se encuentran en una región de bajo enfoque, por lo cual es difícil asegurar que realmente sufrieron alteración en la intensidad (ejemplo en la Figura 12 y 14 B).



Cambio de intensidad		Bajo enfoque			
Intensidad (PPM) ¹		Intensidad (PPM) ¹			
	-AG ₃	+AG ₃			
IV	12011	5997	V	26311	3604
			VI	25741	3604
			VII	15339	3931

Figura 14. Ejemplos de proteínas que presentaron cambios de intensidad y bajo enfoque. A. Cambio de intensidad en manchas de proteína. B. Zona de enfoque deficiente. ¹ PPM: partes por millón

Las proteínas representadas en estas imágenes son las proteínas que contienen grupos sulfhidrilo. Sin embargo, dado que las muestras de proteína fueron reducidas antes de ser separadas por la columna, resulta imposible saber su estado original *in vivo*. Las proteínas que son inducidas por efecto del AG₃ podrían ser producto de al menos tres procesos: 1) el reclutamiento del citoplasma hacia la membrana por efecto de la señal, 2) su inserción en la membrana por el recambio de la misma, también producto de la señal del AG₃ y 3) cambios conformacionales en la proteína que exponen sus grupos sulfhidrilo. Sin embargo, independientemente del mecanismo por el cual se detectan en las membranas, el hecho de que tengan grupos sulfhidrilo y la evidencia existente sobre proteínas importantes en la respuesta al fitorregulador que son modulables por su estado

redox, hace factible que algunas de ellas pudieran estar participando en el proceso de señalización y/o respuesta de la aleurona al AG₃.

Por otra parte, resultó sorprendente que existan 27 proteínas que se encuentran tan solo en las membranas de aleuronas no tratadas. Esto sugiere que el AG₃ promueve 1) su pérdida de la membrana o 2) cambios en la exposición de sus sulfhidrilos. La primera posibilidad puede deberse a que estas proteínas son importantes para el mantenimiento adecuado del sistema en estado seco o para la protección de elementos importantes para su función, pero no se requieren más al iniciarse la germinación. En aleurona se ha reportado que ante el estímulo del AG₃, la síntesis *de novo* de proteína es redirigida para iniciar la producción de otras proteínas, principalmente α -amilasa (Mozer, 1980). Entonces, sería factible que las proteínas que ya no se detectan ante la inducción sean catabolizadas para promover la síntesis de proteínas importantes para la movilización de reservas.

En el segundo caso, las proteínas podrían haber sido oxidadas. El cambio de conformación promovido podría hacerlas insensibles a la reducción exógena. También, cabe la posibilidad de que hayan sido oxidadas irreversiblemente. Esto explicaría el hecho de que ya no sean susceptibles a unirse a la resina de PAO-sefarosa.

Considerando sólo las proteínas con grupos sulfhidrilo que ya no están presentes en el mapa proteómico de membranas tratadas con AG₃, sería interesante explorar también la posibilidad de que estas sean fragmentos de proteínas dañadas, que son reemplazadas ante la inducción por AG₃ para tener un sistema íntegro.

El análisis de los patrones electroforéticos permitió confirmar que las proteínas membranales con grupos tiol en la aleurona representan un conjunto discreto de manchas. Se observó un mapa proteómico de proteínas (85) que se encuentran en las membranas de la aleurona independientemente del tratamiento dado al tejido.

El tratamiento con el fitorregulador causó tanto la inducción como la eliminación de ciertas proteínas. Dado el número de proteínas eliminadas con respecto a las inducidas, es factible que el AG₃ en cierta medida promueva el recambio de varias de ellas.

También resultó notable que 36% de las proteínas inducidas por el tratamiento con AG₃ sean de alto peso molecular (mayores de 50 Kda), mientras que de las que son eliminadas sólo el 3.7% están sobre este peso molecular.

El hecho de que sea posible distinguir consistentemente un grupo pequeño de proteínas con sulfhidrilos vecinos abre la posibilidad de evaluar si estas pudiesen estar modificándose en su estado redox en respuesta al fitorregulador.

7.3. EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE EL ESTADO REDOX DE LAS PROTEÍNAS MEMBRANALES DE LA CAPA DE ALEURONA

7.3.1. Contenido de sulfhidrilos en proteínas microsomales (ARTÍCULO)

7.3.2. Detección de posibles blancos de regulación redox (ARTÍCULO)

7.3.3. Identificación de las proteínas que modifican su estado redox por efecto del AG₃

La estrategia experimental empleada en este trabajo permitió detectar proteínas que tuviesen un cambio redox en presencia del AG₃. Estas proteínas se muestran en la tabla 1 del artículo publicado. Se lograron detectar 22 proteínas que cambian de estado redox por efecto del fitorregulador. Sin embargo, no fue posible realizar la secuenciación por espectrometría de masas (EM) de todas las proteínas (MALDI-ToF o Nanospray QqTOF). Esto se debió principalmente a que la cantidad de muestra contenida en los fragmentos del gel de acrilamida que se envió a procesar para secuenciación fue muy pequeña. Cabe recordar que estas proteínas se lograron detectar en los geles únicamente a través de una tinción con plata. La cantidad de proteína en las muestras que se tomaron de geles preparativos (14 X 14 cm) no fue suficiente para el proceso de secuenciación, aún cuando se juntaron varias muestras de la misma proteína.

Las manchas de proteína para las que se pudo generar secuencias parciales por EM fueron la 6 y la 13 que se redujeron por el AG₃ y la E que se oxidó (Tabla 1 del artículo; Figura 15).

En todos los casos se tuvo que hacer uso de un análisis de fragmentación por nanospray MS/MS. El resultado de este procedimiento genera fragmentos pequeños de secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos se utilizan para realizar la búsqueda de la identidad de la proteína en los bancos de datos públicos.

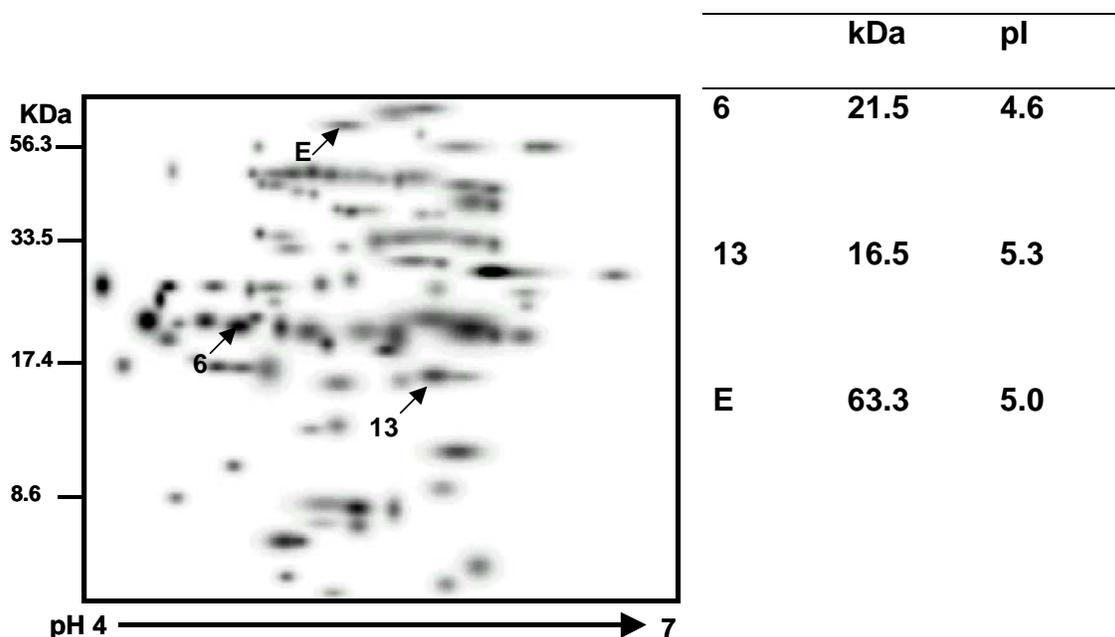


Figura 15. Proteínas microsecuenciadas por Nanospray MS/MS. Patrón electroforético de IEF/SDS-PAGE de proteínas membranales con grupos sulfhidriilo de aleuronas tratadas con AG₃. Se presentan los pesos moleculares y pI calculados a partir de los patrones electroforéticos.

El análisis de las secuencias parciales obtenidas se realizó a través de la herramienta de BLAST de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Las proteínas analizadas correspondieron a una proteína de la familia de proteínas con manos EF de unión a Ca²⁺, una fructosa 1,6 bisfosfato aldolasa y una piruvato carboxilasa. Dado que para cada una de estas proteínas hay por lo

menos dos secuencias parciales, el criterio de selección fue el de encontrar las dos secuencias en análisis independientes. Para cada uno de ellos se muestran los parámetros de Score y valor de E (expectación). Cabe mencionar que estos valores no son muy buenos, ya que únicamente se están comparando fragmentos pequeños de secuencia. Sin embargo, los porcentajes de identidad para dichas secuencias y la coincidencia de las dos secuencias son aceptables.

Tabla 4. Análisis bioinformático de las secuencias parciales de las proteínas 6, 13 y E obtenidas por Nanospray MS/S.

Proteína	SECUENCIAS OBTENIDAS	SIMILITUD CON	PM aprox (kDa)	ORGANISMO/ No. Acceso	No. sec.	Score	Valor E	% identidad
6	1: TSVFYSLQNWR	Familia de proteínas con dominios mano EF de unión a calcio	30-35	<i>Oryza sativa</i> / AB621877.1	1	40.9	0.008	100
	2: FQAADR			<i>Arabidopsis thaliana</i> / At5g04170	2	22.3	2049	100
					1	33.7	1.2	81
					2	22.3	2049	100
13	1: MSSLNVENVED	Fructosa 1,6 bisfosfato aldolasa	30-40	<i>Zea mays</i> / PO8440	1	28.6	41	72
	2: QLSLDQNAQ			<i>Oryza sativa</i> / AB665931.1	3	34.1	0.9	83
					1	28.2	56	88
					3	30.8	9.5	75
	3: VTPELLAEYTVR			<i>Triticum aestivum</i> / CAD12665.1	2	27.8	67	88
					3	26.9	134	83
E	4: GELAGTDW	Piruvato descarboxilasa	60-70	<i>Zea mays</i> / AAL99745	1	26.5	181	77
	1: LfvPEGHPLQ				2	30.3	13	81
	2: TLGVPDFSQELVR							

De acuerdo a los pesos moleculares aproximados de las proteínas reportadas, únicamente la piruvato descarboxilasa (proteína E) presentó coincidencia con el intervalo de peso molecular reportado para estas proteínas (Figura 15 y Tabla 4). Las otras dos proteínas presentaron pesos moleculares calculados menores a los reportados para sus correspondientes proteínas. Por lo que es posible que experimentalmente se hayan recuperado fragmentos de las proteínas

La identificación de dos proteínas relacionadas con el metabolismo básico de la aleurona concuerda con la importante activación del metabolismo de la aleurona ante la inducción con el AG₃. Sin embargo, dichas proteínas en principio son solubles. Esto plantea dos posibilidades: 1) que estas proteínas pudieran estar inespecíficamente unidas a las fracciones membranales utilizadas o 2) que aún siendo solubles, estas fueran reclutadas de forma específica hacia las membranas como un mecanismo de regulación. Para descartar la primera posibilidad sería necesario realizar un lavado de las fracciones microsomales con una solución de fuerza iónica moderada que provocara el desprendimiento de proteínas débil e inespecíficamente unidas a las membranas.

En un estudio proteómico realizado en nuestro grupo para detectar proteínas microsomales que se inducen por el AG₃, se han identificado una gran cantidad de proteínas principalmente relacionadas con el metabolismo de la aleurona. Las proteínas identificadas en este trabajo fueron la superóxido dismutasa de Mn glioxisomal; la subunidad beta del proteasoma 20S; la β-alanina sintasa; la glioxalasa I; la oxalato oxidasa 2; una proteína de la familia de las cupinas; una dextrinasa límite y una globulina del embrión. Las proteínas identificadas sugieren que el AG₃ incrementa, antes de la secreción de la α-amilasa, la actividad de diversas vías metabólicas, como la gluconeogénesis, la β-oxidación y el ciclo del glioxilato, que son importantes para una movilización eficiente de las reservas (Zamudio, 2007; Elias, 2007). Asimismo, existe evidencia sobre la regulación redox de varias proteínas relacionadas con el metabolismo energético (Ferne *et al.*, 2004; Slesak *et al.*, 2007).

7.3.4. Proteína blanco identificada: Proteína con manos EF de unión a Ca²⁺

La proteína que tiene homología con las proteínas de la familia con manos EF de unión a Ca²⁺ resultó de particular interés debido a que uno de los eventos más relevantes en la respuesta de la aleurona es el incremento en la concentración de calcio intracelular (Bush, 1996). El incremento de calcio se ha relacionado con proteínas cuya activación depende de este ión, como la calmodulina y las cinasas dependientes de calcio (CDPK) en la vacuola (Bethke y Jones, 1994; Ritchie y Gilroy, 1998). También se reportó que la secreción de la α -amilasa es un proceso que depende del incremento del Ca²⁺ en la periferia de la membrana plasmática de la aleurona (Gilroy, 1996). Por lo anterior, se realizó un análisis bioinformático para confirmar su identidad y asignarle una posible función. En adelante la proteína 6 se denominará HvRRP-6.

7.3.4.1. Análisis bioinformático

Como ya se mencionó, en un primer análisis de las secuencias parciales se encontró similitud con unas proteínas con manos EF de unión a Ca²⁺ de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Tabla 4). Utilizando la secuencia de At5g04170 como referencia, se realizó una búsqueda en el TIGR Unique Gene Indices (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) de donde se obtuvo una secuencia de un expressed sequence tag (EST) de cebada correspondiente a una proteína con dominios de mano EF (TC132674/ BM375174, P (N)= 2.3e⁻¹⁷⁶). La secuencia de nucleótidos de TC132674 se tradujo a secuencia de aminoácidos y se seleccionó

el marcó de lectura +3, en el que se identificó la metionina inicial y fue la secuencia más larga (Figura 16A).



Figura 16. Secuencia de aminoácidos obtenida de la traducción del EST de cebada TC132674 (proteína con manos EF de unión a Ca²⁺). A: En rojo: secuencias parciales obtenidas de la EM; azul: cisteínas; verde: dominios de mano EF; rosa: Asn glicosilación; morado: fosforilación por CK2; azul agua: fosforilación por PKC; naranja: fosforilación en tirosina; gris: miristoilación; subrayado: zonas de diseño de oligonucleótidos para la amplificación del segmento comprendido entre las secuencias parciales obtenidas por EM. B: Secuencias consenso (letras en rojo) generales de los dominios mano EF de unión a Ca²⁺, X representa cualquier aminoácido. C: Secuencias consenso de los dominios mano EF de unión a Ca²⁺ encontradas en la secuencia traducida de TC132674.

Esta secuencia traducida presentó las dos secuencias parciales obtenidas por la espectrometría de masas (Figura 16A , rojo). Aún cuando las combinaciones de aminoácidos que forman los dominios de mano EF son amplias (Figura 16B, Bhattacharya *et al.*, 2004), fue posible detectarlos claramente (Figura 16A, verde y C) . Dado que la proteína fue seleccionada por su capacidad de cambiar el estado redox de sus cisteínas ante la señal del AG₃, se buscaron estos aminoácidos (Figura 16, azul). Dado que el par de cisteínas contiguas hacia el final de la

secuencia no pueden formar un puente disulfuro debido a su cercanía, la formación de este enlace podría realizarse con la cisteína presente antes de la primera mano EF.

Mediante los programas de identificación de dominios PPSEARCH y PROSEARCH (Biology Workbench 3.2, <http://workbench.sdsc.edu>), se analizó la secuencia de proteína de la Figura 16. Las secuencias consenso identificadas fueron: 12 a 15 sitios de miristoilación (Figura 16A, gris), un sitio de glicosilación en asparagina (Figura 16, rosa), 4 sitios de fosforilación por CK2 (Figura 16A, morado), 4 sitios de fosforilación por PKC (Figura 16A, azul agua), un sitio de fosforilación en tirosina (Figura 16A, naranja). Debe recordarse que estas son predicciones sobre la existencia de dichos dominios, por lo que se deben comprobar experimentalmente. Por ejemplo, la PKC no ha sido identificada aún en plantas, por lo que se ha propuesto que su función podría ser suplida por la CDPK (Zegzouti *et al.*, 2006). De manera tal que, probablemente los sitios de fosforilación por PKC no sean reales.

Dado que esta proteína se obtuvo de una fracción membranal, se sometió a un análisis de predicción de dominios transmembranales (programas TMAP y TMHMM, Biology Workbench 3.2, <http://workbench.sdsc.edu>). Estos algoritmos no detectaron ningún cruce transmembranal en la secuencia de proteína. Sin embargo, esto no significa que la proteína no pueda estar asociada a la membrana. Una posibilidad es que la proteína se asocie a la membrana a través de una modificación lipídica. Estas modificaciones incrementan la hidrofobicidad de las proteínas y contribuyen a su asociación con las membranas. Las modificaciones lipídicas juegan un papel importante para las proteínas en tráfico

entre organelos; así como también en la modulación de interacciones proteína-proteína (Basu, 2004)

Como ya se señaló, los programas PPSEARCH Y PROSEARCH predijeron varios sitios de miristoilación en la proteína traducida de TC132674. La miristoilación consiste en la adición covalente de un grupo miristoilo a través de un enlace amida con el alfa-amino de un residuo de glicina en el extremo amino terminal. Esta modificación también puede realizarse postraduccionalmente cuando una glicina interna se expone por efecto de alguna proteasa. La miristoilación se lleva a cabo en diversos organismos; por lo que los sitios consenso para la N-miristoiltransferasa puede ser variable (Podell y Gribskov, 2004). Cabe mencionar que el programa Plant-Specific Myristoylation Predictor (www.plantsp.genomics.purdue.edu) no detectó sitios de miristoilación en la secuencia.

Otras modificaciones lipídicas como la palmitoilación y la prenilación se llevan a cabo sobre residuos de cisteína. La primera se refiere a la adición covalente de ácido palmítico (Basu, 2004). La prenilación involucra la transferencia de grupos farnesilo o geranil-geranilo a una proteína blanco por medio de tres diferentes enzimas, la farnesiltransferasa, la geranilgeraniltransferasa I y la Rab geranilgeraniltransferasa (Maurer-Stroh y Eisenhaber, 2005). Las tres requieren una caja consenso *CaaX* en el extremo carboxilo terminal. Los aminoácidos *a* son alifáticos y *X* determina la enzima que realizará la reacción. El programa PrePS-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) no detectó ningún sitio de prenilación en la proteína estudiada.

Aún cuando las predicciones de los sitios de modificación lipídica fueron negativos, cabe recordar que desconocemos si tenemos la secuencia completa de la proteína. Es necesario realizar la confirmación de la localización de la proteína en membranas.

7.3.4.2. Confirmación de la identidad de la HvRRP-6

La información obtenida del análisis bioinformático sugiere que la HvRRP-6 es una proteína de la familia de proteínas con manos EF de unión a calcio. Por esta razón, se diseñaron oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos de TC132674 para generar por RT-PCR un cDNA más largo. La secuencia de este cDNA podría ayudar a hacer una identificación más contundente de HvRRP-6.

Se diseñaron los oligonucleótidos en las zonas flanqueantes de las secuencias parciales de proteína obtenidas por EM (Figura 16, subrayado). Las secuencias utilizadas cumplieron con las características de % de GC y T_m adecuadas conforme su análisis con el programa Oligo Analyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com>) y se muestran en la Figura 17.

F1 537 **AAC GTC GTG GCG TGC TTC CAG** 557
R3 729 **GCC CCT CCA ATT CTG AAG ACT** 749

Figura 17. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados. F1: oligonucleótido sentido, R3: oligonucleótido antisentido; los números representan la posición de los nucleótidos en la secuencia de TC132674

Estos oligonucleótidos están diseñados para amplificar un fragmento de 213 pb (nucleótidos 537 a 749) en la secuencia del EST TC132674. La

amplificación del cDNA de HvRRP-6 se realizó por RT-PCR, utilizando como templado el cDNA total de aleuronas incubadas en ausencia y presencia de AG₃. El resultado de la amplificación fue la obtención de un fragmento de aproximadamente 200 pb (Figura 18, A). Este fragmento se denominó FR200 y se obtuvo su secuencia (Figura 18, B).

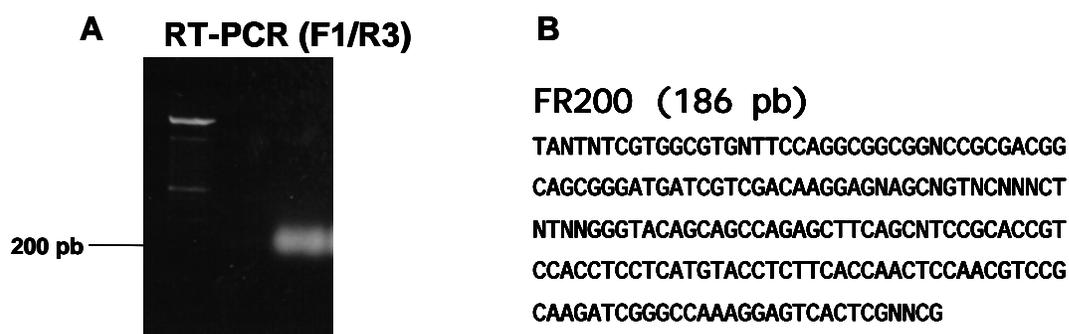


Figura 18. Amplificación por RT-PCR del cDNA de HvRRP-6 de aleuronas de cebada en ausencia de AG₃ A, Fraccionamiento electroforético en gel al 1% de agarosa de FR200, el primer carril muestra los pesos moleculares y el segundo muestra el fragmento de PCR; B, secuencia obtenida de FR200.

La secuencia obtenida para FR200 y la secuencia del EST de cebada TC132674 se analizaron con el programa CLUSTALW (Biology Workbench 3.2) para determinar si se trataba de la misma secuencia (Figura 19). El alineamiento comprendió de la base 535 a la 722 del TC132674 y tuvo una identidad de 87%.

```

FR200 -----TANTNTCGTGCCGTG 550
TC132674 CTGGTGCCGTCGACCTTCCC GCCGGGACGGACCCGAACGTCGTGGCGTG
* *****

FR200 NTTCCAGGCGGCGNCCGCGACGGCAGCGGGATGATCGTCGACAAGGAGN 600
TC132674 CTTCCAGGCGGCGACCGCGACGGCAGCGGGATGATCGACGACAAGGAGC
*****

FR200 AGCNGTNCNNCTNTNNGGGTACAGCAGCCAGAGCTTCAGCNTCCGCACC 650
TC132674 TGCAGTCCGCGCTCTCTGGGTACAGCAGCCAGAGCTTCAGCCTCCGCACC
** * * * * *****

FR200 GTCCACCTCCTCATGTACCTCTTCACCAACTCCAACGTCGCAAGATCGG 700
TC132674 GTCCACCTCCTCATGTACCTCTTCACCAACTCCAACGTCGCAAGATCGG
*****

FR200 GCCAAAGGAGT-CACTCGNNCG----- 750
TC132674 GCCAAAGGAGTTCACTTCTGTGTTTTACAGTCTTCAGAATTGGAGGGCA
***** * * * * *

```

Figura 19. El cDNA parcial de HvRRP-6 presenta alto porcentaje de identidad con TC132674 de cebada. Los asteriscos muestran la identidad entre los nucleótidos en la secuencia.

Este alineamiento presentó un porcentaje de identidad relativamente alto, lo que sugiere que FR200 podría ser un cDNA parcial de HvRRP-6. Entonces se procedió a buscar la secuencia de FR200 en las bases de datos públicas. El análisis de la secuencia de nucleótidos de FR200, así como de los aminoácidos deducidos a partir del cDNA, presentó similitud con diversas secuencias de *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*, las cuales están relacionadas con proteínas con dominios de unión a calcio tipo mano EF (Tabla 5).

La búsqueda de la secuencia de FR200 en los bancos de datos públicos resultó en la confirmación de que la secuencia obtenida corresponde a una proteína de la familia de proteínas con dominios de mano EF de unión a calcio. Esto a su vez sugiere que HvRRP-6 podría provenir de este EST. Si HvRRP-6 participa en la respuesta al AG_3 y responde a cambios redox deberá investigarse en el futuro.

Tabla 5. Secuencias con homología a la secuencia de nucleótidos y traducida de FR200.

SECUENCIA	BASE DE DATOS	ORGANISMO (No. de acceso)	DESCRIPCIÓN	SCORE	VALOR E
FR200	nucleótidos	<i>Oryza sativa</i> (NM_001072638)	Ca ²⁺ binding EF domain containing protein	184	1e ⁻⁴⁴
FR200 traducida	proteína	<i>Oryza sativa</i> (ABA91405)	EF hand family protein	57.4	1e ⁻¹¹
		<i>Oryza sativa</i> (ABA95760)	EF hand family protein	57.4	1e ⁻¹¹
		<i>Pisum sativum</i> (AJ251828)	putative cysteine protease	65.5	1e ⁻⁹
FR200 traducida	traducida	<i>Oryza sativa</i> (ABA91405)	EF hand family protein	84.3	1e ⁻¹⁵
		<i>Oryza sativa</i> (ABA95760)	EF hand family protein	84.3	1e ⁻¹⁵
		<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_187641.2/ At3g10300)	Calcium ion binding protein	77.8	1e ⁻¹³
		<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_196037/At5g04170)	Calcium ion binding protein	72.4	1e ⁻¹²
		<i>Pisum sativum</i> (AJ251828)	putative cysteine protease	31.3	0.007

Cabe mencionar que en el análisis de las secuencias traducidas, del EST de cebada y de FR200) se encontró una proteasa de cisteína putativa de *Pisum sativum* (AJ251828). Los valores de E y el score reportados para dicha secuencia se presentan en la Tabla 5. Esta proteasa también pertenece a la familia de proteínas con dominios EF de unión a calcio. En las semillas de los cereales, las proteasas son importantes durante la germinación para la hidrólisis de proteínas de reserva como la gliadina. La gliadina es la proteasa de cisteína específica de esta proteína, se sintetiza en la aleurona de forma dependiente de AG₃ y se secreta al endospermo almidonoso para la movilización de reservas (Kiyosaki *et al.*, 2007). También se sabe que otra proteasa de cisteína, la aleurina, interactúa

con receptores vacuolares y colocaliza con las vacuolas de almacén de proteínas y con cuerpos multivesiculares durante la germinación. Estos últimos tienen la función de separar a las proteasas de las vacuolas de almacén de proteínas en la semilla seca y de ser un compartimento intermedio para el transporte de las proteasas desde el aparato de Golgi hasta las vacuolas de almacén de proteínas (Wang *et al.*, 2007). Además, en el caso de la aleurona, este tipo de proteasas podrían ser importantes en la fase de muerte celular programada, como las caspasas (Vacca *et al.*, 2007). Esta evidencia apoya la posibilidad de que HvRRP-6 pudiese ser una proteasa asociada a organelos membranales y puede servir como referencia para futuro trabajo experimental que permita la identificación completa de la función de HvRRP-6.

La confirmación del tipo de familia a la que pertenece HvRRP-6 resultó de gran importancia; ya que algunas proteínas con este tipo de dominios se han asociado a diversos procesos celulares que están íntimamente relacionados con los eventos que suceden en la aleurona ante la inducción con su fitorregulador.

Las proteínas con dominios de mano EF se expresan en diversos tipos celulares. Dada su capacidad de unir calcio, se piensa que están involucradas en una gran variedad de vías de señalización (Nacken *et al.*, 2004). Algunos de ellos incluyen la exocitosis, la contracción muscular, la transcripción, la fecundación y la proliferación celular. Además de que se relacionan directamente con el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} celular (Bhattacharya *et al.*, 2004). En la Tabla 6 se muestran algunos ejemplos de proteínas con dominios de mano EF que participan en diversos procesos celulares.

Un dato relevante a este trabajo es el hecho de que algunas proteínas con estos dominios se regulan a través de su estado redox. Por ejemplo, la proteína S100A1 es una representante típica de una familia de proteínas con manos EF de unión a calcio, la familia S100. La S-glutacionilación de la cisteína 85 de la subunidad α provoca un incremento de 10 veces en la afinidad del asa de unión a Ca^{2+} C-terminal y un aumento de cuatro órdenes de magnitud en las constantes de unión a calcio en las asas N-terminal (Goch *et al.*, 2005).

Otra característica de interés para este trabajo, es su capacidad de translocarse a membranas de forma dependiente del Ca^{2+} . El reclutamiento selectivo de proteínas del citoplasma a la membrana puede regular eventos de señalización, como la activación de canales iónicos. Asimismo, se sabe que existen proteínas con manos EF asociadas a balsas lipídicas. Estos dominios membranales se proponen como plataformas de interacción controlada de elementos de transducción de señales (Nacken *et al.*, 2004).

Esta evidencia que relaciona a las proteínas de esta familia con la exocitosis, la asociación selectiva a las membranas, la participación en transducción de señales y la susceptibilidad de ser reguladas por su estado redox sugiere que HvRRP-6 podría ser relevante en la señalización y respuesta de la aleurona al AG_3 .

Tabla 6. Procesos celulares en los que participan algunas proteínas con manos EF de unión a calcio.

PROCESO CELULAR	FUNCIÓN / PROTEÍNA	REF.
SEÑALIZACIÓN	Generación de cambios conformacionales para exponer sitios de unión a otras proteínas (GCAP-2, SOS3)	Peshenko, <i>et al.</i> , 2004; Halfter <i>et al.</i> , 2000
TRANSLOCACIÓN A MEMBRANAS DEPENDIENTE DE CALCIO	Asociación con balsas lipídicas (S100A) Proveen sitios de miristoilación para asociación con membranas (NCS-1)	Nacken <i>et al.</i> , 2004; Jeromin <i>et al.</i> , 2004
UNIÓN A CALCIO	Activación de CDPK (cinasa dependiente de Ca ²⁺), PLC-PI (fosfolipasa C dependiente de fosfoinosítidos), Rboh (NADPH oxidasa), calcineurina B (fosfatasa)	Kim <i>et al.</i> , 2003; Nakahara <i>et al.</i> , 2005; Keller <i>et al.</i> , 1998; Kudla <i>et al.</i> , 1999
INDUCCIÓN POR HORMONAS	Inducidas por ABA (HvCaBP1, RD20) Inducida por Auxinas (PBP1)	Jang <i>et al.</i> , 2003; Takahashi <i>et al.</i> , 2000; Benjamins <i>et al.</i> , 2003
INDUCCIÓN POR ESTRÉS	Estrés osmótico (EFA27) Estrés salino (AtCP1)	Frandsen <i>et al.</i> , 1996 Jang <i>et al.</i> , 1998

Gran parte de los estudios más recientes en la aleurona se han enfocado al establecimiento de la muerte celular programada (MCP). No obstante, se ha perdido de vista el hecho de que las ERO producidas como consecuencia natural del incremento en el metabolismo energético de la aleurona podrían tener también un papel señalizador y regulador de diferentes procesos. Esto sería factible ya que su producción es controlada y localizada, características generales de un segundo mensajero.

En la capa de aleurona uno de los procesos regulados por ERO podría ser a la movilización del $[Ca^{2+}]_i$, ya que este depende de enzimas que son susceptibles a una regulación redox, como los canales de Ca^{2+} y las ATPasas de Ca^{2+} .

El posible papel señalizador de las ERO en la aleurona apuntaría a la oxidación específica de diferentes proteínas clave en la señalización y respuesta del sistema. Resultó sorprendente que el efecto general del AG_3 fuera hacia la inducción de un estado redox más reducido, medido como el contenido total de tioles y como la proporción del número de proteínas que se reducen o se oxidadas. Esto sugeriría la activación de mecanismos de reducción cuya regulación se podría realizar a través de la oxidación. Cabe recordar que aunque las ERO se incrementan con el aumento del metabolismo energético, este último genera a su vez grandes cantidades de poder reductor, el cual es necesario para la actividad de diferentes sistemas reductores como las tiorredoxinas y glutarredoxinas.

La identificación de las proteínas asociadas con el metabolismo básico de la aleurona, tanto en este trabajo como en los de Zamudio (2007) y Elias (2007) sugieren una conexión importante entre el metabolismo energético y la capacidad de un sistema de responder a un estímulo. Por lo que es necesario estudiar el metabolismo de la aleurona, que sólo se había limitado en describir el aprovechamiento de la reserva de la aleurona para la generación de energía.

En este trabajo se muestra que las proteínas asociadas con las membranas son importantes en la señalización y en la respuesta de la aleurona a su fitorregulador. Cabe mencionar que este trabajo contempló también proteínas

periféricas; ya que esto permite la identificación de proteínas que se reclutan a las membranas ante el estímulo. Asimismo, este reclutamiento podría llevarse a cabo a través de cambios en el citoesqueleto inducidos por el AG₃, área inexplorada en este sistema.

El hallazgo de proteínas asociadas con las membranas y relacionadas al metabolismo propone también la posibilidad de que su regulación se realice a través de este reclutamiento a las membranas.

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la regulación redox es un mecanismo que podría estar operando en la capa de aleurona para modular e integrar la señalización y las respuestas. Esto eventualmente llevará a mejorar la capacidad de respuesta de la capa de aleurona al AG₃, lo que se podrá reflejar en una mejor movilización de reservas para sostener el crecimiento posgerminativo.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La modificación química de los grupos sulfhidrilo de la capa externa de la membrana plasmática de la aleurona altera la capacidad de respuesta al AG₃, lo que se refleja como una menor actividad de α -amilasa y la conservación de la viabilidad.
- ❖ La inducción de la capa de aleurona con el AG₃ promueve un incremento discreto en el contenido total de los grupos sulfhidrilo en las proteínas asociadas a las membranas.
- ❖ Algunas proteínas específicas asociadas a membranas modifican su estado redox por la inducción de la aleurona con AG₃.
- ❖ Se identificaron tres proteínas que modificaron su estado redox por efecto del AG₃, las cuales presentan homología con: 1) una 1,6-bisfosfato aldolasa, 2) con una piruvato descarboxilasa y 3) con una proteína de la familia de proteínas con dominios de mano EF de unión al Ca²⁺, cuyo transcrito se detectó en células de la aleurona.

9. PERSPECTIVAS

Este trabajo ofrece amplias y diversas perspectivas experimentales que se pueden abordar a través de diferentes enfoques de investigación. Entre ellos:

Estudiar la regulación redox en la capa de aleurona de forma global

Disectar los eventos que son afectados por el cambio de estado de óxido-reducción promovido por el fitorregulador.

Identificar el mecanismo por el cuál el AG₃ induce los cambios redox en la aleurona.

Estudiar la regulación redox de las proteínas identificadas y su participación en la respuesta de la aleurona al AG₃.

Determinar inequívocamente la función y la regulación redox de las proteínas identificadas en este trabajo, con particular interés en la proteína con manos EF de unión a Ca²⁺.

Dada la identificación de proteínas relacionadas con el metabolismo básico de la aleurona (en este y otros trabajos del laboratorio), resulta muy importante iniciar un estudio global de los cambios en el metabolismo de la aleurona, su regulación y sus implicaciones en la capacidad de la aleurona de impulsar una germinación exitosa.

10. ANEXOS METODOLÓGICOS

10.1. PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS Y OBTENCIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA

Se utilizaron semillas de cebada *Hordeum vulgare*, variedad Himalaya, cosecha 1996, obtenidas del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA. Las semillas de cebada se cortaron transversalmente eliminando el embrión. Las medias semillas sin embrión se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 1.2% (v/v), agitándolas en esta disolución durante 20 min. Se enjuagaron repetidamente con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a hipoclorito. Las medias semillas desinfectadas se pusieron a embeber durante 72 h a 28-30 °C sobre dos círculos de papel filtro con aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril con 20 µg/ml de cloranfenicol y 20 µg/ml de estreptomicina en cajas Petri estériles. Al término de este tiempo, se eliminó el endospermo almidonoso con la ayuda de dos espátulas, todo en condiciones estériles.

10.2. INCUBACIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA AISLADAS

Las capas de aleurona se colocaron en un matraz estéril con amortiguador de incubación (ácido succínico 20 mM, pH 5.0, CaCl₂ 20 mM) en una relación aproximada de 1 ml por cada 10 aleuronas. Al amortiguador se le añadió AG₃ en una concentración final de 1 µM en los casos así indicados. Las aleuronas fueron

incubadas a 28°C en agitación constante. El número de aleuronas y el tiempo de incubación variaron según el tipo de experimento a realizarse.

10.3. OBTENCIÓN DE PROTEÍNA MEMBRANAL SOLUBILIZADA (PMS)

Después de la incubación, las capas de aleurona se secaron con papel absorbente y se homogenizaron en un mortero con 25 ml de amortiguador de homogenización frío (Sacarosa 330 mM, EGTA 2 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 5.0, con inhibidores de proteasas Boheringer) en presencia de 14.2 mM β -mercaptoetanol. El homogenado se filtró a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 10 min (Centrífuga Sorvall Super T21). Se colectó el sobrenadante en tubos de ultracentrífuga (Centrifuge Bottles Polycarbonate with Cap Assemblies Beckman, Cat. BC355618) fríos y se centrifugó a 55,000 rpm a 4 °C por 1 h (Ultracentrífuga Beckman XL-100K). El sobrenadante se descartó y las pastillas se resuspendieron en 200 μ l de amortiguador de resuspensión (Tris-HCl 5 mM pH 7.0, EGTA 1 mM, CHAPS 2% y urea 4 M). Las muestras se agitaron en un vórtex y se centrifugaron en una microfuga a 14 000 rpm a 4 °C por 10 min. Los sobrenadantes se colectaron y las pastillas se re-extrajeron con otros 200 μ l de buffer de resuspensión. Se repitió la centrifugación y los sobrenadantes de cada muestra se juntaron.

10.4. MARCAJE DE GRUPOS SULFHIDRILO CON MONOBROMO BIMANO (MBRB) *IN VITRO*

Las PMS de aleuronas incubadas por 5 h en ausencia y presencia de AG₃ se redujeron con DTT 5 mM y se calentaron a ebullición por 5 min. Después se añadió una solución de mBrB hasta una concentración final de 20 mM y se incubó por 20 min a temperatura ambiente (TA). La reacción se detuvo por adición de acetona para la precipitación de la proteína. La proteína precipitada se disolvió en amortiguador de muestra y se separaron las proteínas por SDS-PAGE. Las proteínas marcadas se detectaron por incidencia de luz ultravioleta en el equipo FLUOR-S Multimager. Para detectar los grupos que *in vivo* se encontraban formando grupos disulfuro, se realizó un bloqueo de grupos tiol con NEM 25 mM que se añadió 15 min antes del término de la incubación de 5 h.

10.5. MARCAJE DE SULFHIDRILOS CON MBRB DURANTE LA HOMOGENIZACIÓN

Inmediatamente después de la incubación de las aleuronas en ausencia o presencia del fitorregulador, el tejido se congeló en nitrógeno líquido y se homogenizó hasta formar un polvo fino. Antes de que éste se descongelara, se adicionó un amortiguador de Tris/HCl 50 mM pH 7.9, EDTA 1 mM PMSF, 0.5 mM y 2 mM de mBrB y se terminó de homogenizar. Después se procedió al aislamiento de la fracción microsomal.

10.6. ENSAYO DE VIABILIDAD

Las capas de aleurona se incubaron en amortiguador de incubación (10 aleuronas / ml, ácido succínico 20 mM pH 5.0, CaCl₂ 20 mM) con o sin 1 μM AG₃ durante 0, 5, y 18 h a 28 °C; 10 aleuronas por cada matraz, 3 matraces por cada tiempo y 3 matraces por cada tratamiento. Después de los respectivos tiempos, el amortiguador de incubación se eliminó y las capas de aleurona se secaron con papel absorbente. Las capas de aleurona se colocaron en viales (10 aleuronas por cada vial). Se agregaron 2 ml de 2,3,5-trifeniltetrazolio 1% (TTC) en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 5.8 y se incubaron durante 1 h a 25 °C. Transcurrido el tiempo las aleuronas se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y el pigmento se extrajo con 1 ml de etanol absoluto a 70 °C durante 1.5 h. El compuesto extraído se clarificó por centrifugación a 14000 rpm en una microfuga Eppendorff por 10 min y se determinó la absorbencia del sobrenadante a 485 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando los valores de referencia de los ensayos realizados con todas las células vivas (muestra de 5 h de incubación en ausencia del fitorregulador: 100% viabilidad) y todas las células muertas (muestra de aleuronas congeladas a -20 °C y calentadas a ebullición durante 10 min).

10.7. MICROSECUENCIACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Las manchas seleccionadas para microsecuenciación fueron procesadas a través de la Unidad de Proteómica de la Universidad de Missouri.

10.8. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE CAPA DE ALEURONA DE CEBADA

El aislamiento del ARN total de capa de aleurona se realizó de acuerdo a Higgins *et al.* (1976). Se homogenizaron 50 aleuronas en 10 ml de un amortiguador con Trizma 100 mM pH 9.5, NaCl 0.1 M, 1% SDS, 1% PVPP, 10 mM EDTA, 100 μ l β -mercaptoetanol 14.3 M. Se centrifugó a 5000 RPM por 10 min a TA. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; 5: 4.9: 0.1 (PCI). Después de una agitación vigorosa por 5 min, se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a TA. Se recuperó y apartó la fase acuosa. La fase orgánica se re-extrajo con amortiguador de homogenización. Se juntaron los sobrenadantes acuosos y se re-extrajeron con 5 ml de PCI. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante se dejó precipitando toda la noche con etanol absoluto (2.5 veces del volumen del sobrenadante) a -20 °C. Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 3 ml de acetato de sodio 0.5 M pH 5.8 y se añadieron 0.4 ml de CTABr al 1%. Se incubó 1 h a 0°C y se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. La pastilla se lavó con acetato de sodio 0.1 M en etanol al 70%. Se centrifugó en iguales condiciones y se lavó la pastilla con una disolución de acetato de sodio 3 M, EDTA 5 mM pH 5.0. Después de centrifugar, se resuspendió la pastilla en 0.1 ml de agua DEPC y se almacenó la muestra a -70 °C hasta su uso.

10.9. CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL

La cuantificación del ARN se realizó por espectrometría determinando la absorbencia a 260 nm, considerando que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 μg / ml de ARN. Una segunda medición se realizó a 280 nm para detectar la posible contaminación con proteínas. La relación de absorbencia 260 a 280 debe ser del orden de 2.0 e indicó el grado de pureza del ARN. Los ARN utilizados tuvieron relaciones de absorbencia 260/280 entre 1.4 y 1.9.

10.10. ELIMINACIÓN DE ADN CONTAMINANTE

Previo a la síntesis del cDNA fue necesario eliminar DNA cromosomal contaminante en las muestras de ARN total. Se realizó incubando 500 μg de ARN total con 10 U de inhibidor de RNAsa, 10 U de DNAsa I en Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM y MgCl_2 1.5 mM, durante 30 min a 37 °C. Después de la incubación, se llevó la mezcla de reacción a 50 μl con H_2O -DEPC y se extrajo con PCI. La fase acuosa se dejó precipitando 2 h a -20 °C con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/3 de volumen de acetato de amonio 10 M. Se centrifugó 20 min a 14000 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se volvió a centrifugar y se resuspendió la pastilla en 10-15 μl H_2O -DEPC.

10.11. RT-PCR

10.11.1. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA se calentó a 70 °C por 10 min un tubo que contenía 5 µg de ARN total, 1 µl de oligo dT (1 µg / µl) y agua c.b.p. hasta 12 µl. Se enfrió en hielo y se agregaron 4 µl de amortiguador 5X de primera cadena (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de dNTPs 10 mM. La mezcla se incubó por 2 min a 42 °C y se le agregaron 200 U de transcriptasa reversa (GIBCO) y se incubó por 2 h más. Al término de este tiempo, se incubó a 95°C para inactivar a la enzima y se colectó la mezcla de reacción.

10.11.2. PCR

La mezcla de reacción para el RT-PCR fue:

Amortiguador de PCR	1X
DNTP's	0.2 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Oligonucleótido sentido (F1)	0.25 µM
Oligonucleótido antisentido (R3)	0.25 µM
Taq polimerasa	1 U
agua	cbp

A 15 µl de mezcla de reacción se adicionaron de 2 a 5 µl de cDNA y se realizaron 35 ciclos en el termociclador con las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial	94 °C / 2 min
2. Desnaturalización	94 °C / 45 seg
3. Alineación	57 °C / 45 seg
4. Extensión	72 °C / 45 seg
5. Repetición 2 a 4	34 ciclos más
6. Extensión final	72 °C / 5 min

Para ser visualizado, el producto de la amplificación se fraccionó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%. Para la purificación del producto de amplificación (FR200), este se separó en un gel de agarosa al 1.2% a 83 V durante 70 min. Las bandas de 200 pb se cortaron del gel y se extrajeron con un estuche de reactivos de extracción de ADN de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DNA Gel Extraction Kit; Millipore). El producto recuperado se mandó a secuenciación a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aitken, R.J.; Ryan, A.L.; Baker, M.A.; McLaughlin, E.A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 994-1010; 2004.

Arnalte, M.; Cornejo, M.; Bush, D.S.; Jones, R.L. Gibberellic acid stimulates lipid metabolism in barley aleurone protoplasts. *Plant Science* 77: 223-232; 1991.

Bailly, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14: 93-107; 2004.

Basu, J. Protein palmitoylation and dynamic modulation of protein function. *Curr. Sci.* 87: 212-17; 2004.

Baty, J.W.; Hampton, M.B.; Winterbourn, C.C. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2: 1261-1266; 2002.

Benjamins, R.; Galván Ampudia, C.S.; Hooykaas, P.J.J.; Offringa, R. PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol.* 132: 1623-1630; 2003.

Bethke, P.C.; Jones, R.L. Ca²⁺-calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cells. *Plant Cell* 6: 277-285; 1994.

Bethke, P.C.; Hillmer, S.; Jones, R.L. Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone. *Plant Physiol.* 110: 521-529; 1996.

Bethke, P.C.; Schuurink, R.; Jones, R.L. Hormonal signalling in cereal aleurone. *J. Exp. Bot.* 48: 1337-1356; 1997.

Bethke, P.C.; Hwang, Y.; Zhu, T.; Jones, R.L. Global patterns of gene expression in the aleurone of wild type and *dwarf1* mutant rice^[W]. *Plant Physiol.* 140: 484-498; 2006.

Bhattacharya, S.; Bunick, C.G.; Chazin, W.J. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim. et Biophys. Acta* 1742: 69-79; 2004.

Boyer, P.D. Sulfhydryl and disulfide groups of enzymes. En: Boyer, P.D.; Lardy, H., Myrbäck, K., eds. *The enzymes, volume 1*. New York: Academic Press; 1959: 511-586.

Bush, D.S. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* 199: 89-99; 1996.

Bush, D.S.; Wang, T. Diversity of calcium efflux transporters in wheat aleurone cells. *Planta* 197: 19-30; 1995.

Cabrillac, D.; Cock, J.M.; Dumas, C.; Gaude, T. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410: 220-223; 2001.

Chandler, P.M.; Zwar, J.A.; Jacobsen, J.V.; Higgings, T.J.V.; Inglis, A.S. The effect of gibberellic acid and abscisic acid on α -amylase mRNA levels in barley aleurone layers: studies using an α -amylase cDNA clone. *Plant. Mol. Biol.* 45: 113-141; 1984.

Chen, X.; Chang, M.; Wang, B.; Wu R. Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene and the role of cytosolic Ca^{2+} in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J.* 11: 363-371; 1997.

Chiarugi, P.; Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *TIBS* 28: 509-514; 2003.

Chrispeels, M.J.; Varner, J.E. Hormonal control of enzyme synthesis: on the mode of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42: 1008-1016; 1967.

Doig, R.I.; Colborne, A.J.; Morris, G.; Laidman, D.L. The induction of glyoxysomal enzyme activities in the aleurone cells of germinating wheat. *J. Exp. Bot.* 26: 387-398; 1975.

Eastmond, P.J.; Jones, R.L. Hormonal regulation of gluconeogenesis in cereal aleurone is strongly cultivar-dependent and gibberellin action involves SLENDER1 but not GAMYB. *Plant J.* 44: 483-493; 2005.

Elias, A.K. Efecto del ácido absícico en el proteoma membranal de la aleurona de cebada tratada con ácido giberélico. Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM, México; 2007.

Fath, A.; Bethke, P.C.; Jones, R.L. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol.* 126: 156-166; 2001.

Fernie, A.R.; Carrari, F.; Sweetlove, L.J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 254-61; 2004.

Fransden, G.; Müller-Uris, F.; Nielsen, M.; Mundy, J.; Skriver, K. Novel plant Ca²⁺-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 271: 343-348; 1996.

Ghezzi, P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1378-1381; 2005.

Gilroy, S.; Jones, R.L. Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104: 1185-92; 1994.

Gilroy, S. Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. *Plant Cell* 8: 2193-2209; 1996.

Gitler, C.; Mogyoros, M.; Kalef, E. Specific labeling of protein vicinal dithiols to study the role of protein-S₂ to protein-(SH)₂ conversion in metabolic regulation and oxidative stress. *Methods Enzymol.* 233: 403-415; 1994.

Gitler, C.; Londner, M. Use of p-nitrophenyl disulfide to measure reductive capacity of intact cells. Biothiols, monothiols, protein thiols and thiol radicals. *Methods Enzymol.* 251: 279-286; 1995.

Gitler, C.; Zarmi, B.; Kalef, E. General method to identify and enrich vicinal thiol proteins present in intact cells in the oxidized, disulfide state. *Anal. Biochem.* 252: 48-55; 1997.

Goch, G.; Vdovenko, S.; Kozłowska, H.; Bierzyński, A. Affinity of S100A1 protein for calcium increases dramatically upon glutathionylation. *FEBS Lett.* 272: 2557-2565; 2005.

Grappin, P.; Bouinot, D.; Sotta, B.; Miginiac, C.E.; Julien, M. Control of seed dormancy in *Nicotiana glauca*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279-285; 2000.

Gubler, F.; Jacobsen, J.V. Gibberellin responsive elements in the promoter of a barley high-pl α -amylase gene. *Plant Cell* 4: 1435-1441; 1992.

Gubler, F.; Kalla, R.; Roberts, J.K.; Jacobsen J.V. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl α -amylase gene promoter. *Plant Cell* 7: 1879-1891; 1995.

Halfter, U.; Ishitani, M.; Zhu, J. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3735-3740; 2000.

Hansen, J.M.; Go, Y.; Jones, D.P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 215-234; 2006.

Hata, I.; Shigematsu, Y.; Ohshima, Y.; Tsukahara, H.; Fujisawa, K.; Hiraoka, M.; Nakamura, H.; Masutani, H.; Yodoi, J.; Kotsuji, F.; Sudo, M.; Mayumi, M. Involvement of thioredoxin in the regulation of growth hormone secretion in rat pituitary cell cultures. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: E269-E274; 2001.

Heimovaara-Dijkstra, S.; Heistek, J.C.; Wang M. Counteractive effects of ABA and GA₃ on extracellular and intracellular pH and malate in barley aleurone. *Plant Physiol.* 106: 359-365; 1994.

Higgins, T.J.V.; Zwar, J.A.; Jacobsen, J.V. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amylase in barley aleurone layers. *Nature* 260: 166-169; 1976.

Hill, R.D.; MacGregor A.W. Cereal α -amylases in grain research and technology. *Adv. in Cereal Sci. Tech.* 217-261; 1986.

Holmgren, A. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 237-271; 1985.

Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966; 1989.

Hooley, R. Protoplasts isolated from aleurone layers of wild oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberellic acid. *Planta* 154: 29-40; 1982.

Hooley, R.; Beale, M.H.; Smith, S.J. Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* 183: 274-280; 1991.

Ishibashi, T.; Lee, C.I.; Okabe, E. Skeletal sarcoplasmic reticulum dysfunction induced by reactive oxygen intermediates derived from photoactivated rose bengal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 350-358; 1996.

Jacobsen, J.V.; Higgins, T.J. Characterization of the alpha-amylases synthesized by aleurone layers of Himalaya barley in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 70: 1647-1653; 1982.

Jacobsen, J.V.; Beach, L.R. Evidence for control of transcription of α -amylase and ribosomal RNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellic acid and abscisic acid. *Nature* 316: 275-277; 1985.

Jacobsen, J.V., Chandler, P.M. Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. En *Plant hormones and their role in plant growth development*. Kluwer Acad. Publishers, ed. P.J. Davies, 1988: 164-193.

Jang, H.; Pih, K.T.; Kang, S.G; Lim, J.H.; Jin, J.B.; Piao, H.L.; Hwang, I. Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress. *Plant. Mol. Biol.* 37: 839-847; 1998.

Jang, C.S.; Lee, M.S.; Kim, J.Y.; Kim, D.S.; Seo, Y.W. Molecular characterization of a cDNA encoding putative calcium binding protein, *HvCaBP1*, induced during kernel development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.* 22: 64-70; 2003.

Jeromin, A.; Muralidhar, D.; Parameswaran, M.N.; Roder, J.; Fairwell, T.; Scarlata, S.; Dowal, L.; Mustafi, S.M.; Chary, K.V.R.; Sharma, Y. N-terminal myristoylation regulates calcium induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* 279: 27158-27167; 2004.

Jia, W.; Zhang, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation in relation to reducing agents and sulfhydryl modifiers in maize plants. *Plant Cell Envir.* 23: 1389-1395; 2000.

Jocelyn, P.C. Spectrophotometric assay of thiols. Sulfur and aminoacids. *Methods Enzymol.* 143: 45-67; 1987.

Johnson, G.L.; Vaillancourt, R.R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 230-238; 1994.

Jones, D.P.; Go, Y.M.; Anderson, C.L.; Ziegler, T.R.; Kinkade, J.M.; Kirilin, W.G. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling control. *FASEB J.* 10.1096/fj.03097fje; July 4, 2004.

Jones, H.D.; Smith, S.; Plakidou-Dymock, S.; Hooley, R. G α and G β subunit genes and signal transduction in *Avena fatua* aleurone. *J. Exp. Bot.* 47: Suppl 5; 1996.

Jones, H.D.; Smith, S.J.; Desikan, R.; Plakidou-Dymock, S.; Lovegrove, A.; Hooley, R. Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* 10: 245-253; 1998.

Jones, R.L. Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone cells. I. Changes during the lag-phase of α -amylase synthesis. *Planta* 87: 119-133; 1969.

Jones, R.L.; Jacobsen, J.V. Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int.. Rev. Cytol.* 1126: 49-88; 1991.

Kamata, H.; Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 11: 1-14; 1999.

Kashem, M.A.; Itoh, K.; Iwabuchi, S.; Hori, H.; Mitsui, T. Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of α -amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*. 41: 399-407; 2000.

Keller, T.; Damude, H.G.; Werner, D.; Doerner, P.; Dixon, R.A.; Lamb, C. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-266; 1998.

Knetsch, M.L.; Wang, M.; Snaar-Jagalska, B.E.; Heimovaara-Dijkstra, S. Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8: 1061-1067; 1996.

Kim, K.; Lee, J.; Han, H.; Choi, S.A.; Go, S.J; Sun, I. Isolation and characterization of a novel Ca²⁺-regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. *Plant. Mol. Biol.* 52: 1191-1202; 2003.

Kiyosaki, T.; Matsumoto, I.; Asakura, T.; Funaki, J.; Kuroda, M.; Misaka, T.; Arai, S.; Abe, K. Gliadin, a gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins. *FEBS J.* 274: 1908-1917; 2007.

Kudla, J.; Xu, Q; Harter, K.; Gruissem, W.; Luan, S. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4718-4723; 1999.

Kuo, A.; Cappelluti, S.; Cervantes-Cervantes, M.; Rodriguez, M.; Bush, D.S. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 8: 259-269; 1996.

Labrecque, J.; McNicoll, N.; De Marquis, M.; Lean, A. A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity- Role of receptor dimerization in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274: 9752-9759; 1999.

Lazarus, C.M.; Baulcombe, D.C.; Martienssen, R.A. α -amylase genes of wheat are two multigene families which are differentially expressed. *Plant. Mol. Biol.* 5: 13-24; 1985.

Lee, K.; Lee, J.; Kim, Y.; Bae, D.; Kang, K.Y.; Yoon, S.C.; Lim, D. Defining the plant disulfide proteome. *Electrophoresis* 25: 532-541; 2004.

Lovegrove, A. Gibberellin-photoaffinity labeling of two polypeptides in plant plasma membrane. *Plant J.* 15: 311-320; 1998.

Lovegrove, A.; Hooley, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5: 102-110; 2000.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275; 1951.

Maya, V. Identificación de cambios en las membranas de capa de aleurona de cebada inducidos por el ácido giberélico. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, México; 2000.

Morré, D.J.; Brightman, A.O. NADH oxidase of plasma membranes. *J. Bioenerg. Biomem.* 26: 469-489; 1991.

Morré, D.J. Hormone- and growth factor-stimulated NADH oxidase. *J. Bioenerg. Biomem.* 26: 421-432; 1994.

Morré, D.J.; Brightman, A.O.; Hidalgo, A.; Navas, P. Selective inhibition of auxin stimulated NADH oxidase activity and elongation growth of soybean hypocotyls by thiol reagents. *Plant Physiol.* 107: 1285-1291; 1995a.

Morré, D.J.; de Cabo, R.; Jacobs, E.; Morré, D.M. Auxin-modulated protein disulfide-thiol interchange activity from soybean plasma membranes. *Plant Physiol.* 109: 573-578; 1995b.

Mozer, T.J. Control of protein synthesis in barley aleurone layers by plant hormones gibberellic acid and abscisic acid. *Cell* 20: 479-485; 1980.

Maurer-Stroh, S.; Eisenhaber, F. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biology* 6: R55; 2005.

Murata, Y.; Pei, Z.M.; Mori, I.C.; Schroeder, J. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13: 2513-2523; 2001.

Nakahara, M.; Shimosawa, M.; Nakamura, Y.; Irino, Y.; Moruta, M.; Kudo, Y.; Fukami, K. A novel phospholipase D, PLCeta2, is a neuron-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* 280: 29128-29134; 2005.

Nacken, W.; Sorg, C.; Kerkhoff, C. The myeloid expressed EF-hand proteins display a diverse pattern of lipid raft association. *FEBS Lett.* 572: 289-293; 2004.

Nardai, G.; Stadler, K.; Papp, E.; Korcsmáros, T.; Jakus, J.; Csermely, P. Diabetic changes in the redox status of the microsomal protein folding machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 787-795; 2005.

Newman, J.C.; Briggs, D.E. Glyceride metabolism and gluconeogenesis in barley endosperm. *Phytochemistry* 15: 1453-1458; 1976.

Niedowicz, D.M.; Daleke, D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* 43: 289-330; 2005.

Nishida, M.; Maruyama, Y.; Tanaka, R.; Kontani, K.; Nagao, T.; Kurose, H. Gi and Gαo are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 408: 492-495; 2000.

O'Brian, C.; Chu, F. Post-translational disulfide modifications in cell signaling- role of inter-protein, intra-protein, S-glutathionyl, and S-cysteaminy disulfide modifications in signal transmission. *Free Rad. Res.* 39: 471-480; 2005.

Palma, K.; Kermode, A.R. Metabolism of hydrogen peroxide during reserve mobilization and programmed cell death of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 35: 1261-1270; 2003.

Penson, S.P.; Schuurink, R.C.; Fath, A.; Gubler, F.; Jacobsen, J.V.; Jones, R.L. cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 8: 2325-2333; 1996.

Pesehenko, I.V.; Olshevskaya, E.V.; Dizhoor, M. Ca²⁺-dependent conformational changes in guanylyl cyclase-activating protein 2 (GCAP-2) revealed by site-specific phosphorylation and partial proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279: 50342-50349; 2004.

Podell, S.; Gribskov, M. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC Genomics* 5: 37-43; 2004.

Rabilloud, T.; Carpentier, G.; Tarroux, P. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9: 288-291; 1988.

Rabilloud, T.; Vuillard, L.; Gilly, C.; Lawrence, J.J. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 40: 57-75; 1994.

Riordan, J.F.; Vallee, B.L. Reactions with N-ethylmaleimide and P-mercuribenzoate. Enzyme structure: Part B. *Methods Enzymol.* 25: 449-464; 1972.

Ritchie, S.; Gilroy, S. Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiol.* 116: 765-776; 1998.

Rock, C.D.; Quantaro, R.S. The role of hormones during seed development. En: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies, P.J. ed. Dodrecht, the Netherlands, 1995: 671-697.

Rogers, J.C.; Milliman, C. Coordinate increase in mayor transcripts from the high pl α -amylase multigene family in barley aleurone cells stimulated with gibberellic acid. *J. Biol. Chem.* 259: 12134-12241; 1984.

Rogers, J.C.; Rogers, S.W. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid cis-acting hormone response complexes. *Plant Cell* 4: 1443-1451; 1992.

Rusnak, F.; Reiter, T. Sensing electrons: phosphatase redox regulation. *TIBS* 25: 527-529; 2000.

Schroeder, J.I.; Hagiwara, S. Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of non-selective Ca^{2+} permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9305-9309; 1990.

Schuurink, R.C.; Chan, P.V.; Jones R.L. Modulation of calmodulin mRNA and protein levels in barley aleurone. *Plant Physiol.* 111: 371-380; 1996.

Skriver, K.; Olsen, F.L.; Rogers, J.C.; Mundy, J. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7266-7270; 1991.

Slesak, I.; Libik, M.; Karpinska, B.; Karpinski, S.; Miszalski, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim. Pol.* Feb 26; [Epub ahead of print]; 2007.

Sutliff, T.D.; Lanahan, M.B.; Ho, T.D. Gibberellin treatment stimulates factor binding to the gibberellin response complex in a barley α -amylase promoter. *Plant Cell* 5: 1681-1692; 1993.

Suzuki, Y. J.; Ford, G. D. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37: 345-353; 1999.

Takahashi, S.; Katagiri, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca^{2+} -binding protein is induced by abscisic acid during dehydration. *Plant Cell Physiol.* 41: 898-903; 2000.

Ueguchi-Tanaka, M.; Fujisawa, Y.; Kobayashi, M.; Ashikari, M.; Iwasaki, Y.; Kitano, H.; Matsuoka, M. Rice dwarf mutant *d1*, which is defective in the α subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11638-11643; 2000.

Vacca, R.A.; Valenti, D.; Bobba, A.; de Pinto, M.C.; Merafina, R.S.; De Gara, L.; Passarella, S.; Marra, E. Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco Bright-Yellow 2 cells. *FEBS Lett.* 581: 917-922; 2007.

Wang, J.; Li, Y.; Lo, S.W.; Hillmer, S.; Sun, S.S.; Robinson, D.G.; Jiang, L. Protein mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies. *Plant Physiol.* 143: 1628-1639; 2007.

Wang, M.; Sedde, N.J.A.; Heidekamp, F.; Snaar-Jagalska, B.E. Detection of GTP-binding proteins in barley aleurone protoplasts. *FEBS Lett.* 329: 245-248; 1993.

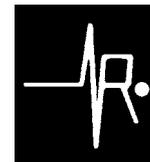
Wright, S.K.; Viola, R.E. Evaluation of methods for the quantitation of cysteines in proteins. *Anal. Biochem.* 265: 8-14; 1998.

Yano, H.; Kuroda, S.; Buchanan, B.B. Disulfide proteome in the analysis of protein function and structure. *Proteomics* 2: 1090-1096; 2002.

Zamudio, R. Proteómica de la aleurona: identificación de proteínas membranales inducidas por ácido giberélico (AG_3). Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM, México; 2007.

Zegzouti, H.; Li, W.; Lorenz, T.C.; Xie, M.; Payne, C.T.; Smith, K.; Glenny, S.; Payne, G.S.; Christensen, S.K. Structural and functional insights into the regulation of *Arabidopsis* AGC VIIIa kinases. *J. Biol. Chem.* 281: 35520-35530; 2006.

Zwar, J.A.; Hooley, R. Hormonal regulation of α -amylase gene transcription in wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 80: 459-463; 1986.



Original Contribution

Redox-sensitive target detection in gibberellic acid-induced barley aleurone layer

Vanessa Maya-Ampudia*, Irma Bernal-Lugo

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Paseo de la Investigación Científica, Circuito Institutos, C.P. 04510, Mexico

Received 9 September 2005; revised 2 December 2005; accepted 5 December 2005
Available online 29 December 2005

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are involved in redox regulation by their capacity to reversibly oxidize cysteine residues. This regulation is used by cells to modulate and integrate different responses to extracellular stimuli. In the barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer, gibberellic acid (GA₃) is perceived at the plasma membrane and induces the synthesis and secretion of α-amylase. All aleurone membrane systems participate in the elaboration of this response. During these events, ROS are generated as a by-product from intense lipid metabolism. Therefore, we hypothesized that redox regulation may be operating in the GA₃-induced response. To test this hypothesis, we measured if GA₃ treatment induced changes in the redox state of aleurone membrane-associated proteins. Membrane proteins with sulfhydryl and disulfide groups were isolated from reduced and in situ NEM-alkylated microsomal fractions, respectively. Each fraction was enriched by thiol-affinity chromatography and separated by two-dimensional electrophoresis. The in vivo redox state of each membrane protein present in GA₃-treated and -untreated tissue was determined. Results showed that GA₃ induced the reduced state in 17 constitutive proteins and the oxidized state in another 5. These data indicate that redox changes occur in membrane proteins after GA₃ signaling in the aleurone layer.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Redox-sensitive proteins; Membrane proteins; Redox regulation; Reactive oxygen species; Aleurone; Gibberellic acid; Barley; Free radical

Introduction

Redox regulation involves reversible oxidation of essential cysteine residues, which can be mediated by reactive oxygen species (ROS) [1]. A growing body of evidence suggests that redox regulation of protein function plays an important role in many biological processes [2,3] such as enzymatic activity, protein–protein interactions, and even DNA-binding activity [1]. At the present time, most of the redox-sensitive proteins have been studied as isolated cases. Thus, many proteins related

to cell signaling pathways have been identified as redox sensitive [4,5], such as phospholipase C [5], G proteins [6], protein tyrosine phosphatases [7], and Ca²⁺-mobilizing proteins like Ca²⁺ channels and Ca²⁺-ATPases [5,8].

In other cases, the study of redox-regulated mechanisms has been approached by assessing redox changes in proteins after perception of an external stimulus. For instance, human sperm capacitation induced by fetal cord serum is regulated by reactive oxygen species and involves an increase in the thiol content of Triton-soluble proteins [9]. Another approach has been to modify the protein sulfhydryl redox state and then analyze the system response to external signals. In plants, abscisic acid accumulation induced by water stress is inhibited by reducing agents and non-membrane-permeable sulfhydryl modifiers. This suggests that a specific redox state of some extracellular thiol groups is required for signal perception [10]. Also, there are reports that suggest that some membrane receptors have essential sulfhydryl groups important for their dimerization or activation [11,12].

Abbreviations: CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate; DTNB, dithionitrobenzoic acid; DTT, dithiothreitol; GA₃, gibberellic acid; [¹²⁵I]IAIT, *N*-iodoacetyl-[¹²⁵I]-3-iodotyrosine; β-ME, β-mercaptoethanol; NEM, *N*-ethylmaleimide; PCMBs, *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid; PLC, phospholipase C; ROS, reactive oxygen species; SDS, sodium dodecyl sulfate; TCA, trichloroacetic acid.

* Corresponding author. Fax: (52) 55 5622 5329.

E-mail address: van@correo.unam.mx (V. Maya-Ampudia).

It is clear that both approaches give information about possible redox regulation mechanisms. However, none of them by itself allows the identification of the redox-regulated protein or its role in the physiological process. One strategy for solving this problem could be the identification of redox-sensitive proteins involved in a particular biological process. To achieve this, it would be necessary to have a system that perceives a single stimulus which induces a particular and easy to assess response.

The cereal aleurone layer constitutes such ideal system since it has a single cell type, a well-characterized hormone signal (GA_3), as well as an easy to assess biochemical response (α -amylase activity). During germination, the cereal aleurone layer synthesizes and secretes hydrolases to the starchy endosperm in order to start and sustain reserve mobilization [13,14]. To cope with the high demand of energy and carbon sources for the GA_3 -induced de novo protein synthesis, aleurone cells take advantage of their abundant lipid reserve. Lipid and energetic metabolism activation promotes an increase in ROS proliferation, which are mainly generated in the aleurone cell glyoxysomes and mitochondria [15]. Experimental evidence shows that aleurone antioxidant enzymatic capacity is maintained during all the α -amylase synthesis period [15,16]. This suggests that during the secretory function of the tissue, there are moderate levels of ROS, which might be acting as cellular messengers [17]. Thus, it is feasible that the effect of GA_3 on synthesis and secretion of hydrolases may be associated with ROS. Another interesting feature of the aleurone layer is that almost all of its membrane systems participate in elaborating the response to GA_3 . For instance, there is evidence that suggests that GA_3 perception occurs at the plasma membrane [18,19], promoting a pronounced mobilization of intracellular Ca^{2+} [20]. The latter is sustained by plasma membrane Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -ATPases [13,20]. Also, Ca^{2+} mobilization has been associated with Ca^{2+} /CaM-dependent regulatory systems in endoplasmic reticulum and tonoplast and with the exocytotic process [13,21,22]. Given the signal transduction elements identified in aleurone, as well as its secretory nature, it is clear that aleurone membrane systems are crucial for the tissue response to GA_3 . Furthermore, this model system brings about the possibility of evaluating the importance of membrane dynamic functions in physiological responses. Therefore, the aim of this work was to assess the possible GA_3 -induced redox changes on membrane proteins. We observed that plasma membrane thiol blockers diminished the aleurone α -amylase production. Other evidence showed that GA_3 induced a 40% increase in microsomal protein thiol content. Accurate determination of the in vivo redox state of proteins was possible through comparison of two-dimensional electrophoretic patterns of total thiol-containing proteins and total in vivo oxidized proteins (disulfide proteins). This strategy allowed the detection of specific GA_3 -induced redox changes in 22 aleurone membrane-associated proteins. These results indicate that redox changes in membrane proteins occur upon GA_3 stimulation and might be important for GA_3 signaling in the aleurone layer. To our knowledge, this is the

first report of the existence of redox-regulated targets in the aleurone layer.

Materials and methods

Plant material

Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya; Agronomy Department, Washington State University, Pullman) seeds harvested in 1998 were used throughout these experiments. Seeds were stored in closed glass jars at 4°C.

Aleurone layer preparation

Barley seeds were cut in half and the ends containing the embryos were discarded. Embryoless seeds were surface-sterilized for 20 min in 1% sodium hypochlorite, washed extensively with sterile distilled water, and thereafter imbibed on sterile, moist filter paper for 72 h at 28°C. Under aseptic conditions, the aleurone layers were then stripped from the endosperm by squeezing with a spatula.

Plasma membrane thiol blockage and α -amylase activity determination

Ten aleurone layers were incubated in 2 ml of incubation buffer (20 mM succinic acid, pH 5.0, 20 mM $CaCl_2$) for 15 min in the absence or presence of membrane-impermeable thiol blockers (2 mM dithionitrobenzoic acid, DTNB [23], 50 μ M mersalyl [24], or 150 μ M p-chloromercuribenzenesulfonic acid, PCMBs [25]). After this time, aleurones were thoroughly washed with fresh incubation buffer. The tissue was then incubated for 16 h at 28°C in incubation buffer with or without 1 μ M GA_3 . Aleurones not treated with the thiol blockers were used as controls. The α -amylase was assayed using the starch- I_2 KI procedure [26]. One unit (U) of α -amylase activity was defined as the amount of enzyme which produces a change of 1.0 absorbance unit per minute at 620 nm. Two independent experiments were carried out in which three determinations from duplicate samples of each treatment were made. For statistical analysis, the GraphPad InStat software was used.

Microsomal fraction isolation and membrane protein extraction

Two hundred isolated aleurone layers were incubated for 5 h at 28°C in incubation buffer (10 aleurones ml^{-1}) with or without 1 μ M GA_3 . After this time, incubation buffer was eliminated and aleurone layers were dried with tissue paper. Aleurone layers were homogenized in a mortar with 20 ml chilled homogenization buffer (330 mM sucrose, 5 mM EGTA, 100 mM Tris-HCl, pH 5.0, Boehringer protease inhibitor cocktail) in the presence of either 14.2 mM β -mercaptoethanol (β -ME) or 50 mM *N*-ethylmaleimide (NEM). The homogenate was filtered through six cloth layers. To eliminate protein bodies, the sample was centrifuged at 10,000g at 4°C for 10 min [27]. The supernatant was collected in chilled ultracentrifuge tubes

and centrifuged at 112,000g at 4°C for 1 h. Microsome pellets from NEM-treated tissue were additionally washed with homogenization buffer and further centrifuged at 112,000g for 30 min. Supernatants from both treatments were discarded and pellets were resuspended in 300 μ l of resuspension buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EGTA, 2% CHAPS, and 4 M urea). Samples were vortexed and centrifuged in a microfuge at 14,000 rpm. Supernatants were collected and pellets were reextracted with 200 μ l of resuspension buffer. Centrifugation was repeated and the supernatants from each sample were pooled.

Protein quantification

Protein concentration of the samples was determined using the 2-D Quant kit according to the manufacturer instructions (Amersham Biosciences).

Membrane protein thiol content determination by IAIT labeling

The synthesis of N-iodoacetyl-[¹²⁵I]-3-iodotyrosine ([¹²⁵I]IAIT) was as described by Gitler et al. [28]. [¹²⁵I]IAIT had a specific activity of 20 Ci/mmol and was dissolved in 0.25% dimethylformamide-benzene. Prior to protein labeling, 15 μ l of [¹²⁵I]IAIT solution was evaporated per each sample to be labeled.

For protein thiol content determination, microsomal pellets from reduced and NEM-treated tissue were resuspended in labeling buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10 mM CTABr, and Boehringer protease inhibitor cocktail). Microsomal protein samples (100 μ g) were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) and added to the dry [¹²⁵I]IAIT. Samples were incubated for 30 min at room temperature and the reaction was stopped by the addition of 50 μ l sample buffer (30% glycerol, 15% SDS, 0.19 M Tris-HCl, pH 6.8, 2 M β -ME). The labeled samples were precipitated with methanol as described by Gitler et al. [29] and the total IAIT incorporated was determined by means of a Beckman scintillation counter. The quantity of the in vivo thiol groups was calculated by subtracting the [¹²⁵I]IAIT incorporation into the NEM-treated samples from the totally reduced protein without NEM treatment.

Thiol-affinity chromatography

CHAPS-urea-solubilized membrane proteins (NEM treated or nontreated) were reduced by incubation with 10 mM β -ME for 1 h at room temperature previous to thiol-affinity chromatography.

Thiol-affinity chromatography was carried out with phenylarsine oxide-modified resin (ThioBond, Invitrogen). The resin was activated as indicated by the manufacturer and equilibrated with elution buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EGTA, and 0.7% CHAPS. Reduced solubilized membrane proteins (800 μ g) were layered over 75 μ l of ThioBond in a 1.5-ml Eppendorf tube and incubated for 1 h with gentle rotation. The resin was left to sediment by gravity and the nonbinding fraction (supernatant) was collected. The resin was washed 6 times with elution buffer containing 1 mM β -ME with gentle

rotation for 5 min each. The specifically bound protein was eluted with 200 μ l of elution buffer containing 20 mM DTT by gently shaking for 15 min. The resin was left to sediment by gravity and the eluted protein was collected. A second elution was performed with 100 μ l elution buffer with 20 mM DTT for 15 min. Fractions of eluted protein were pooled. Protein in this fraction was precipitated with 3 vol of ice-cold 10% aqueous TCA in acetone overnight at -20°C. Following centrifugation at 14,000 rpm for 30 min and 4°C, the pellet was washed three times with cold acetone and vacuum-dried. Samples were stored at -20°C until used. Thiol-affinity chromatography of CHAPS-urea-solubilized membrane proteins from tissue isolated in the presence of β -ME resulted in a fraction enriched in thiol-containing proteins, while the in vivo oxidized (disulfide) proteins were obtained from the NEM-treated tissue. From now on, these fractions will be referred to as total thiol proteins and disulfide proteins, respectively.

Two-dimensional electrophoresis

Samples were solubilized in rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2% IPG buffer, pH 4–7 (Amersham Biosciences), 0.002% bromophenol blue, 2.8 mg/ml DTT) by intense vortexing for approximately 1 h. When completely solubilized, samples were absorbed overnight onto 7-cm pH 4–7 IPG strips (Amersham Biosciences) at 20°C. Isoelectric focusing (IEF) was performed on a Multiphor II System (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Focusing conditions were as follows: 500 V for 1 h (step mode), 3500 V for 1.5 h (gradient mode), and 3500 V for 5000 V h. For second-dimension gel, the gel strips were incubated with equilibration buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 10 mg/ml DTT, a trace of bromophenol blue) and equilibration buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 25 mg/ml iodoacetamide, a trace of bromophenol blue) for 15 min each and subsequently placed horizontally onto a Tris-glycine SDS polyacrylamide gel (10%). SDS-PAGE was carried out in a Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) by applying 15 mA/gel for 15 min and 30 mA/gel for 1.3 h. The 2D gels were silver-stained using the silver staining kit (Amersham Biosciences).

Two-dimensional gel analysis

Standard images of two-dimensional electrophoresis gels from total thiol proteins and disulfide proteins (treated with or without GA₃) were generated by using PD-QUEST software (Bio-Rad). At least three replicate gels from independent samples were used for each image. Analysis was made by comparing standard images created for each treatment.

Results and discussion

Effect of plasma membrane thiol blockage

To evaluate the participation of plasma membrane thiol proteins in the aleurone response to GA₃, we determined if GA₃

function was affected after tissue pretreatment with membrane-impermeable thiol blockers. Aleurones treated without any thiol blocker and incubated with GA₃ showed the highest α -amylase activity (20.11 ± 4.6 U aleurone⁻¹), which was considered as 100% of the tissue response. Treatment with the thiol blockers produced almost a 50% decrement in the GA₃ response (Fig. 1).

Thiol reagents used in this study have different chemical structures and block thiols through different mechanisms. Mersalyl and PCMBS are organic mercurials which react with protein thiol groups to form monomercaptides [30,31], while DTNB is an aromatic disulfide that forms mixed disulfides with monothiols and induces disulfide formation between protein vicinal thiols [32,33]. However, all thiol blockers had the same effect on the aleurone response. This suggests that the blocked thiol groups are equally available to the three sulfhydryl reagents. It has been argued that some organic mercurials may not be completely specific for thiol groups [31]. However, the fact that DTNB has the same effect as mercurials indicates that all thiol blockers react only with sulfhydryl groups.

The decrease of the aleurone layer response to GA₃ after thiol blocker treatment suggests that important plasma membrane sulfhydryl groups are involved in GA₃ perception. There are at least two possible mechanisms in which these sulfhydryl groups could be participating. The first mechanism would involve the putative plasma membrane GA₃ receptor [18,19], whose sulfhydryl groups would be relevant for correct GA₃ perception. Even though unequivocal identification of the GA₃ receptor has not yet been possible, photoaffinity labeling with a ¹²⁵I-GA₄ probe has allowed the identification of two plasma membrane GA₃-binding polypeptides (18 and 68 kDa) [34]. The simultaneous labeling of these peptides suggests that GA₃ receptor might be a complex of at least two proteins [13]. If the putative receptor activation depended on disulfide formation between subunits, thiol blockage would impede such activation and therefore promote complete inhibition of the response. The observed partial inhibition of the response indicates that the

putative receptor activation is not dependent on dimerization by disulfide bonding. This is supported by evidence that shows that these polypeptides are not disulfide linked [13]. Another possibility is that thiol blockage could alter the proper interaction between receptor subunits and modify either its affinity or its binding capacity to GA₃ [35,36]. The second mechanism would involve thiol alteration of other membrane proteins. This might affect the conformation of the receptor or its capacity to interact with other membrane-associated signal transducers, such as PLC [37] or G proteins [38]. In any case, the GA₃ response would be reduced with respect to the non-thiol-blocked tissue, as observed in this work. Therefore, the partial inhibition of the GA₃-induced α -amylase synthesis by the membrane-impermeable thiol blockers was interpreted as indicating that the GA₃ perception in aleurone may need accessory sensitive redox proteins.

Effect of GA₃ on membrane protein thiol content

Because of the nonspecific oxidation of proteins during isolation procedures, accurate measurement of the in vivo redox state of sulfhydryl groups is difficult. Gitler et al. developed a method which allows the isolation of in vivo oxidized proteins [29]. This method consists of three steps: (1) in situ alkylation of sulfhydryl groups by a large excess of membrane-permeable NEM, (2) NEM removal and protein disulfide reduction to sulfhydryls, and (3) [¹²⁵I]IAIT labeling of these thiols. This labeled protein fraction represents the in vivo oxidized proteins. Also, a nonalkylated reduced protein fraction was prepared and labeled. This sample represents the total thiol proteins. The indirect determination of the in vivo protein thiol content can be calculated from the difference in radioactive labeling of the total thiols and the disulfide proteins. Taking advantage of this strategy, we determined if GA₃ induced changes in the sulfhydryl content of aleurone membrane proteins.

The results showed that GA₃ induced a significant increase in sulfhydryl group content in aleurone membrane proteins (control, 27.16 ± 4.14 pmol SH/mg protein; with GA₃, 58.34 ± 13.24 pmol SH/mg protein; mean \pm SD, $n = 6$, $P < 0.001$). It is important to note that NEM-alkylated cell extracts were not labeled at all by [¹²⁵I]IAIT if the DTT reduction step was omitted. Such an increase in protein thiol content has also been reported in other systems. As noted before, human sperm capacitation is a ROS-dependent process which involves an increase in the thiol content of Triton-soluble proteins [9]. Also, Nardai et al. have reported a significant increase in protein-sulfhydryl content of rat liver microsomes after 4 weeks of streptozotocin-induced diabetes [39]. In contrast, Gitler et al. have reported a calcium-dependent oxidation of proteins during cellular growth stimulation by the epidermal growth factor [40].

Altogether, these results strongly suggest that different external stimuli, like GA₃ in aleurone, may cause a specific shift in the redox status of protein thiol groups. This redox change may be relevant for the system response to the particular signal.

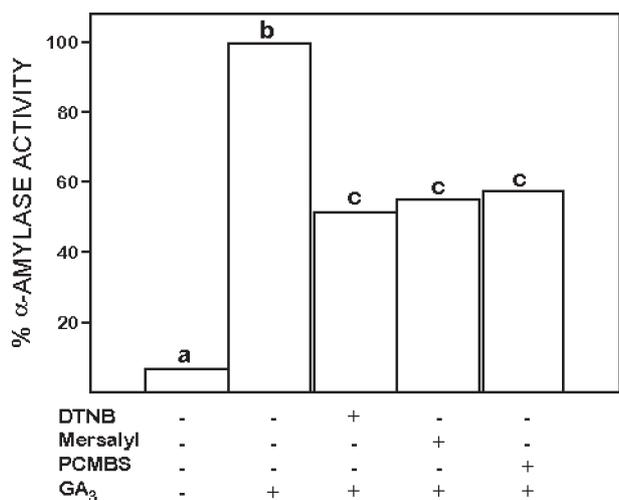


Fig. 1. Effect of membrane-impermeable thiol blockers in the aleurone layer response to GA₃. DTNB 2 mM; mersalyl 50 μ M; PCMBS 150 μ M; GA₃ 1 μ M. Different letters over the columns mean significant differences between treatments ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ for PCMBS treatment).

Identification of GA₃-redox-sensitive targets

The above results indicated that redox changes induced by GA₃ are important for the aleurone layer response. Nevertheless, currently, there is no experimental evidence of redox-regulated proteins in the aleurone layer. The isolation and identification of proteins which undergo redox changes during hormone tissue induction might support the participation of redox regulation in this system. However, the search for these proteins is not easy because of the large number of proteins within any cell. Furthermore, the aleurone layer is rich in storage proteins [41], whose presence could promote the underestimation of low abundance proteins [42].

Taking this into consideration, as well as the fact that aleurone membranes play a crucial role in GA₃ signaling and response [14], we circumscribed our search to membrane-associated proteins from protein body free microsomal fractions.

Two-dimensional electrophoretic patterns of total thiol and disulfide membrane proteins were generated for aleurone layers incubated with or without GA₃. Fig. 2 shows the standard gel images generated by PDQUEST from GA₃-treated and -untreated tissue.

The number of protein spots detected in this work is discrete, in comparison with a total of 850 soluble protein spots reported to be present in the aleurone layer [43]. Thus, electrophoretic pattern analysis becomes less complicated. There was not a substantial difference between the thiol-containing proteins detected in the GA₃-untreated and -treated tissue (Figs. 2A and B). From the total number of protein spots in each treatment (111 and 100, respectively), 85 were present in both treatments,

and will be referred to as constitutive. Each treatment had a number of treatment-specific protein spots, 24 for the noninduced and 14 for the GA₃-induced tissue (Figs. 2A and B, circled protein spots).

As expected, the number of protein spots in the disulfide 2D electrophoretic patterns was smaller than that of the total thiol proteins (compare Figs. 2A and C vs Figs. 2B and D). Untreated aleurones had a larger number of oxidized proteins in vivo, while GA₃-treated tissue presented only 32 protein spots (Figs. 2C and D). This result is in agreement with an increase of GA₃-treated membrane sulfhydryl content determined by [¹²⁵I]IAIT labeling.

Using the same rationale as for the in vivo thiol protein content determination, comparison of the 2-D electrophoretic patterns of thiol-containing and disulfide-containing proteins allowed the determination of the in vivo redox state of each protein spot. Protein spots present in the total sulfhydryl pattern and in the disulfide pattern were assigned an in vivo oxidized state. Protein spots present in the total sulfhydryl pattern and not detected in the disulfide pattern were assigned an in vivo reduced state (Fig. 3).

It is worth noting that our experimental strategy for the determination of the redox state of every protein present in the 2-D electrophoretic patterns was reproducible and precise. There were only 10 constitutive proteins whose redox state could not be assigned; therefore, they were not considered for further analysis.

In general, the number of reduced proteins in each treatment was higher than that of the oxidized proteins. Fifty-three constitutive proteins preserved their redox state independently of the GA₃ treatment. A larger number of specific proteins detected from both treatments tended to be in a reduced state.

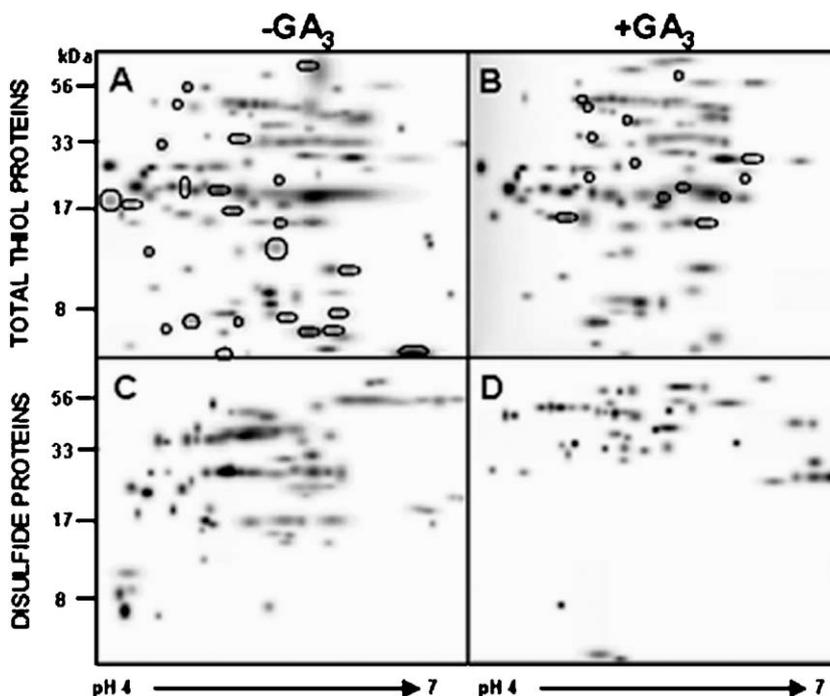


Fig. 2. Two-dimensional electrophoretic patterns of total thiol and disulfide membrane proteins. Standard gel images generated by PD-OUEST (A, C) GA₃-untreated and (B, D) GA₃-treated aleurones. GA₃ treatment-specific protein spots are circled in each pattern.

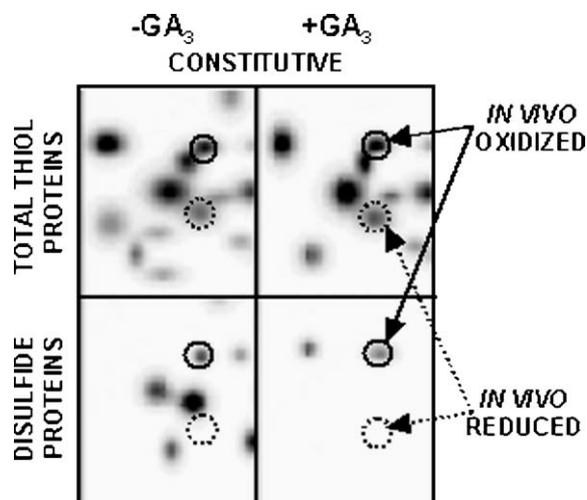


Fig. 3. Protein spots in vivo redox state determination. Solid line, example of an in vivo oxidized constitutive protein; dotted line, example of an in vivo reduced constitutive protein.

A comparison between disulfide-containing proteins in GA_3 -treated and -untreated tissue shows that redox changes are discrete. Almost 62% of the constitutive proteins preserved their redox state.

In response to GA_3 stimulus, 22 proteins were found to have their redox state modified. Of these, 17 had enhanced reduction when compared with the controls. Surprisingly, only 5 proteins were found to be oxidized to a higher disulfide content. Examples of each case are presented in Fig. 4 and Table 1 lists the molecular weight and isoelectric point of all the identified targets.

ROS formation would be expected to generate hydrogen peroxide that can directly oxidize dithiol proteins to disulfides through sulfenic acid intermediates. However, the finding that proteins showed enhanced reduction is novel. This could

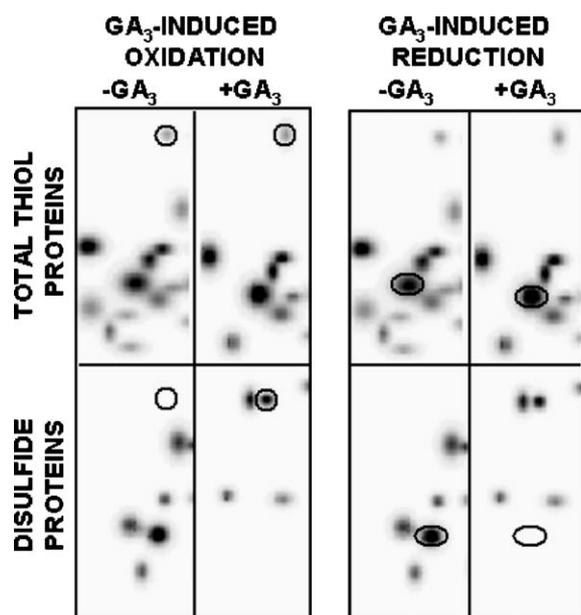


Fig. 4. GA_3 -induced oxidation and reduction of specific protein spots.

Table 1

Calculated molecular weight and isoelectric point of GA_3 -redox-sensitive targets

GA ₃ reduced			GA ₃ oxidized		
Spot	MW (kDa)	pI	Spot	MW (kDa)	pI
1	22.0	4.3	A	48.8	4.4
2	10.2	4.6	B	32.5	4.9
3	17.3	4.6	C	33.7	5.0
4	18.0	4.5	D	48.1	5.0
5	22.1	4.5	E	63.3	5.0
6	21.5	4.6			
7	26.6	4.6			
8	56.3	4.7			
9	26.4	4.8			
10	15.8	5.0			
11	48.1	5.1			
12	38.7	5.2			
13	16.5	5.3			
14	29.5	5.3			
15	45.6	5.4			
16	21.2	5.4			
17	33.5	5.4			

derive from the cell activation of reducing systems on the oxidative stress induced by ROS generation. Alternatively, GA_3 could activate protein disulfide reductases such as the ferredoxin-thioredoxin reductase described by Crawford et al. [44]. These authors found many proteins that were reduced by light activation of the ferredoxin-thioredoxin system. In this respect, it is also interesting that Trebitsh et al. have described the light-induced reduction and oxidation of proteins occurring during translation in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast [45].

At this point, it is not possible to know how and why GA_3 is inducing these redox changes. Nevertheless, the identification of these proteins will allow further studies to determine their participation in the aleurone response to GA_3 , as well as to evaluate their redox regulation. An additional advantage of this experimental strategy is that it is not only possible to identify targets of redox regulation, but also to separate proteins which may be responsible for the specific protein redox change, for example, thioredoxins.

Finally, the identification of a group of aleurone proteins whose redox state is modified specifically by GA_3 suggests that a redox regulation mechanism is involved in this hormonal system.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Felipe Cruz-García and Dr. Wilhem Hansberg for critical discussion of this work, M.Sc. Laurel Fabila for technical assistance, and Judi Wutzke from the Agronomy Department, WSU, Pullman, for assistance in the importation of the Himalaya barley seeds. We also thank Dr. Carlos Gitler and Dr. A.C. Leopold for thorough review of the manuscript. This project was supported by CONACyT (Project 40599-Z and fellowship No. 113417) and DGAPA-UNAM (complementary fellowship).

References

- [1] Jones, D. P.; Go, Y. M.; Anderson, C. L.; Ziegler, T. R.; Kinkade, J. M.; Kirlin, W. G. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling control. *FASEB J.* doi:10.1096/fj.030977fje; 2004.
- [2] Yano, H.; Kuroda, S.; Buchanan, B. B. Disulfide proteome in the analysis of protein function and structure. *Proteomics* **2**:1090–1096; 2002.
- [3] Lee, K.; Lee, J.; Kim, Y.; Bae, D.; Kang, K. Y.; Yoon, S. C.; Lim, D. Defining the plant disulfide proteome. *Electrophoresis* **25**:532–541; 2004.
- [4] Batty, J. W.; Hampton, M. B.; Winterbourn, C. C. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **2**:1261–1266; 2002.
- [5] Kamata, H.; Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* **11**:1–14; 1999.
- [6] Nishida, M.; Maruyama, Y.; Tanaka, R.; Kontani, K.; Nagao, T.; Kurose, H. Gai and Gao are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* **408**:492–495; 2000.
- [7] Chiarugi, P.; Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **28**:509–514; 2003.
- [8] Suzuki, Y. J.; Ford, G. D. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**:345–353; 1999.
- [9] De Lamirande, E.; Gagnon, C. Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic. Biol. Med.* **35**:1271–1285; 2003.
- [10] Jia, W.; Zhang, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation in relation to reducing agents and sulfhydryl modifiers in maize plants. *Plant Cell Environ.* **23**:1389–1395; 2000.
- [11] Labrecque, J.; McNicoll, N.; De Marquis, M.; Lean, A. A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity—Role of receptor dimerization in signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**:9752–9759; 1999.
- [12] Cabrillac, D.; Cock, J. M.; Dumas, C.; Gaude, T. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**:220–223; 2001.
- [13] Lovegrove, A.; Hooley, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* **5**:102–110; 2000.
- [14] Bethke, P. C.; Schuurink, R.; Jones, R. L. Hormonal signalling in cereal aleurone. *J. Exp. Bot.* **48**:1337–1356; 1997.
- [15] Palma, K.; Kermod, A. R. Metabolism of hydrogen peroxide during reserve mobilization and programmed cell death of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **35**:1261–1270; 2003.
- [16] Fath, A.; Bethke, P. C.; Jones, R. L. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellin acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol.* **126**:156–166; 2001.
- [17] Bailly, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* **14**:93–107; 2004.
- [18] Hooley, R.; Beale, M. H.; Smith, S. J. Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* **183**:274–280; 1991.
- [19] Gilroy, S.; Jones, R. L. Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* **104**:1185–1192; 1994.
- [20] Bush, D. S. Effects of gibberellin acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* **199**:89–99; 1996.
- [21] Gilroy, S. Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. *Plant Cell* **8**:2193–2209; 1996.
- [22] Steer, M. W. The role of calcium in exocytosis and endocytosis in plant cells. *Physiol. Plant.* **72**:213–220; 1988.
- [23] Szewczyk, A.; Woźcik, G.; Lobanov, N. A.; Nalecz, M. Modification of the mitochondrial sulfonylurea receptor by thiol reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**:255–258; 1999.
- [24] Van Iwaarden, P. R.; Driessen, A. J.; Konings, W. N. What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**:161–170; 1992.
- [25] Aitken, R. J.; Ryan, A. L.; Baker, M. A.; McLaughlin, E. A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:994–1010; 2004.
- [26] Chrispeels, M. J.; Varner, J. E. Hormonal control of enzyme synthesis: on the mode of gibberellin acid and abscisic acid in aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* **42**:1008–1016; 1967.
- [27] Shimoni, Y.; Zhu, X.; Levanony, H.; Segal, G.; Galili, G. Purification, characterization and intracellular localization of glycosylated protein disulfide isomerase from wheat grains. *Plant Physiol.* **108**:327–335; 1995.
- [28] Gitler, C.; Mogyoros, M.; Kalef, E. Specific labeling of protein vicinal dithiols to study the role of protein-S₂ to protein-(SH)₂ conversion in metabolic regulation and oxidative stress. In: Packer, L., ed. *Oxygen radicals in biological systems: Part C. Methods in enzymology, volume 233*. New York: Academic Press; 1994: 403–415.
- [29] Gitler, C.; Zarmi, B.; Kalef, E. General method to identify and enrich vicinal thiol proteins present in intact cells in the oxidized, disulfide state. *Anal. Biochem.* **252**:48–55; 1997.
- [30] Riordan, J. F.; Vallee, B. L. Reactions with *N*-ethylmaleimide and *p*-mercuribenzoate. In: Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N., eds. *Enzyme structure: Part B. Methods in enzymology, volume 25*. New York: Academic Press; 1972: 449–464.
- [31] Boyer, P. D. Sulfhydryl and disulfide groups of enzymes. In: Boyer, P. D.; Lardy, H.; Myrbäck, K., eds. *The enzymes, volume 1*. New York: Academic Press; 1959: 511–586.
- [32] Jocelyn, P. C. Spectrophotometric assay of thiols. In: Jacoby, W. B.; Griffith, O. W., eds. *Sulfur and sulfur aminoacids. Methods in enzymology, volume 143*. Orlando, FL: Academic Press; 1987:45–67.
- [33] Gitler, C.; Londner, M. Use of *p*-nitrophenyl disulfide to measure reductive capacity of intact cells. In: Packer, L., ed. *Biothiols, monothiools, protein thiols and thiol radicals. Methods in enzymology, volume 251*. New York: Academic Press; 1995: 279–286.
- [34] Lovegrove, A.; Barrat, D. H.; Beale, M. H.; Hooley, R. Gibberellin-photoaffinity labeling of two polypeptides in plant plasma membranes. *Plant J.* **15**:311–320; 1998.
- [35] Mazzoni, M. R.; Giusti, L.; Rossi, E.; Taddei, S.; Lucacchini, A. Role of cysteine residues of rat A_{2a} adenosine receptor in agonist binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**:159–170; 1997.
- [36] Brkljacic, J.; Milutinovic, D. V.; Dundjerski, J.; Matic, G. Mercury inhibits rat liver and kidney glucocorticoid receptor hormone binding activity. *Cell Biol. Toxicol.* **20**:171–182; 2004.
- [37] Kashem, M. A.; Itoh, K.; Iwabuchi, S.; Hori, H.; Mitsui, T. Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of (-amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* **41**:399–407; 2000.
- [38] Ritchie, S. M.; Swanson, S. J.; Gilroy, S. From common signaling components to cell specific responses: insights from the cereal aleurone. *Physiol. Plant.* **115**:342–351; 2002.
- [39] Nardai, G.; Stadler, K.; Papp, E.; Korcsmáros, T.; Jakus, J.; Csermely, P. Diabetic changes in the redox status of the microsomal protein folding machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**:787–795; 2005.
- [40] Gitler, C.; Zarmi, B.; Kalef, E.; Meller, R.; Zor, U.; Goldman, R. Calcium-dependent oxidation of thioredoxin during cellular growth initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**:624–628; 2002.
- [41] Bethke, P. C.; Hillmer, S.; Jones, R. L. Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone. *Plant Physiol.* **110**:521–529; 1996.
- [42] Chromy, B. A.; Gonzales, A. D.; Perkins, J.; Choi, M. W.; Corzett, M. H.; Chang, B. C.; Corzett, C. H.; McCutchen-Maloney, S. L. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high abundant proteins. *J. Proteome Res.* **3**:1120–1127; 2004.
- [43] Finnie, C.; Svensson, B. Feasibility of a tissue-specific approach to barley proteome analysis: aleurone layer, endosperm, embryo and single seeds. *J. Cereal Sci.* **38**:217–227; 2003.
- [44] Crawford, N. A.; Droux, M.; Kosover, N. S.; Buchanan, B. B. Evidence for function of the ferredoxin/thioredoxin system in the reductive activation of target enzymes of isolated intact chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**:223–239; 1989.
- [45] Trebitsh, T.; Levitan, A.; Sofer, A.; Danon, A. Translation of chloroplast psbA mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Mol. Cell. Biol.* **20**:1116–1123; 2000.