

00582

12
2g

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

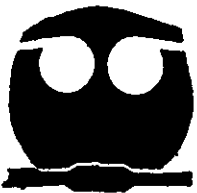


FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA
ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE LA MEMBRANA
PLASMATICA DE EMBRIONES DE MAIZ, DURANTE
LA GERMINACION TEMPRANA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T A :
M. en C. SOBEIDA SANCHEZ NIETO

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARINA GAVILANES RUIZ



MEXICO, D.F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

269692
/



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Armando Gómez Puyou.
VOCAL:	Dr. Rafael Moreno Sánchez.
VOCAL:	Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou.
VOCAL:	Dr. Blas Lotina Henssen.
SECRETARIO:	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.
SUPLENTE:	Dr. Edgardo Escamilla Marván.
SUPLENTE:	Dr. Juan Pablo Pardo

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz.

DEDICATORIAS

Con amor para mis hijos Leo y Benja

Para mi amor Leo

Y en recuerdo de mi papá Julio Sánchez Cabrera
y mi tío Guillermo Sánchez Cabrera.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz por su acertada dirección, pero sobretodo por el apoyo y la confianza que me brindó en todo momento. Ya que no solo se preocupó por mi desempeño académico sino también por mi estado emocional y de salud, se lo agradezco infinitamente.

A los miembros del comité tutorial Dra. Marietta Tuena, Dra. Irma Bernal Lugo y Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por sus atinadas observaciones durante la realización de este trabajo.

Agradezco a todos los miembros del jurado por la revisión crítica de la tesis y los manuscritos que en ella se incluyen.

Se agradece la ayuda del Dr. Rolando Hernández Muñoz en las mediciones de dienos conjugados y composición de fosfolípidos.

Agradezco la ayuda técnica de la Q.F.B. M. Consuelo Enríquez Arredondo.

Este proyecto fue financiado parcialmente por la DGAPA, UNAM (IN204097) y por el programa de apoyo a las divisiones de Estudios de Posgrado de la UNAM (PADEP-tesis doctoral 5327, 5355). La alumna recibió beca de la DGAPA.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Sobeida Nieto Cacho y a mis hermanos María del Carmen y Julio Alberto Sánchez Nieto por su cariño y su invaluable ayuda y paciencia en el cuidado de mis dos niños.

A Oscar, Alicia, Vanessa, Adriana, Carmen, Manuela, Chelo, Andrea, Luis y Nora por las gratas horas que hemos pasado juntos y por la confianza que me demostraron.

A Rocío muy especialmente por la hermosa amistad que me brinda.

Agradezco a todos mis compañeros del departamento de bioquímica por haberme brindado su cariño, confianza y apoyo en la realización de este trabajo. Por su preocupación por los niños que primero llevaba en mi y que ahora los ven a veces correr por los pasillos y en los jardines.

Índice general

	Página
I Introducción	1
I.1 Formación de la semilla de maíz	1
I.2 Germinación	3
I.3 La ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas	6
I.3.1 Características bioquímicas	6
I.3.2 Estructura de la enzima	9
I.3.2.1 Purificación	9
I.3.2.2 Secuencia de aminoácidos de la proteína	10
I.3.2.3 Estructura secundaria y terciaria	11
I.3.3 Regulación	13
I.3.3.1 Expresión diferencial de isoformas	14
I.3.3.2 Modificación covalente	16
I.3.3.2.1 Proteólisis	16
I.3.3.2.2 Fosforilación	17
I.3.3.3 Interacción con moléculas patogénicas o fitorreguladores	18
I.3.3.3.1 Compuestos patogénicos secretados por microorganismos	18
I.3.3.3.2 Fitorreguladores	21
I.3.3.4 Modificación del ambiente membranar	23
I.3.3.5 Formación de oligómeros	25
II. Antecedentes inmediatos	27
III. Objetivos	29
III.1 Objetivo general	29
III.2 Objetivos particulares	29
IV. Materiales y métodos complementarios	30
IV.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	30
IV.2 Electrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida SDS a papel de nitrocelulosa.	31
IV.3 Medición de la incorporación de Metionina- ³⁵ S en las fracciones de homogeneizado sin núcleos y microsomal de embriones embebidos por diferentes tiempos.	31
IV.4 Inhibición de la síntesis <i>de novo</i> de la enzima utilizando cicloheximida y α -amanitina.	32
IV.5 Desfosforilación de la enzima	32
V. Resultados	33
V.1 Artículo 1: Comparación de la actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática en vesículas obtenidas de embriones de maíz secos e hidratados	34
V.2 Artículo 2: Propiedades cinéticas de la ATPasa de H ⁺ de embriones de maíz secos y embebidos 5 horas en una fracción de membranas plasmáticas y en una preparación solubilizada.	37

	Página
V.3 Resultados complementarios.	41
V.3.1 Efecto de la desfosforilación en la actividad de la enzima.	41
V.3.2 Detección de los niveles de ATPasa a los diferentes tiempos de imbibición con un anticuerpo específico.	42
V.3.3 Incorporación de Metionina- ³⁵ S a las proteínas totales, a la fracción membranal y a la banda de ATPasa de los embriones embebidos diferentes tiempos.	44
V.3.4 Efecto de inhibidores de la traducción y transcripción en la actividad de la ATPasa.	45
V.3.5 Efecto de la concentración de Mg ²⁺ libre en la actividad de la enzima y en su inhibición por vanadato.	47
V.3.5.1 Efecto del magnesio en los parámetros cinéticos de la enzima.	47
V.3.5.2 Efecto del magnesio en la inhibición por vanadato	52
VI. Discusión general	55
VII. Conclusiones	64
VIII. Perspectivas	65
IX. Apéndice	67
IX.1 Artículo 3: Purificación de membranas plasmáticas de embriones de maíz secos	67
X. Bibliografía	68

Índice de figuras

	Página	
Figura 1	Desarrollo, maduración, estructura y germinación de una semilla de maíz.	2
Figura 2	Esquema que ilustra las transiciones de fase de los fosfolípidos de la membrana al cambiar el estado de hidratación de sus componentes.	4
Figura 3	Papel de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas en la fisiología de la célula.	6
Figura 4	Esquema del mecanismo de reacción propuesto para la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas.	7
Figura 5	Representación de los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de plantas y la secuencia del dominio inhibitorio.	12
Figura 6	Modelo del mecanismo de la activación de la ATPasa de H ⁺ , en el que se involucra a la proteína 14-3-3 y a la fusicocina (FC).	20
Figura 7	Efecto del tiempo de incubación con fosfatasa alcalina sobre la actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de embriones embebidos 0 y 5 horas.	41
Figura 8	Curva de ATPasa de H ⁺ detectada con anticuerpos específicos en las vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos por diferentes tiempos.	43
Figura 9	Curva de actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato de las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.	48
Figura 10	Efecto del Mg ²⁺ libre en la actividad de la ATPasa de las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.	50
Figura 11	Efecto del magnesio libre en la cinética de actividad de ATPasa de las VMP de embriones sin embeber, a diferentes concentraciones de sustrato.	51
Figura 12	Efecto del vanadato y el magnesio libre en los parámetros cinéticos de la ATPasa de las VMP de embriones sin embeber.	53
Figura 13	Cambios en los RNAm, proteína, porcentaje de defosforilación y forma de ATPasa de H ⁺ que se encuentra en las membranas plasmáticas en la fase inicial de la germinación.	58

Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Composición de minigeles de poliacrilamida-SDS según la técnica de Schägger y von Jagow (1987).	30
Tabla 2	Incorporación de Metionina- ³⁵ S a las proteínas de las fracciones H-N y microsomal y a la banda de 100kDa de peso molecular de los embriones embebidos por diferentes tiempos.	44
Tabla 3	Efecto de los inhibidores de la síntesis de proteínas sobre la actividad de hidrólisis de ATP de las VMP de embriones embebidos diferentes tiempos.	46
Tabla 4	Parámetros cinéticos de la ATPasa de la membrana plasmática.	49
Tabla 5	Constantes de inhibición de Na ₃ VO ₄ (I ₅₀) sobre la actividad de la ATPasa de protones a diferentes concentraciones de sustrato (MgHATP').	52

Abreviaturas

E1 o E2	Conformación 1 o 2 que adopta la ATPasa durante su ciclo catalítico
Fracción H-N	Fracción de homogeneizado sin núcleos
I_{50}	Concentración de inhibidor que reduce la actividad de una enzima al 50%
Km	Constante de Michaelis
LPC	Lisofosfatidilcolina
VMP	Vesículas de membrana plasmática

ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE EMBRIONES DE MAÍZ, DURANTE LA GERMINACIÓN TEMPRANA.

RESUMEN

Una de los aspectos más interesantes de la germinación de semillas es la manera en la cual la actividad metabólica se reinicia después de que ha ocurrido la desecación natural de la semilla. La reactivación de la actividad catalítica toma lugar después de la entrada de agua a la semilla, como es en las primeras horas de la germinación. No obstante, se conoce poco sobre lo que sucede en estas primeras horas, especialmente respecto a la actividad enzimática de las proteínas de membrana. Uno de las enzimas que puede ser muy importante en este periodo es la ATPasa de protones. El papel fisiológico de esta enzima es la de facilitar el transporte secundario de nutrientes y también acidificar el apoplasto, ayudando a la elongación celular y a la regulación del pH. Funciones que deben llevarse a cabo en las células del embrión para completar con éxito la germinación. Es por ello, que encontramos la actividad de la ATPasa en las primeras horas de la germinación. El objetivo de este trabajo fue el de estudiar los factores que podrían modificar la actividad de la enzima durante las primeras 5 h de germinación de los embriones de maíz.

Resultados anteriores en el laboratorio mostraron la actividad de la ATPasa a través de las primeras 5 horas de imbibición, pero con un máximo de actividad a las 2 horas. Tratando de investigar si la misma enzima era responsable de la actividad a todos los tiempos medidos, en este trabajo se investigó el efecto en la actividad de la enzima a vanadato, lisofosfatidilcolina, tripsina, pH y temperatura en las membranas plasmáticas de los embriones embebidos 0 y 5 horas. Se encontró que la actividad de las VMP de embriones embebidos 5 horas fue menos sensible a vanadato y lisofosfatidilcolina y más sensible a temperaturas de desnaturalización y con un intervalo amplio de pH, comparado con la actividad de los embriones no embebidos. Al purificar la actividad de ATPasa sensible a vanadato mediante una columna de intercambio aniónico se encontró un pico de actividad para la preparación de los embriones no embebidos y otra muy cercana, pero con un tiempo de retención mayor para la de los embriones embebidos 5 horas. Estos datos pueden ser interpretados como la presencia de una diferente enzima en los embriones secos con respecto a los embriones embebidos, diferencias que pueden deberse a diferentes estructuras primarias, a modificación covalente o al medio anfipático que rodea a la enzima.

Para evaluar la influencia del medio anfipático a las diferencias que se determinaron en las dos actividades de ATPasa medidas, se obtuvieron las constantes cinéticas de la ATPasa en las membranas plasmáticas de los embriones embebidos 0 y 5 horas y también en diferentes medios anfipáticos.

La velocidad de hidrólisis de ATP de las VMP de los embriones embebidos 0 y 5 horas en función de la concentración de sustrato mostró curvas con cooperatividad negativa (número de Hill de 0.45 0.2 y 0.5 0.2 para los embriones embebidos 0 y 5 h, respectivamente). Lo anterior puede explicarse si en la enzima hubiera dos sitios diferentes para la unión de ATP o dos componentes enzimáticos con actividad de

ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE EMBRIONES DE MAÍZ, DURANTE LA GERMINACIÓN TEMPRANA.

ABSTRACT

One of the most interesting aspects of seed germination is the mode in which enzymatic activity is reassumed after the natural desiccation of the seed. Such catalytic reactivation takes place upon water penetration to the seed, i.e. during the first hours of imbibition. However, very little is known about this matter, specially about the characteristics of enzymatic activity from membrane proteins that are present in this time span. One of the most significant enzyme in the function of plant plasma membrane is the H⁺-ATPase. The physiological role of this enzyme is provide the driving force for secondary transport and also to acidify the apoplast, facilitating seed elongation and pH regulation. Such functions have to be fulfilled in the seed by the embryo cells, in order to accomplish a successful germination. For these reasons, we expected to find the enzyme during the first hours of germination. Our aim was to study the evolution of enzyme activity during the first 5 h of embryo imbibition.

Our previous results had shown that the activity was present throughout the first 5 h of imbibition, although a peak of activity appeared at 2h. Trying to see if the same enzyme was responsible of the activity at all the times tested, we studied the response of the activity to vanadate, lysophosphatidylcholine, trypsin, pH and temperature, in the 0 and 5 h embryos. The activity of the latter ones was less sensitive to vanadate and lysophosphatidylcholine, more sensitive to denaturing temperatures and with a broader pH dependance, as compared to the activity of non imbibed embryos. When vanadate-sensitive ATPase activity was purified by anion-exchange chromatography, the peaks obtained from 0 and 5h imbibed embryos were very close, but not overlapping. These data could be interpreted as the presence of a different enzyme in dry and imbibed embryos, due to either different primary structures, covalent modifications or membrane vicinities.

In order to evaluate the contribution of the amphipatic surrounding to the differences found between these two ATPase activities we determine the kinetic constants of the ATPase activity in plasma membrane vesicles, from 0 and 5 h imbibed embryos and in different amphipatic conditions.

The rates of ATP hydrolysis of the plasma membrane vesicles of 0 and 5 h imbibed embryos as a function of the substrate concentration showed curves with negative cooperativity (Hill number of 0.45 ± 0.2 and 0.5 ± 0.2 for 0 and 5 h imbibed embryos, respectively). This could be explained on the basis of two different sites for ATP, or two enzymatic components with ATPase activity. We obtained a good fit of the model that expressed the total velocity as the sum of two enzymatic components with the experimental values. The two components exhibit significant differences in the Km values and were present in both preparations of the embryos. The existence of two components could be explained by the presence of two different enzymes of the association of the two monomers or the two conformational states of the ATPase.

It has been show that a alteration of lipid surrounding of the ATPase can change the activity of the enzyme and its cooperativity. The kinetic constants of the detergent

ATPasa. El mejor modelo que se ajusto a los datos experimentales fue el que expresa la velocidad total como la suma de dos componentes enzimáticos. Los dos componentes presentaron diferencias significativas en los valores de K_m y se encontraron en las dos preparaciones membranales. La existencia de dos componentes se podría explicar como la presencia de dos diferentes enzimas o la asociación de dos monómeros o los dos estados conformacionales de la ATPase.

Se conoce que la modificación del medio anfipático que rodea a la ATPasa puede influir en su actividad y también en su comportamiento cinético. Las constantes cinéticas de la enzima solubilizada en ambas preparaciones se obtuvieron mediante el modelo de dos componentes. El componente 1 mostró cooperatividad y el componente 2 presentó una cinética Michaeliana, sin embargo cuando se le adiciona azolectina a esta preparación el comportamiento cinético cambia. A pesar de que las enzimas de 0 y 5 horas son diferentes estructuralmente, no se encontraron diferencias en las constantes cinéticas cuando el medio anfipático que las rodea es similar. Era probable entonces que el medio anfipático nativo influyera en las diferencias en sensibilidad de la ATPasa a vanadato, lisofosfatidilcolina, pH y temperatura, por lo que se determinó la composición de fosfolípidos membranales en las membranas nativas a 0 y 5 horas de imbibición de los embriones, encontrándose que la composición de fosfolípidos era significativamente diferente.

En este trabajo se encontró que 1) a las 0 y 5 horas de imbibición hay dos diferentes actividades enzimáticas, que posiblemente son el producto de la expresión de diferentes genes, uno propio de la embriogénesis y otro propio de la germinación; 2) las características cinéticas de la enzima en la membrana nativa podrían explicarse si la enzima presenta una conformación nativa, con lo cual presenta dos diferentes sitios de con afinidad distinta por ATP a los dos tiempos de imbibición, o bien a que en las condiciones de ensayo se pudieran detectar las dos conformaciones que presenta la enzima en su ciclo catalítico; 3) el medio anfipático puede modificar los parámetros cinéticos de la enzima posiblemente a través de cambios en la interacción de los monómeros o de la conformación de la enzima 4) la composición de fosfolípidos nativa podría tener un papel en la regulación de la actividad de la enzima a las 0 y 5 horas de imbibición de los embriones.

solubilized enzyme for both preparations only had a good fit with the model of two enzymatic components. Component 1 showed positive cooperativity and Component 2 exhibit Michaelis kinetics, however, this pattern changes when we added azolectin to this solubilized preparation. The detected structural differences on the 0 and 5 h enzymes were not expressed on the kinetic parameters, when the amphipatic milieu that surrounding of both enzymes were similar. The native membrane environment maybe account to the differences in the sensitivity of the ATPase activity to vanadate, lysophosphatidylcholine, pH and temperature, because we found significant differences in the phospholipid composition of the plasma membrane at 0 and 5 hour imbibed embryos.

The results obtained in this work point out: 1) at 0 and 5 hours of imbibition there are two different enzymatic activities, that maybe are product of the expression of different gene, one proper of the embryogenesis and the other proper of the germination; 2) the kinetic behavior on the native membrane could be interpreted as the enzyme in the native membrane acquires a dimeric conformation generating two binding sites with different affinity for ATP at both imbibition times, or the presence of the two conformational states of the enzyme in the catalytic cycle; 3) the lipid environment can alter the kinetic parameters of the enzyme trough a changes in monomers interaction 4) the native environment maybe has a role in the modulation of the enzyme activity at 0 and 5 h imbibed embryos.

I. Introducción

I.1. Formación de la semilla de maíz

El proceso de formación de la semilla de maíz comienza con la doble fertilización, es decir, ocurre una fertilización de los núcleos presentes en el saco embrionario en el ovario, con los dos núcleos espermáticos producidos en el grano de polen. Un núcleo espermático se fusiona con un óvulo para formar un cigoto diploide ($2n$), mientras que el otro núcleo espermático se fusiona con dos núcleos polares, para formar una célula con un núcleo triploide (Lindsey y Topping 1993).

El núcleo triploide no se desarrolla como un tejido homogéneo, ya que las células externas llegan a diferenciarse hasta formar una sola capa de células pequeñas llamada **aleurona** que contienen pocos cuerpos proteicos y que en algunas especies de maíz presentan pigmentación (por el contenido de antocianinas). En la germinación, la aleurona funcionará como el principal sitio de síntesis de enzimas hidrolíticas que tendrá la capacidad de degradar los polímeros almacenados en el endospermo. Por otro lado, las demás células triploides se diferencian para formar el **endospermo**, en las cuales se depositarán, en el caso de las semillas de maíz, principalmente carbohidratos (80% del peso seco del endospermo), proteínas (7%) y una cantidad mínima de lípidos (menos del 1%). La acumulación de reservas en el endospermo involucra un mecanismo altamente organizado, ya que se tiene que coordinar su síntesis con su acumulación en células que se están aún diferenciando (Bewley y Black 1994; Sheridan y Clark 1994).

Por otra parte, la primera división del cigoto ha comenzado y produce una pequeña célula apical y una voluminosa célula basal, en el maíz sólo la célula apical se divide mientras que la célula basal formará parte del suspensor (Figura 1A). Posteriores divisiones de la célula apical darán lugar al embrión y a un conjunto de células que completarán el suspensor del embrión del maíz, éste tiene la función de mantener la comunicación entre la semilla en formación y la planta madre (principalmente para aporte de nutrimentos); sin embargo a partir de los 20 días posteriores a la fertilización el suspensor se absorbe para formar parte del embrión (Lindsey y Topping 1993). El **embrión** está constituido por varios tejidos entre ellos el cotiledón y el eje embrionario. El cotiledón en el maíz está extremadamente modificado, presentándose en el embrión como una estructura en forma de placa, que contiene una escasa cantidad de reservas en comparación con el endospermo y al cual se le ha llamado **escutelo**, en el proceso de germinación el escutelo tendrá la función de absorber y degradar los compuestos almacenados en el endospermo para transportarlos al eje embrionario (Figura 1B).

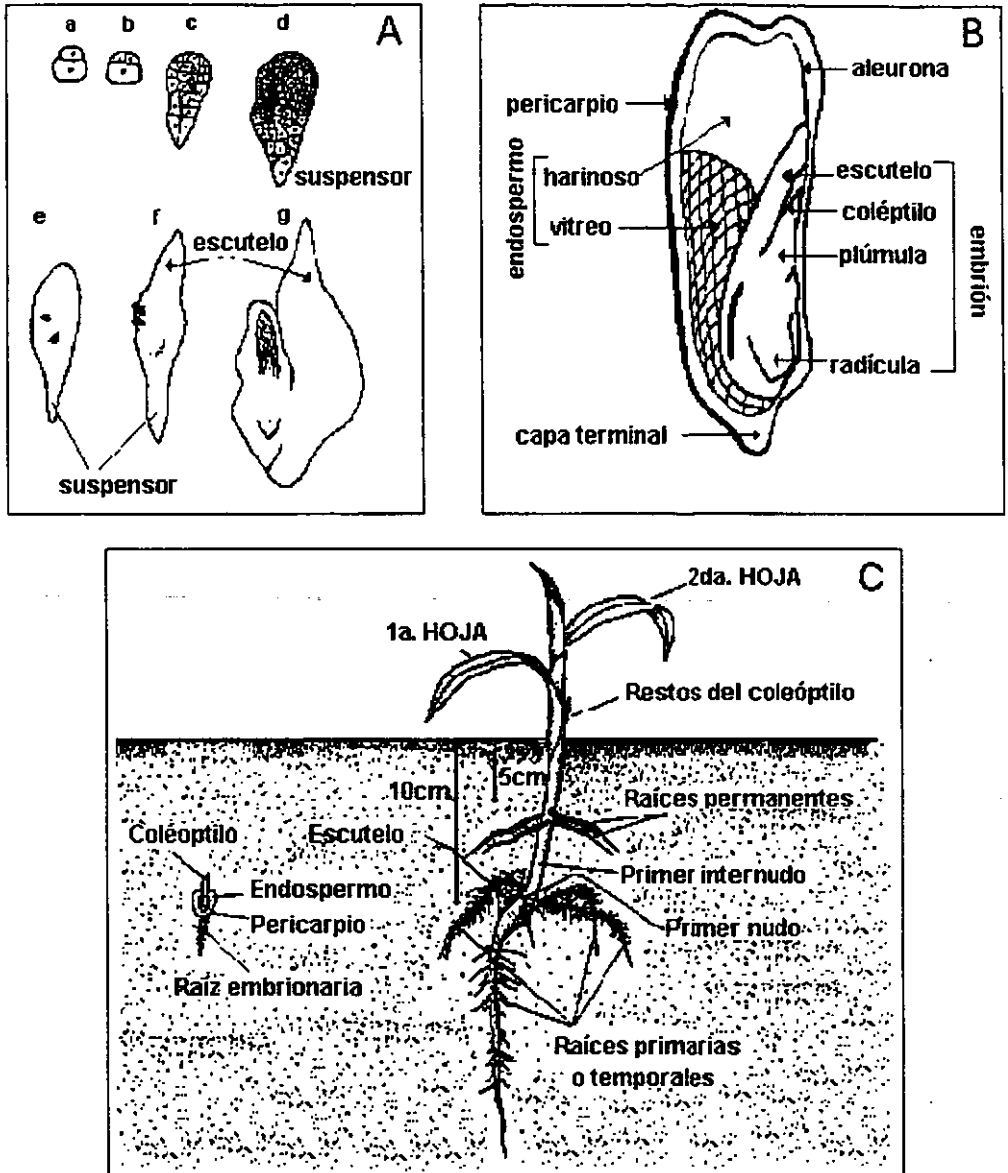


Figura 1. Desarrollo, maduración, estructura y germinación de una semilla de maíz. A, etapas de formación del embrión de maíz; a y b etapas proembrionarias; c y d etapas globulares; e iniciación de los ápices del tallo y de la raíz; f embrión con ápice lateral y escutelo aparente; g embrión maduro (Adaptado de Lindsay y Topping, 1993). B, estructura de una semilla de maíz madura, mostrando todos sus componentes. C, semilla de maíz en germinación. Las figuras B y C fueron tomadas de Reyes 1990.

El **eje embrionario** maduro consiste de una plúmula con 5 o 6 primordios de hoja encerrados en un tejido delgado llamado coleóptilo y de un primordio de la raíz primaria, así como uno o más primordios de la raíz secundaria rodeados por la coleoriza; el eje embrionario en esta etapa se encuentra encerrado por el escutelo y solamente salen de esta estructura las puntas del coleóptilo y la coleoriza en la parte alta y baja respectivamente (Figura 1B; Lindsey y Topping 1993; Sheridan y Clark 1994).

El embrión continúa su desarrollo y el endospermo se expande, mientras que los integumentos del óvulo se hacen duros y delgados y al final, cuando la semilla está madura, éste formará la cubierta de la semilla. Es en la última fase de la formación de la semilla donde ocurre la deshidratación masiva de las células del embrión y del endospermo. Seguido a este periodo comienza el de latencia, en donde la semilla permanece viable durante cierto tiempo y germinará cuando las condiciones ambientales sean propicias. El fenómeno de latencia puede presentarse por la aparición de sustancias que no permiten o inhiben la germinación o por las propias características anatómicas de la semilla (por ejemplo, una testa impermeable al agua), y/o por la aparición de algunos factores ambientales que no propicien la germinación.

1.2. Germinación.

Las semillas ortodoxas maduras presentan contenidos bajos de agua (5-15%) que limitan la expansión celular o el metabolismo activo. Cuando una semilla es colocada en condiciones adecuadas de humedad, oxígeno, temperatura y horas de exposición a la luz entre otras, el agua es absorbida por el embrión y este reanuda el crecimiento. Se ha definido que el comienzo de la germinación ocurre cuando la semilla se coloca en agua, en las condiciones óptimas ambientales ya mencionadas y concluye cuando la raíz primaria se elonga. El proceso de germinación es complejo, ya que es necesario reactivar todo el metabolismo para permitir al embrión desarrollarse hasta plántula (Figura 1C; Bewley y Black 1994).

La velocidad de entrada de agua a la semilla durante el proceso de la germinación presenta tres fases características (Bewley y Black 1994), a continuación se describen brevemente cada una de ellas.

Fase I.

Se inicia con la entrada de agua a la semilla (proceso de imbibición), la cual avanza a una alta velocidad debido a la hidratación de los componentes celulares de la semilla. Es probable que las células periféricas en contacto inicial con el agua puedan comenzar su actividad metabólica durante los primeros minutos, mientras que las células internas aún permanezcan en período de letargo o de poca actividad metabólica por más tiempo. Al tiempo que el agua entra a la semilla se ha detectado una salida de solutos de la misma, lo que hace suponer que las membranas celulares no están estructuradas adecuadamente. Se

han planteado modelos al respecto y el más aceptado propone que en las semillas secas las membranas no presentan la estructura líquida cristalina característica de las membranas de células hidratadas, sino un arreglo de gel. La disminución en el grado de hidratación y, por lo tanto en la distancia entre las cabezas polares adyacentes de los fosfolípidos, es lo que propicia el incremento en las interacciones de van der Waals entre las cadenas de ácidos grasos y la formación del arreglo de gel (Crowe *et al.* 1992).

Se ha planteado que la salida de solutos que ocurre al comenzar la hidratación de la semilla puede deberse a una transición de fases de los fosfolípidos de la membrana del estado de gel en la semilla seca, al estado líquido-cristalino en la semilla hidratada (Figura 2). Hay varias moléculas que se han postulado como responsables de la formación de la estructura de gel de la membrana, entre ellas están la sacarosa y los oligosacáridos de la serie de la rafinosa (estaquiosa y rafinosa principalmente) y algunas proteínas como las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía ó LEA (de las siglas en inglés "Late Embriogenesis Abundant") cuya síntesis se ha observado justamente antes de que la semilla esté seca y madura (Bewley 1986; Crowe y Crowe 1986; Crowe *et al.* 1992; Bewley y Black 1994; Bewley 1997). Hay evidencia que apoya que los disacáridos o polisacáridos pueden sustituir el agua que rodea las cabezas polares de los lípidos y que esta interacción ayuda a preservar el estado líquido-cristalino de la bicapa durante el período de desecación (Crowe *et al.* 1992; Bewley y Black 1994. Sin embargo, el mantenimiento del estado líquido-cristalino no es total, ya que aún se observa una salida transitoria de solutos durante la hidratación, por lo que la duración o intensidad de la salida de solutos dependerá de la extensión de la fase de gel.

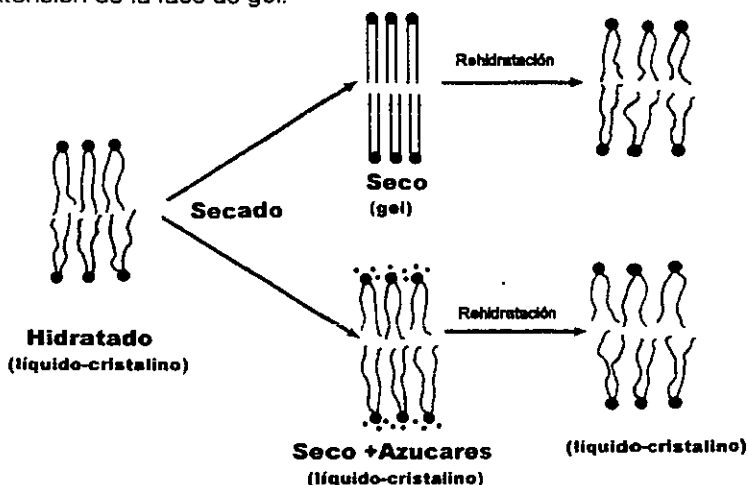


Figura 2. Esquema que ilustra las transiciones de fase de los fosfolípidos de la membrana al cambiar el estado de hidratación de sus componentes de líquido cristalino a gel, durante el periodo de secado de la semilla y después de la rehidratación recuperación de la fase líquido cristalina. Cuando las membranas contienen compuestos protectores como azúcares, se previene la formación de la fase de gel durante el periodo de secado (Tomado de Bewley y Black 1994).

Durante la toma inicial de agua se ha detectado una pequeña síntesis de DNA, que se atribuye a una actividad reparativa, ya que es posible que el DNA se encuentre dañado por el proceso de secado (que ocurrió durante la maduración y la latencia) y por la rehidratación de la semilla (Bewley 1997). En este período también se ha detectado la traducción de RNAm almacenados en la semilla, por ejemplo para las subunidades que conforman a la citocromo oxidasa y para la ATPasa mitocondrial; ambas enzimas presentan unas subunidades que son codificadas en el núcleo y otras en la mitocondria, lo que hace suponer que existe una regulación coordinada entre el núcleo y la mitocondria para la síntesis y el posterior ensamble de estas proteínas (Ehrenshaft y Brambl 1990). Con la entrada de agua a la semilla se activan la glucólisis, el ciclo de las pentosas, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, aunque estas dos últimas presentan actividades aún incipientes, debido probablemente a que tiene que ocurrir una reparación de la estructura membranal de la mitocondria y un aumento en la concentración de oxígeno y en la síntesis de los componentes respiratorios y de la ATPasa (Bewley 1997).

Fase II.

En esta fase la velocidad de toma de agua es constante, sin embargo hay un incremento en la actividad respiratoria, en la síntesis de proteínas (estructurales y catalíticas), en la síntesis de DNA y de nuevos compuestos necesarios para iniciar el crecimiento de las células del embrión y su posterior división. Para que la germinación se complete, la radícula debe expandirse y penetrar las estructuras que la envuelven; se conoce que la salida de la radícula sucede solamente por la elongación de sus células, pero no por un aumento en el número de ellas. La división celular puede ocurrir pocas horas después o inmediatamente después de la elongación dependiendo de la especie y aún de la variedad (Bewley y Black 1994).

Fase III.

La salida de la radícula de la cubierta de la semilla marca el inicio de esta fase. El incremento en la toma de agua de la semilla se debe a la formación de nuevas células en los tejidos que se están desarrollando.

Para mantener la actividad metabólica durante la germinación es necesario el aporte de nutrientes hacia el tejido embrionario. La semilla se ha preparado para ello almacenando polímeros de azúcares, aminoácidos y ácido fítico, que al iniciarse la germinación serán hidrolizados y posteriormente transportados al eje embrionario. La ATPasa de protones es la enzima que puede establecer las condiciones electroquímicas necesarias para facilitar el flujo de solutos mediado por proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática, por lo que es probable que la participación activa de la ATPasa de protones sea indispensable en el proceso de germinación.

1.3. La ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas.

La ATPasa de protones es una enzima que se localiza en la membrana plasmática, realiza la hidrólisis de ATP y simultáneamente bombea protones desde el citoplasma hacia el apoplasto, creando así un diferencia tanto de concentración de protones (ΔpH) como de carga eléctrica ($\Delta\psi$) a través de la membrana. Cada uno de estos componentes pueden mediar algunos procesos fisiológicos importantes para la célula como son: el transporte activo de solutos para la nutrición y mantenimiento de la turgencia celular; contribuir a la relajación de la pared celular y además al mantenimiento del pH intracelular (Serrano 1989, Briskin 1993; Figura 3).

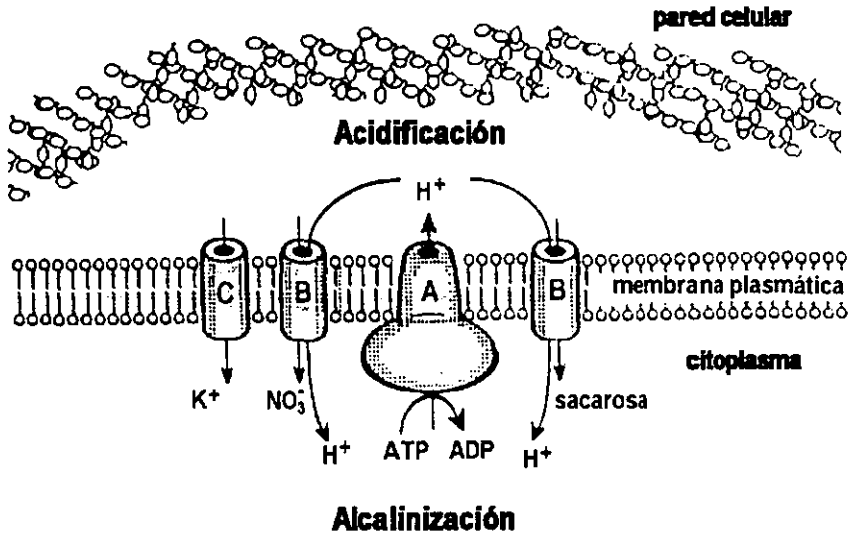


Figura 3. Papel de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas en la fisiología de la célula. (A) La enzima bombea protones a través de la membrana plasmática. La acidificación de la pared celular promueve el aflojamiento de la pared celular y el cambio de turgor, induciendo la expansión de la pared celular y con ello permitiendo el crecimiento celular. El gradiente electroquímico de protones creado puede ser usado en el transporte de nutrientes vía proteínas acarreadoras como simportadores con H^+ (B) y canales proteicos (C). Adaptado de Palmgren (1991).

1.3.1 Características bioquímicas

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática pesa alrededor de 100 Kda. Este polipéptido se ha encontrado fosforilado durante el ciclo catalítico de hidrólisis de ATP, fosforilación que es estable a pH ácido y sensible a hidroxilamina, evidenciando que la unión del fosfato con la enzima es del tipo acil-

fosfato (Briskin *et al.* 1992). Un residuo de Asp (Asp 329 en la secuencia de la isoforma AHA2 de *Arabidopsis thaliana*) que se encuentra en el sitio activo de la enzima, es el que se fosforila durante la catálisis (Briskin y Poole 1983; Serrano, 1990). Esta característica de formar un intermediario fosforilado durante el ciclo catalítico la ha colocado dentro de las ATPasas tipo P o también llamadas E_1 - E_2 , designadas así por presentar dos estados conformacionales durante la catálisis. Esto se demostró al medir por dicroísmo circular y por los cambios en la fluorescencia del triptofano las transiciones estructurales de la molécula durante el ciclo catalítico.

El mecanismo de reacción propuesto para el acoplamiento del transporte del protón con la actividad de hidrólisis de ATP se muestra en la Figura 4 (Briskin 1990), en donde el esquema se ha descrito a partir de la información disponible en otras ATPasas tipo E_1 - E_2 (como por ejemplo: la ATPasa de Na^+/K^+ de células animales, la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y la ATPasa de H^+ de hongos entre otras); sin embargo, aún falta definir cual es el mecanismo de unión y liberación del protón en los dos estados conformacionales de la enzima y los segmentos estructurales implicados.

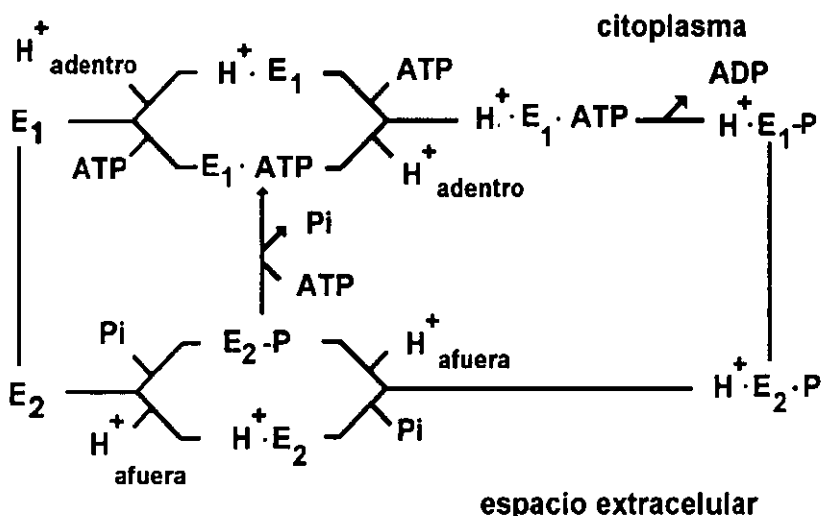


Figura 4. Esquema del mecanismo de reacción propuesto para la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas. Adaptado de Briskin (1990).

Se ha postulado que la conformación E_1 de la enzima une del lado citoplásmico al ATP y el protón (aquí se propone un mecanismo de unión al azar debido a que no se tiene evidencia para plantear la unión ordenada de cualquiera de los sustratos), una vez formado el complejo ternario (H^+E_1ATP) la enzima cataliza la hidrólisis de ATP, quedando fosforilado el residuo de Asp para producir

H^+E_1Pi y liberándose el ADP. Se demostró que la formación del intermediario fosforilado se acelera a pH ácido (5.5), por lo que se sugiere que la unión del H^+ a la enzima es un prerrequisito para la formación de la enzima fosforilada. Por otra parte, la conformación E_2 de la enzima presenta baja afinidad por el protón y pHs altos aceleran el recambio del intermediario fosforilado. Con base en estos hechos se ha sugerido que la transición de la enzima a la conformación $E_2 \cdot Pi$ es la que produce el cambio en la afinidad de la enzima por los protones ocasionando la liberación del protón; asimismo, se plantea que el fosfato es liberado, sin embargo, no se tiene evidencia del orden probable de la salida de ambas especies. En el último paso la forma E_2 regresa a E_1 para iniciar otro ciclo de transporte y catálisis (Briskin 1990).

En este mecanismo no se ha planteado la posibilidad del transporte de potasio asociado al del protón, como se ha sugerido desde los primeros estudios realizados con esta enzima, a semejanza de lo que ocurre con la ATPasa de Na^+/K^+ de células animales. Sin embargo, aún hay controversia al respecto (Briskin y Gawienowski 1996) y las evidencias que apuntan a favor del cotransporte de H^+/K^+ manejado por la enzima son: a) la existencia de una relación directa entre la activación de la enzima por K^+ con la velocidad de entrada de K^+ ($^{86}Rb^+$) en las raíces de varias especies; b) la correlación entre la magnitud de la estimulación por cationes y el nivel relativo de entrada de estos cationes a la célula ($K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$); c) la estimulación por K^+ tanto del bombeo de protones así como de la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima. Por otra parte, los datos que indican que el transporte de K^+ es manejado por un transportador independiente son: a) la pobre estimulación de la actividad de la enzima por K^+ (60% a 100%) comparada con la estimulación de más de 4 veces que presenta la ATPasa de Na^+/K^+ por K^+ y b) la ocurrencia del transporte de protones aún en ausencia de K^+ (Sze 1985; Serrano 1989; Briskin 1990).

Se sabe que la actividad de la enzima es dependiente de la desprotonación de un grupo con un pKa entre 5.6 a 5.7 y de la protonación de un grupo con un pKa aproximado de 7.1 y que el K^+ es capaz de estimular el influjo de H^+ a pHs bajos y a baja concentración de nutrientes, por lo que se sugiere que el K^+ activa a la enzima al desplazar el pKa del grupo ácido a 5.4 (Briskin 1990).

El sustrato real de la enzima es el complejo ATP con Mg^{2+} siendo altamente específica para estos dos, la K_m para ATPMg es de 0.2 a 1.5mM. Se ha demostrado que el Mg^{2+} se requiere durante la catálisis para la formación del intermediario fosforilado, más no para su hidrólisis (Briskin y Poole 1983; Briskin et al. 1992), además en *Neurospora crassa* se encontró que este ión es capaz de unirse a la enzima cuando menos a un sitio diferente al catalítico, ya que se ha detectado activación de la enzima a concentraciones bajas de Mg^{2+} libre (magnesio no unido a ATP), con una $K_{0.5}$ aparente de 15 μ M, mientras que a concentraciones altas de Mg^{2+} se presenta una inhibición ($K_i=3.5$ mM). Por ello, al hacer mediciones de la velocidad de la enzima es necesario tomar en cuenta las concentraciones de las especies libres en solución, ya que tanto ATP como Mg^{2+}

pueden actuar como inhibidores en cierto intervalo de concentración (Brooker y Slayman 1983).

Las ATPasas que presentan intermediario fosforilado son inhibidas por vanadato ($K_i = 10\mu\text{M}$), debido a que éste tiene una geometría estructural similar a la del estado de transición de la enzima (bipirámide trigonal). Existen otros inhibidores de la enzima como la eritrosina B, el dietilestilbestrol y la diciclohexilcarbodiimida que logran inhibir el 90% de la actividad de la enzima a concentraciones de $50\mu\text{M}$ el primero y de $100\mu\text{M}$ los dos últimos, sin embargo ninguno de ellos es absolutamente específico, ya que también logran inhibir parcialmente a fosfatasa y a otras ATPasas. Por lo anterior, el inhibidor de primera elección en el laboratorio es el VO_4^{3-} (Serrano 1990; Briskin *et al.* 1992).

Se ha medido la actividad de la enzima en su reacción de hidrólisis de ATP o en la de bombeo de protones, encontrándose una estequiometría de $1\text{ATP}:1\text{H}^+$ (Briskin y Hanson 1992).

1.3.2 Estructura de la enzima

Para dilucidar el mecanismo preciso por el que la enzima realiza su actividad catalítica, es necesario conocer con cierto detalle su estructura tridimensional. Para alcanzar este objetivo se han realizado numerosos trabajos de purificación y de clonación, pero aún no ha sido posible obtener cristales de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas.

1.3.2.1 Purificación

La enzima ha sido purificada de raíces de avena (Serrano 1984), raíces de tomate (Anthon y Spanwick 1986), raíces de frijol mungo (Kasamo 1986), raíces de maíz (Nagao *et al.* 1987; Grouzis *et al.* 1990; Hsu *et al.* 1991) y raíces de betabel y hojas de espinaca (Johansson *et al.* 1994). En los primeros cinco trabajos el procedimiento de purificación involucró: a) obtención de las membranas plasmáticas con un mínimo de contaminación, por lo general se utilizan centrifugaciones diferenciales seguidas de gradientes de densidad, después se solubilizan otras proteínas por un o una mezcla de detergentes (tritón X-100, octilglucósido o desoxicolato); b) solubilización de la enzima con lisofosfatidilcolina o Zwittergent 3-14 y c) resolución de la proteína solubilizada en un gradiente lineal de glicerol. El procedimiento requiere de por lo menos 18 horas y se obtiene una preparación con un alto grado de pureza.

Uno de los mayores inconvenientes del esquema anterior de purificación es el hecho de que la lisofosfatidilcolina tiene un efecto estimulador en la enzima, mientras que el zwittergent 3-14 inhibe su actividad (Palmgren *et al.* 1988; Palmgren *et al.* 1990). Por lo anterior Johansson *et al.* (1994) propusieron otro procedimiento de purificación en el que disminuyeron el número de pasos en los que se utilizaba detergente (y por ende también el tiempo) y recurrieron al uso del

dodecil- β -D maltósido para solubilizar a la enzima. Este detergente no tiene efecto alguno sobre la actividad de la enzima. Además, estos autores introdujeron un paso final de cromatografía de intercambio aniónico en un sistema rápido de cromatografía en fase líquida para proteínas (FPLC). La preparación obtenida con este procedimiento tiene la ventaja de poder usarse en estudios de regulación, debido a que la enzima aún presenta propiedades características de activación.

El enriquecimiento obtenido con los diferentes esquemas de purificación reportados varía desde 2.5 hasta 18 veces, aunque hay que tener precaución con estos datos debido a los posibles efectos de los detergentes utilizados para la solubilización de la enzima, ya que estos pueden inhibir o estimular la actividad.

1.3.2.2 Secuencia de aminoácidos de la proteína.

El primer trabajo para obtener la secuencia de aminoácidos de la ATPasa de la membrana plasmática de plantas, lo realizaron Schaller y Sussman en raíces de avena (1988a). Ellos purificaron a la ATPasa siguiendo el esquema tradicional ya mencionado con algunas modificaciones. Primero se llevó a cabo una centrifugación diferencial de los fragmentos de vesículas, para después pasar la fracción membranal por un gradiente de densidad de sacarosa, seguido de un lavado con detergentes y por último un fraccionamiento en una columna de exclusión molecular. La ATPasa obtenida de la columna se trató con tripsina, los fragmentos producidos fueron purificados por HPLC en fase reversa y por último cada uno de los fragmentos de la ATPasa fueron secuenciados.

A la fecha se conocen las secuencias de aminoácidos de las enzimas de *Arabidopsis thaliana* (Harper *et al.* 1989; Pardo y Serrano 1989; Harper *et al.* 1990; Harper *et al.* 1994), tabaco (Boutry *et al.* 1989; Pérez *et al.* 1992; Moriau *et al.* 1993; Michelet *et al.* 1994), tomate (Ewing *et al.* 1990; Ewing y Bennett 1994), papa (Harms *et al.* 1994), maíz (Jin y Bennetzen 1994; Frias *et al.* 1996) (Nakajima *et al.* 1995; Hentzen *et al.* 1996), arroz (Wada *et al.* 1992; Ookura *et al.* 1994) y frijol (Campos *et al.* 1996), las cuales fueron obtenidas por métodos de genética molecular. La búsqueda exhaustiva de los genes de la ATPasa en diferentes especies ha llevado a encontrar que existe una familia multigénica para las isoformas de la ATPasa, se han identificado diez genes que codifican para las ATPasas de *Arabidopsis thaliana* (AHA1-10); cuatro genes en tabaco (pma1-4); siete genes en tomate (LHA1-7); dos genes en papa (pha1y 2); dos genes en maíz (Mha1 y 2), dos genes en arroz (OSA1y 2), dos genes en haba (VHA1 y 2) y uno en el nódulo de frijol (BHA1).

Al obtenerse las secuencias de nucleótidos de cDNA y de clonas genómicas se dedujeron las correspondientes secuencias de aminoácidos de las ATPasas de la membrana plasmática. A partir de estas secuencias se ha predicho que la enzima contiene alrededor de 946 a 957 aminoácidos dependiendo de la isoforma. La identidad entre las diferentes secuencias de aminoácidos conocidas es alta: desde un 98.6% hasta un 77.4 %, las diferencias no se encuentran

localizadas en regiones preferenciales, sino que están distribuidas a lo largo de toda la secuencia, por lo que es difícil distinguir a las isoformas con las técnicas bioquímicas convencionales. El conocimiento de sus genes por otra parte, ha facilitado la detección de los RNAm de las diferentes isoformas en los diferentes tejidos de la planta o el análisis de su expresión usando genes reporteros (DeWitt *et al.* 1991; Houlné y Boutry 1994). Además de estos estudios, ya se logró sobreexpresar a los genes de las isoformas 1, 2 y 3 de *Arabidopsis thaliana* en levadura, tanto de la forma íntegra como de porciones eliminadas de la enzima y se han estudiado sus características bioquímicas en este sistema heterólogo (Palmgren y Christensen 1994; Regenberg *et al.* 1995; Roberts *et al.* 1995).

1.3.2.3 Estructura secundaria y terciaria.

A partir del análisis de hidropatía de la secuencia de aminoácidos de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se ha sugerido que ésta atraviesa de 8 a 12 veces la membrana. Los datos obtenidos de los cristales de 14Å de resolución de la ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, una ATPasa tipo P, indican que lo más probable es que sean 10 los cruces transmembranales de la enzima en la membrana (Stokes *et al.* 1994). Los dos segmentos terminales de la proteína (carboxilo y amino) se encuentran orientados hacia la cara citoplásmica de la célula (Figura 5). Las asas generadas por el cruce de la proteína en la membrana son mayores en el citosol y representan el 70% de la secuencia de aminoácidos, mientras que en la cara apoplástica tan sólo se encuentra el 5% de la proteína (Wach *et al.* 1992). En la región hidrofílica citoplásmica se localizan los dominios altamente conservados en las ATPasas tipo E₁-E₂, denominados de fosfatasa, cinasa, inhibitorio y de transducción (Figura 5), que han sido definidos por los datos de las secuencias de las ATPasas tipo P de diferentes organismos incluyendo las de plantas, así como por los experimentos de mutagénesis dirigida, proteólisis controlada, unión de reactivos análogos al ATP y la unión de anticuerpos contra epítomos específicos (Serrano 1989; Wach *et al.* 1992; Briskin 1990; Stokes *et al.* 1994). A continuación se describen cada uno de los dominios.

Dominio de fosfatasa. Este se localiza en el asa que se forma entre los segmentos transmembranales 2 y 3 y contiene la secuencia **TGES** que está altamente conservada en las ATPasas tipo P. Está formado por aproximadamente 124 aminoácidos dependiendo de la especie e isoforma. Se plantea que este dominio está involucrado en la hidrólisis del intermediario fosforilado (Serrano 1989; Serrano y Portillo 1990).

Dominio de cinasa. Se encuentra formado por aproximadamente 315 aminoácidos que son el enlace entre los segmentos transmembranales 4 y 5. En él se encuentran un segmento que contiene la secuencia **DKTGTLT** en donde se localiza al residuo de aspártico que es fosforilado durante el ciclo catalítico. Hay otros 4 segmentos conservados en este dominio y presentan secuencias características de enzimas que unen ATP (**KGAP**, **DPPR**, **TGDGVND** y **TGD**), por

lo que se piensa que este dominio está involucrado directamente con la unión de ATP y la formación de la fosfoenzima (Serrano 1989; Serrano y Portillo 1990).

Dominio inhibitorio

MHA1	AFTSKNTGAEERERRWAHAQRSLHGLE
MHA2	AFTRKKDLRKGEEAQWATAQRTLHGLQ
AHA1	AF'TTKKDYGIGEREQAQWAQRTLHGLQ
AHA2	AF'TMKKDYGKEEEREQAQWALAQRTLHGLQ
AHA3	AF'TTKQNYGIEEREQAQWAHAQRTLHGLQ
PMA1	AFTRKKDFGKEQRELQWAHAQRTLHGLQ
PMA2	AFTRKKDFGKEQRELQWAHAQRTLHGLQ
PMA3	AFTRKKDFGKEQRELQWAHAQRTLHGLQ
PMA4	AF'TTKKDYGKEEEREQAQWALAQRTLHGLQ
LHA1	AFTRKKDFGKELRELQWAHAQRTLHGLQ
OSA1	AFTRKKDFGKEERELKWAHAHTRLHGLQ
OSA2	AFTRKKDFGTQENQLKWATAQRTIHGLQ
BHA1	AF'TTKKDYGKEEEREQAQWAAAQRTLHGLQ

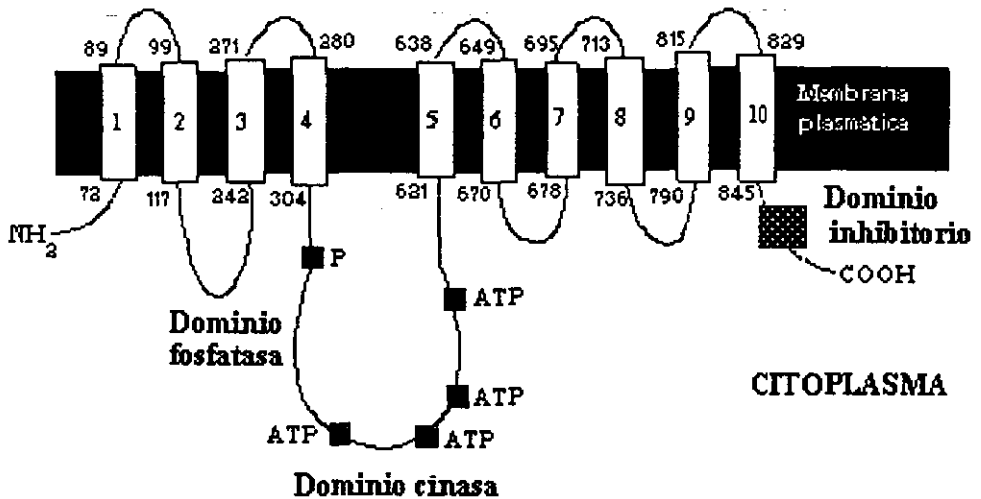


Figura 5. Representación de los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas y la secuencia del dominio inhibitorio. Se indican las 10 probables regiones transmembrales, los dominios funcionales, los sitios de unión a ATP y con una P el residuo de ácido aspártico que se fosforila durante el ciclo catalítico. Esquema adaptado de Kasamo y Sakibara 1995, Michelet y Boutry 1995, Gavilanes-Ruiz *et al.* 1995 y Morsomme *et al.* 1996.

Dominio inhibitorio. Palmgren *et al.* (1990a) realizaron experimentos de proteólisis controlada en la ATPasa de la membrana plasmática de raíces de avena e identificaron que la pérdida de una porción de aproximadamente 7Kda en el carboxilo terminal aumentaba la actividad de bombeo de protones de la enzima. Estudios posteriores utilizando anticuerpos específicos contra esta porción, lograron definir que la isoforma 2 de la ATPasa de Arabidopsis, presenta una secuencia de 28 aminoácidos (Figura 5) que es la que mantiene a la enzima con actividad y afinidad bajas por ATP (Palmgren *et al.* 1991). Se ha encontrado que este segmento está altamente conservado entre las diferentes isoformas identificadas (93 a 82 % de identidad; Figura 5). Se ha sugerido que este dominio inhibitorio interacciona de alguna manera con el sitio que se encarga de unir al protón, ya que la actividad de bombeo de protones es la que se ve más afectada por la supresión de esta porción; sin embargo, el carboxilo terminal podría también interactuar con el sitio de unión a ATP y con el de fosforilación. En la ATPasa de H⁺ de levadura se han realizado experimentos de mutagénesis dirigida y se ha encontrado que la modificación de ciertos residuos en la porción del carboxilo (Arg 909 y Thr 912, residuos que definen un sitio potencialmente fosforilable) y en el sitio de unión de ATP (Ala 547) disminuyen el efecto activador de glucosa en la enzima, presumiblemente por afectar la interacción de los dos dominios (Portillo *et al.* 1989; Portillo *et al.* 1991; Serrano *et al.* 1992; Eraso y Portillo 1994).

Dominio de transducción. El mecanismo de acoplamiento de la hidrólisis del ATP con el transporte de protones se desconoce, se ha sugerido que el protón podría transportarse entre los 4 primeros segmentos transmembranales de la proteína, mismos que están cercanos al sitio de hidrólisis del intermediario fosforilado, asumiendo que se requieren al menos 4 segmentos transmembranales para producir un canal catiónico según experimentos de reconstitución de proteínas en bicapas lipídicas artificiales. Sin embargo, el transporte del protón a través de la proteína podría llevarse a cabo por dos mecanismos diferentes, en uno de ellos se propone que sólo algunos aminoácidos podrían participar en este transporte (serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, lisina, glutámico, glutamina, arginina, tirosina e histidina), formando una región común de relevo de H⁺, ya que estos se encuentran distribuidos en los diferentes segmentos transmembranales (Briskin y Hanson 1992). El otro modelo plantea la unión del protón a un sitio pequeño de la proteína, su posterior internalización al ocurrir el cambio conformacional, la disminución de la constante de afinidad de la proteína por el H⁺ y por último su liberación en la cara opuesta al sitio inicial de unión. Con el conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima se podrá asegurar cual es el mecanismo por el cual se transporta el ión y los residuos de aminoácidos involucrados (Briskin y Hanson 1992).

1.3.3 Regulación

En las plantas, la ATPasa es el mayor consumidor de ATP en la célula; por lo que su actividad debe ser cuidadosamente regulada. Hay al menos cinco

posibles mecanismos para que esto ocurra. a) regulación genética (expresión diferencial de isoformas); b) modificación covalente de la proteína (fosforilación-defosforilación y proteólisis); c) interacción con moléculas como hormonas o toxinas; d) alteración del ambiente lípidico que rodea a la enzima y e) oligomerización de la enzima. En seguida se describe cada uno de ellos.

1.3.3.1 Expresión diferencial de isoformas

Se ha encontrado a la ATPasa de la membrana plasmática en todos los órganos de plantas examinados, proponiéndose como una enzima de mantenimiento ó doméstica ó "housekeeping" (Michelet y Boutry 1995; Pérez *et al.* 1992). Sin embargo, hay isoformas de la enzima que se presentan preferencialmente en ciertos órganos y en etapas definidas del desarrollo de la planta. A pesar de la gran homología de las isoformas tanto a nivel de secuencia de aminoácidos como de DNA, se ha observado que los extremos tanto en 5' como en 3' que delimitan al gen, presentan secuencias diferentes tanto en contenido de bases como en extensión (133-266 nucleótidos) y es probable que estén relacionados con la expresión espacial y temporal de la enzima en la planta, debido a que no es común encontrar secuencias líder mayores a 60 nucleótidos en los genes de las plantas (Michelet *et al.* 1994). En los genes de algunas isoformas estos extremos contienen tramos de secuencias que podrían ser útiles en la iniciación o reiniciación de la transcripción del gen; por ejemplo, en la isoforma pma1 se encontró que la presencia de la porción íntegra de la secuencia 3' líder aumenta hasta en 5 veces la expresión del gen (Michelet *et al.* 1994). Además, se han encontrado sitios consenso relacionados con la disminución de la transcripción del gene, como por ejemplo, el elemento DST (GGAXACAGATXTTXGTA), está presente en la isoforma 2 de maíz y es un elemento que se ha detectado en genes que son inducidos por auxinas (Frias *et al.* 1996). Aunado a esto, se ha identificado un número diferente de intrones en las isoformas, por ejemplo, hay 15 intrones en AHA1 y AHA2 mientras que en pma1 hay 20 (Pardo y Serrano 1989; Harper *et al.* 1990; Michelet *et al.* 1994; Kasamo y Sakibara 1995). Todo ello puede contribuir a la expresión preferente de cada enzima en diferentes tejidos, sin embargo aún se desconocen las ventajas que las células obtienen al presentar una u otra forma de enzima, ya que no hay un estudio de las propiedades catalíticas de estas isoformas. A continuación se relatan los detalles de la expresión de los diferentes genes para la enzima, en los órganos en que se ha estudiado principalmente.

En *Arabidopsis thaliana* se han logrado obtener mediante la técnica de PCR hasta 10 diferentes genes que codifican para las diferentes isoformas de la enzima (Harper *et al.* 1994). Los genes para las isoformas AHA1 y 2 se expresan en mayor proporción en raíces que en tallos, mientras que la expresión de AHA3 es similar en ambos tejidos (Harper *et al.* 1990). Para detectar la expresión de una isoforma de *Arabidopsis* en un tejido específico, se realizó la construcción entre el gen que codifica para AHA3 más la porción del gene que codifica para la proteína Myc c, por lo que con anticuerpos dirigidos contra Myc c se logró detectar la

expresión preferencial de AHA3 en el polen, el óvulo y en el floema; en este último tejido solo cuando ya se encuentra diferenciado y maduro (DeWitt *et al.* 1991). Por otra parte AHA9 se expresa en las anteras y en las flores de la planta (Houlné y Boutry, 1994), mientras que AHA10 es muy abundante en las vainas, aunque también se ha detectado en raíces, hojas, tallo y flores (Harper *et al.* 1994).

En tomate se han secuenciado los genes de 7 diferentes isoformas para la ATPasa y se sabe que el RNA mensajero para el gene de LHA1 aparece en todos los órganos, mientras que LHA2 tiene una expresión aumentada en hipocótilos y hojas, en tanto que LHA4 se expresa preferencialmente en raíces e hipocótilos; los genes de otras isoformas descritas LHA3, 5, 6 y 7 tienen niveles muy bajos de expresión en todos los órganos examinados (Ewing *et al.* 1990; Ewing y Bennet 1994).

Los RNAm de los genes que codifican las isoformas de la ATPasa de la membrana plasmática de tabaco se han encontrado en raíz, hoja y tallo, siendo pma4 la que tiene el mayor nivel de RNAm en todos los tejidos examinados (Houlné y Boutry 1994). Se observó que la construcción pma1-GUS se expresa preferencialmente en la epidermis de la raíz, en la corteza del tallo y en las células guarda de los estomas que son sitios en donde el transporte de solutos debe ser activo (Michelet *et al.* 1994). El RNAm de pma1 también se expresa en las células del tapetum, el polen, el tejido de transmisión y el óvulo, todos ellos tejidos que están en continuo crecimiento o a punto de desencadenar una serie de procesos de división y crecimiento celular activos (Michelet *et al.* 1994).

En papa se encontraron dos genes de isoformas que presentan una expresión similar en hojas y tallos pero en menor cantidad en raíces y tubérculos. Además se examinó la expresión de estos genes al someter a las plantas a diferentes tratamientos como frío, anaerobiosis y a dosis moderadas de citocina, obteniéndose que ninguno de estos factores altera la expresión (Harms *et al.* 1994).

Se reportaron los cDNA de dos isoformas de la enzima de arroz (*Oriza sativa*) que se expresan en raíz, callos y tallos; siendo OSA1 la que tiene el mayor nivel de expresión en estos tejidos (Wada *et al.* 1992; Ookura *et al.* 1994).

En haba (*Vicia faba*) se tienen secuenciados los genes de dos isoformas de la ATPasa de la membrana plasmática, designados VHA1 y VHA2 y de los cuales se sabe que se expresan en raíces, tallos y hojas. En la hoja se encontró que se expresan solamente en las células guarda y en las del mesófilo, no así en las células de la epidermis y en el tejido vascular (Hentzen *et al.* 1996).

Recientemente se obtuvo la secuencia del gene de la ATPasa de la membrana plasmática de maíz (Jin y Bennetzen 1994; Frias *et al.* 1996) y se hicieron sondas específicas para localizar a los RNAm de esta isoforma en los

diferentes tejidos, encontrándose que MHA2 preferencialmente se expresa en las células guarda, el floema y las células de la epidermis. En los embriones de maíz se encontró que el RNAm de MHA2 se encuentra enriquecido en la epidermis del escutelo en la cara que da hacia el endospermo, la localización de la enzima en ésta pone en evidencia el papel importante de la enzima en la nutrición celular. Además, se encontró que las auxinas son capaces de aumentar el nivel de los RNAm en regiones no vasculares de los coleóptilos del maíz (Frias *et al.* 1996), lo que estaría de acuerdo con los postulados de la teoría del crecimiento ácido, asumiendo que el incremento en la expresión de esta ATPasa en la membrana puede disminuir el pH apoplástico y entonces activar el proceso de aflojamiento de la pared celular para su crecimiento (Hager *et al.* 1991; Rayle y Cleland 1992).

El único trabajo en el que se describen las diferentes características bioquímicas de varias isoformas es el de Palmgren y Christensen (1994), quienes sobreexpusieron a las isoformas AHA1, AHA2 y AHA3 en levadura por una técnica ya descrita (Villalba *et al.* 1992). Al comparar las diferentes propiedades bioquímicas de las isoformas se observó que presentan diferencias significativas en varias de ellas, por ejemplo AHA1 y 2 exhiben una Km 10 veces mayor a la de AHA3, mientras que la sensibilidad a vanadato es 3 veces mayor para AHA3 que para las otras dos isoformas y AHA2 es la isoforma que se expresa más abundantemente en la membrana del retículo endoplásmico de la levadura, comparada con la expresión de AHA1 y AHA3 en esas mismas membranas. Estos datos sugieren que la presencia de diferentes isoformas en sitios específicos de la planta en momentos determinados del desarrollo podría ser una respuesta adaptativa de la planta hacia los diferentes estímulos del medio ambiente.

1.3.3.2 Modificación covalente

Con la identificación de un dominio inhibitorio de la enzima se han encontrado varios mecanismos por los cuales la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas podría modificar su actividad enzimática. Por ejemplo, la modificación covalente en esta porción se lleva a cabo por proteólisis o por fosforilación. A continuación se describe brevemente su participación en la modulación de la actividad de la enzima.

1.3.3.2.1 Proteólisis

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática experimenta una pérdida de una porción de 7 a 10 Kda de peso molecular en la región del extremo carboxilo terminal, por acción de la tripsina, originándose un aumento en Vmax y una disminución en la Km de la ATPasa. Sin embargo, se desconoce si de manera natural existe una proteólisis específica (Palmgren *et al.* 1991). En eritrocitos humanos se ha encontrado que la ATPasa de calcio es capaz de activarse en presencia de calpaína I (proteasa presente en los eritrocitos), por lo que una regulación fisiológica debida a la supresión de esta porción en la enzima es posible (Palmgren 1991).

I.3.3.2 Fosforilación

Schaller y Sussman (1988b) encontraron que la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas es sustrato de una proteína cinasa, identificándose residuos de serina y treonina fosforilados. Por otra parte, se demostró que la siringomicina (una toxina producida por *Pseudomonas syringae*) estimula la actividad de la enzima, siendo probable que el mecanismo de acción de la fitotoxina sea a través de la fosforilación (Bidway *et al.* 1987; Bidway *et al.* 1988). James *et al.* (1989) lograron determinar que una cinasa dependiente de calmodulina era capaz de fosforilar la porción del carboxilo terminal de la ATPasa de Ca^{2+} de los eritrocitos humanos, lo que apunta a que un mecanismo similar puede ocurrir en la ATPasa de H^+ de plantas. En las ATPasas de H^+ de plantas se ha encontrado que hay una región en el carboxilo terminal que contiene una secuencia conservada entre las diferentes isoformas examinadas y que define un sitio potencialmente fosforilable (QRTLH), el cual podría estar implicado en la regulación de la enzima por cinasas de proteínas y que más adelante se describirá (Serrano *et al.* 1992; Wach 1992; Kasamo y Sakibara 1995). En el alga *Dunaliella acidophila* se demostró que la ATPasa es activada por la proteólisis del carboxilo terminal, además se encontró que este segmento puede fosforilarse (Sekler *et al.* 1994).

Se han identificado hasta el momento cinasas de proteínas fuertemente unidas a la membrana, algunas de ellas capaces de aumentar su actividad hasta 100 veces en respuesta a calcio, además de presentar un dominio similar a calmodulina por lo que se les ha denominado CDPKs (por sus siglas en inglés "calmodulin-like domain protein kinases"; Harmon *et al.* 1996). En membranas plasmáticas obtenidas de raíces de betabel se caracterizaron y se lograron purificar dos cinasas de proteínas, una que utilizaba eficientemente como sustrato a la histona y otra a la caseína, además de presentar diferente sensibilidad a calcio. La primera alcanza la mitad de su actividad máxima a $7\mu\text{M}$ de Ca^{2+} , mientras que la segunda es insensible a este catión (Baizabal-Aguirre y González de la Vara 1994 y 1997).

Pero para definir cual es el papel de estas cinasas membranales se deben examinar los posibles sustratos nativos. Las únicas proteínas membranales que se han identificado que son blanco de la actividad de cinasas de proteínas de localización membranal son la nodulina 26 (nod 26), la proteína intrínseca del tonoplasto (TIP, por sus siglas en inglés "tonoplast intrinsic protein") y la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Se ha postulado que Nod26 es una proteína capaz de transportar cationes y aniones y que al encontrarse fosforilada (serina 262) cambia su sensibilidad al voltaje. TIP es un canal específico para agua y al igual que Nod26 es fosforilada por una cinasa aún desconocida pero que es dependiente calcio (Harmon *et al.* 1996).

1.3.3.3 Interacción con sustancias patogénicas o fitoreguladores

La actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas se puede modificar por diferentes factores químicos, entre ellos se encuentran ciertas sustancias secretadas por microorganismos y los fitoreguladores.

1.3.3.3.1 Compuestos patogénicos secretados por microorganismos

Algunos microorganismos secretan ciertas sustancias para aumentar sus posibilidades de vida en su hábitat natural, muchas de éstas se han estudiado y ahora se conocen algunos de los efectos que producen en la membrana y en las proteínas que se encuentran en ella. Dada la importancia de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en la homeostasis de la célula, se han realizado estudios sobre el efecto de estos compuestos en la actividad de la enzima. La naturaleza de los compuestos patogénicos estudiados es variable tanto en reactividad química como en estructura, por lo que los efectos sobre la enzima pueden explicarse de varias maneras: a) una unión directa del compuesto a la enzima, b) la unión del compuesto a un receptor específico localizado en la membrana o en el citoplasma, que podría directamente interactuar con la enzima o bien a través de un mecanismo de transducción de señales y c) a través de la interacción con los ácidos grasos de la membrana que pueden cambiar la conformación de la enzima. A continuación se describen brevemente los efectos y el probable mecanismo de acción de algunos compuestos de los que se tienen mayores evidencias sobre su mecanismo de acción sobre la ATPasa de H^+ .

Inductores. Al iniciarse la interacción entre una planta y un patógeno se desencadenan una serie de señales que se inducen como respuesta tanto en el microorganismo (para iniciar la invasión), como en el huésped (para su defensa). En este proceso están involucradas moléculas asociadas al patógeno y que son llamadas **inductores**, además de algunos probables receptores en las plantas. El reconocimiento de estas estructuras va seguido de una cascada de transducción de señales, que resulta en la activación de genes de defensa y en la expresión de la resistencia de la enfermedad en el huésped. Los inductores del hongo patógeno *Cladosporium fluvum* al infectar ciertas líneas de tomate, producen una serie de señales que involucran a fosfatasas que defosforilan a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, lo que resulta en un incremento significativo en la actividad de la enzima y en la subsecuente acidificación extracelular, lo cual se propone que contribuye a los signos de infección en la planta. Los resultados son consistentes con un modelo en el que los receptores en la membrana plasmática de las plantas, unen al inductor del hongo e inducen la activación de las proteínas G; ésta a su vez activaría a las fosfatasas unidas a la membrana, resultando la defosforilación de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de la planta hospedera (Vera-Estrella *et al.* 1994).

Subsecuente a la desfosforilación de la enzima por el tratamiento con el inductor, se lleva a cabo una refosforilación de la enzima por dos cinasas diferentes. A tiempos cortos actúa una cinasa dependiente de calcio semejante a una cinasa C, mientras que a tiempos largos se activa una cinasa de proteínas semejante a la cinasa de proteína dependiente de calcio/ calmodulina tipo KII. Por el momento no se sabe porque se presentan estas dos actividades de cinasa y como es que esto influye en la cascada de transducción de señales durante el ataque del patógeno (Xing *et al.* 1996).

Péptidos inductores de necrosis (NIP por sus siglas en inglés "necrosis inducing peptide). Entre los efectos que produce la inoculación del hongo *Rhynchosporium secalis* en avena se encuentran: incremento en la transpiración, posiblemente por efecto del aumento en la apertura estomatal, acumulación intensa de solutos en las raíces y un cambio en la permeabilidad de las células epidérmicas. Estos cambios se han atribuido a unas proteínas secretadas por el hongo que tienen bajo peso molecular (<10Kda), los cuales aparecen a concentraciones significativas durante la patogenia. El hecho de que aumenten la apertura estomatal, ha llevado a buscar un mecanismo similar al descrito por fusicocina de estos péptidos sobre la ATPasa de la membrana plasmática. NIP1 y NIP3 aumentan la actividad de la enzima, mientras que NIP2 no, además se encontró una proteína de 65Kda que presumiblemente une a NIP3, aunque aún es necesario contar con mayores evidencias para poder dilucidar el mecanismo de acción de estos péptidos sobre la actividad de la enzima (Welvesiep *et al.* 1992).

Beticolina 1. *Cercospora beticola* es un hongo que produce la toxina denominada beticolina 1, la cual reduce la elongación de las raíces de maíz, así como también inhibe el bombeo de protones y despolariza el potencial de membrana (Blein *et al.* 1988). Se encontró que la toxina inhibe a la ATPasa de H⁺ a través de la inhibición de la formación del intermediario fosforilado de una manera competitiva (Simon-Plas *et al.* 1996), pero es probable que el efecto se produzca por la unión de esta molécula a un sitio localizado en la membrana cercano a las hélices transmembranales de la enzima y no a una unión directa del compuesto en el sitio activo de la enzima (Gomés *et al.* 1996).

Fusicocina. Es una toxina producida por el hongo *Fusicoccum amygdali* y la cual ha sido ampliamente utilizada en la caracterización de la enzima debido a que estimula la actividad de bombeo de protones en todos los tejidos de las plantas superiores probados hasta el momento. La fusicocina incrementa la velocidad de germinación de semillas, el crecimiento por elongación celular, el paso de nutrientes y además se ha observado que aumenta la apertura estomatal (Marré 1979). Tanto el bombeo de protones como la actividad de hidrólisis de ATP se ve afectada por la adición de fusicocina.

De Michelis *et al.* (1989) encontraron en las membranas un receptor específico para fusicocina, que presenta una constante de disociación de

aproximadamente 1.6 nM. Se ha observado que la cinética de unión de fusicocina a su receptor es similar a la cinética de estimulación de la ATPasa por la adición de la toxina, lo cual llevó a suponer que la activación de la enzima por la toxina era a través de un mecanismo indirecto. Adicionalmente, se demostró que el tratamiento previo de la enzima con proteasa (para eliminar el carboxilo terminal) producía una enzima insensible a fusicocina, lo que involucró al carboxilo terminal de la ATPasa en el mecanismo de acción de la fusicocina (Johansson *et al.* 1993; Lanfermeijer y Prins 1994).

Recientemente se secuenció el gene del receptor para la fusicocina y se encontró que presenta una alta identidad con los miembros de la familia de proteínas 14-3-3, siendo algunos de sus miembros inhibidores de cinasas C de proteínas, otros se unen a las proteínas que reconocen las cajas G del DNA, otras ayudan a la interacción proteína-proteína, entre otras muy diversas actividades (Kauss *et al.* 1992; Korthout y DeBoer 1994; Marra *et al.* 1994). La 14-3-3 es una proteína hidrofílica de 30Kda de peso molecular, puede presentarse formando dímeros y tetrameros y se sabe que pueden unirse a proteínas que contienen la secuencia R-X-X-fosfo-S-X-X-P o bien a residuos de serina fosforilados (De Boer 1997).

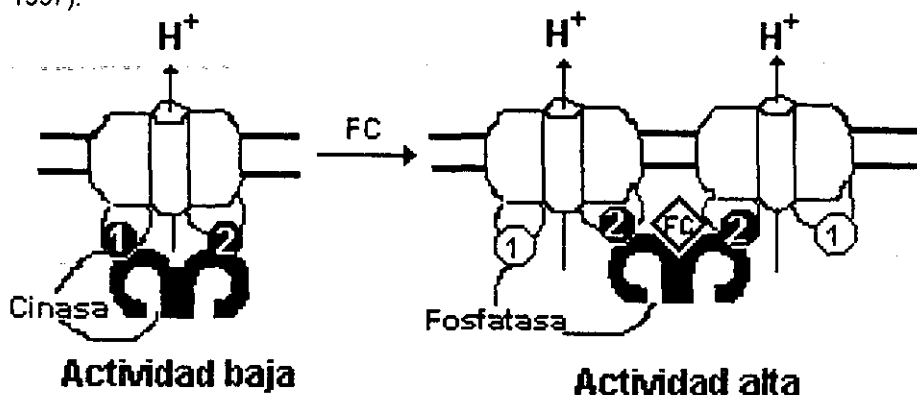


Figura 6. Modelo del mecanismo de la activación de la ATPasa de H⁺, en el que se involucra a la proteína 14-3-3 y a la fusicocina (FC). En el estado estacionario, la proteína 14-3-3 se une y estabiliza a la ATPasa de H⁺ fosforilada [los círculos llenos indican los posibles sitios fosforilados, que corresponden a los probables dominios de unión 1 (RGAS⁶¹⁷DI) y 2 (RELS⁹⁰³) de la proteína 14-3-3; los círculos vacíos indican los dominios defosforilados. Bajo estas condiciones la actividad de la ATPasa disminuye. Mientras que la activación de la enzima se lleva a cabo a través de la activación *in vivo* por una fosfatasa (como por ejemplo en la infección del patógeno *Cladosporium spp*) o por la unión de la fusicocina a la proteína 14-3-3 (la cual podría llevar a la dimerización de la enzima). Tomado de DeBoer (1997).

En la ATPasa de H^+ se encuentran tres secuencias que podrían ser fosforiladas en serina y que en AHA3 corresponden a RVKPS⁶⁹⁹PTP, RGAS⁶¹⁷DI y a RELS⁹⁰³, sin embargo, sólo la primera de ellas presenta una similitud muy alta con la secuencia que reconocen las proteínas 14-3-3, la cual se encuentra en una de las asas con una supuesta de localización extracelular; la segunda de las secuencias se localiza en una asa intracelular y la tercera está presente en la porción del carboxilo terminal (Figura 6; De Boer 1997). Jahn *et al.* (1997) sugirieron que el sitio de unión de la 14-3-3 era en el carboxilo terminal, ya que su remoción provocaba la solubilización de la 14-3-3. Fullone *et al.* (1998) confirmaron mediante ensayos de interacción proteína-proteína que el sitio de unión de la 14-3-3 con la enzima es en el carboxilo terminal. Además proponen que la interacción de fusicocina con la 14-3-3 modifica la interacción entre la 14-3-3 y la ATPasa. Algunos reportes sugieren que la proteína 14-3-3 es un ligando natural de la ATPasa de protones y que la presencia de fusicocina estabiliza de alguna manera esta interacción, llevando a la ATPasa de un estado basal de baja actividad a uno de mayor actividad (Figura 6).

1.3.3.2 Fitoreguladores

La comunicación intracelular en las plantas superiores está mediada por mensajeros químicos llamados fitoreguladores. Existen diferentes sustancias reguladoras de las plantas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido jasmónico, brassinoesteroides y ácido abscísico (Galli *et al.* 1975; Cocucci y Cocucci 1977; Serrano 1990). La mayoría de éstas hormonas tienen un efecto en la actividad de la enzima, pero las que han sido mayormente estudiadas son las auxinas, por lo que en esta sección se describirá brevemente su acción en la fisiología de las plantas y lo que se propone como su mecanismo de acción para modificar la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

Auxinas. La principal auxina que se encuentra en las plantas es el ácido indol 3-acético (IAA; Indol Acetic Acid), aunque también se encuentran otras en menor cantidad. La auxina causa una amplia gama de efectos en el crecimiento y morfogénesis de la planta: promueve el crecimiento por elongación de tallos jóvenes y coleóptilos, aunque inhibe la elongación de las raíces; promueve la división celular en tallos, pero inhibe la formación de yemas laterales, además el desarrollo del fruto depende de la presencia de auxina. Cuando se coloca auxina en tallos jóvenes o coleóptilos se observa que se promueve la elongación de éstos cerca de 10 a 20 minutos después de la exposición a la hormona, a concentraciones de 10^{-5} a 10^{-6} M.

La expansión de las células es un fenómeno irreversible y que requiere de absorción de agua, lo cual incrementa el volumen celular, necesitándose entonces mayor área para acomodar este volumen adicional, que es generado por la también irreversible expansión celular. El mecanismo por el que la auxina induce la elongación no ha sido dilucidado, debido a que la auxina tiene múltiples

efectos sobre las células de las plantas. Se sabe que IAA causa un rápido incremento en la extensibilidad de la pared celular en coleóptilos y tallos jóvenes, pero esto no ocurre por la unión directa de la auxina a la pared, sino tal vez por su interacción sobre algún factor sobre la membrana plasmática o dentro de la célula.

Rayle y Cleland (1970) propusieron su **teoría del crecimiento ácido**, la cual postula que la auxina causa (en las células que responden a auxina) la salida activa de protones de la célula hacia la región de la pared celular. Este decremento en el pH activa enzimas que se encargan de romper las uniones entre los diferentes componentes de la pared, incrementando así su extensibilidad. Se han emprendido numerosos estudios en relación con el papel de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas en esta teoría (Gabathuler y Cleland 1985; Goldsmith 1993; Lado *et al.* 1977 y bibliografía relacionada). Así, se ha descrito que la enzima es activada por auxina de manera semejante a la activación que ocurre por fusicocina, sin embargo el mecanismo parece no ser el mismo. Se conoce que la auxina se une a un receptor específico y que es probable que a través de él se desencadene la señal que modifique la actividad de la enzima (Goldsmith 1993; Löber y Klämbt 1985). Se ha sugerido que en la cadena de transducción de señales puede estar involucrada una cinasa de proteínas dependientes de calcio, debido a que la auxina es capaz de modificar la concentración de Ca²⁺ intracelular. Experimentos de Hager *et al.* (1993) indicaron que la auxina induce un aumento en la transcripción del gene y la traducción del mensaje de la ATPasa, además de acelerar el proceso de exocitosis de vesículas de membrana que contienen a la enzima desde el Aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, lo que da como resultado un aumento en la actividad de la enzima en el tejido por respuesta a auxina. Datos que apoyan estos resultados fueron obtenidos por Frías *et al.* (1996), quienes detectaron el aumento del RNAm de la isoforma 2 de maíz (MHA2) por la acción de auxina. Mientras que Jahn *et al.* (1996) no observaron un aumento en la cantidad de ATPasa en las membranas plasmáticas de coleóptilos de maíz después de la exposición de auxina o fusicocina, por lo que los autores concluyeron que el aumento en actividad, debe llevarse a cabo por otro mecanismo que no es el de la inserción masiva de enzima en la membrana, sosteniendo además, que no se puede descartar que el mecanismo de acción de auxina sea diferente al que se propone para fusicocina. Sin embargo, debido a la reciente evidencia de que el receptor de fusicocina es hidrofílico, habría que revisar cuidadosamente el mecanismo de señalización que se desencadena para que la ATPasa de protones sea activada por auxina, ya que existen proteínas que son capaces de unir auxinas tanto en la membrana plasmática (receptores), en el núcleo, en el retículo endoplásmico y aún en el citoplasma, por lo que el esquema se complica aún más (Jones 1994).

1.3.3.4 Modificación del ambiente membranal

La ATPasa existe *in situ* en un ambiente lipídico que se compone principalmente de fosfolípidos y esteroides, es por ello que se ha estudiado el efecto de éstos en la actividad de la enzima.

La solubilización de la enzima y su posterior reconstitución en liposomas se ha llevado a cabo para estudiar varios aspectos de la función de la proteína en la membrana y de la interacción proteína-membrana, observándose que al solubilizar a la enzima la actividad disminuye y después de la adición de mezclas de fosfolípidos la actividad se restaura y aún se activa. La cantidad y el tipo de fosfolípido que se necesita para que la ATPasa se active depende de cuál o cuales son los detergentes que se utilizaron en la solubilización o purificación, lo cual probablemente sea un reflejo de la necesidad de tener la composición de la membrana original. Dentro de los fosfolípidos que activan la hidrólisis de ATP de la enzima obtenida de raíces de avena, se encuentran la lisofosfatidilcolina (LPC), la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol (Serrano *et al.* 1988), mientras que Brauer y Tu (1989) encontraron que la enzima obtenida de raíces de maíz y solubilizada de la membrana con desoxicolato, sólo se activaba con fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

Palmgren *et al.* (1988) encontraron que la actividad de la enzima aumentaba por la adición de lisofosfatidilcolina, sin embargo también producían este efecto los ácidos grasos libres y el tratamiento con fosfolipasa A₂. Se sugirió que parte del efecto de la lisofosfatidilcolina sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ era debido a la ruptura de la latencia por la acción detergente de la LPC, esto es que el sitio catalítico de la enzima estuviera orientado hacia el interior de las vesículas de membrana plasmática, por lo que al adicionar la lisofosfatidilcolina el ATP podía acceder al sitio catalítico. Esta explicación resultó cierta, pero también otra de las posibilidades era que realmente la lisofosfatidilcolina ejerciera un efecto activador sobre la enzima. Examinando con más detalle el efecto de este compuesto, se ha observado que efectivamente, la lisofosfatidilcolina disminuye la Km (de 270-350 a 80-90 µM) y aumenta la Vmax de la enzima a través de un mecanismo que involucra el movimiento conformacional del carboxilo terminal y que es similar al que se produce al tratar a la enzima con proteasas (Palmgren y Sommarin 1989; Palmgren *et al.* 1991; Olsson *et al.* 1995). Se desconoce como es que la interacción del dominio inhibitorio con el dominio catalítico de la enzima puede modificarse al adicionar la lisofosfatidilcolina, sin embargo Gómez *et al.* (1996) proponen que la lisofosfatidilcolina interacciona con la enzima en un sitio cercano a las hélices transmembranales, y que posiblemente se localiza en los lípidos que rodean a la ATPasa, de tal forma que la unión del compuesto en este sitio es capaz de inducir un movimiento conformacional de la enzima involucrando el rearrreglo del dominio inhibitorio, lo que explica como un compuesto hidrofóbico, puede causar el desplazamiento de una estructura que no es membranal como es el carboxilo terminal.

Por otra parte, se ha evaluado la relación entre la actividad de bombeo de protones y el tipo de fosfolípidos membranales. Para conseguir este objetivo la enzima se ha reconstituido en liposomas preparados con especies moleculares variadas de fosfolípidos o bien comparando su efecto en la enzima solubilizada. Los efectos máximos en el bombeo de protones se observaron al añadir 1-palmitoil 2-oleoil-fosfatidilcolina y dentro de los 1-palmitoil 2-oleoil fosfolípidos el efecto en el bombeo sigue este orden: 1-palmitoil 2-oleoil-fosfatidilglicerol \geq 1-palmitoil 2-oleoil-fosfatidilserina > asolectina > 1-palmitoil 2-oleoil-fosfatidilcolina >> 1-palmitoil 2-oleoil-fosfatidiletanolamina = 1-palmitoil 2-oleoil 18:1 ácido fosfatídico (Kasamo y Wada 1993; Kasamo y Sakibara 1995).

Otro componente importante en las membranas de las plantas son los esteroides, dentro de ellos se encuentran el sitosterol, el stigmasterol y el campesterol. Aunque poco se ha estudiado sobre el efecto de estos compuestos en la actividad de la ATPasa, se ha encontrado que el sitosterol y el 24 metil-colesterol inhiben el bombeo de protones de la enzima reconstituida en liposomas y que esta inhibición aumenta conforme se aumenta la concentración del esteroide. Por otra parte, el stigmasterol presenta un comportamiento bifásico, estimulador a bajas concentraciones y moderadamente inhibitorio a altas. Cabe hacer notar que la enzima debe presentar una gran sensibilidad para los esteroides, ya que debe discriminar por ejemplo, entre el sitosterol y el stigmasterol que tan sólo difieren en la doble ligadura que se presenta en el carbono 22 de este último compuesto (Sandstrom y Cleland 1989; Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997).

Por la composición química de los esteroides y a semejanza de los efectos del colesterol en membranas animales, se sugiere que un aumento en la concentración de éstos puede causar una disminución en la fluidez de la membrana y por ello un cambio en la actividad de la enzima. Sin embargo, hay datos que se oponen a estos resultados, por ejemplo se encontró que la actividad de la ATPasa es similar en dos diferentes tejidos, a pesar de que las membranas que las contienen presentan diferencias en la composición de esteroides y fosfolípidos (Cowan *et al.* 1993). Es probable que a pesar de que los lípidos totales sean diferentes en ambas membranas, los lípidos que rodean a la enzima sean similares en ambos tejidos, por lo que la actividad de la enzima resulta semejante en ellos.

Hay dos teorías que intentan explicar porqué la actividad de las proteínas de membrana es modulada por lípidos, una de ellas (teoría de los lípidos "bulk") propone que la gran extensión o el volumen total de lípidos de la membrana están involucrados en la fluidez de ésta, por lo cual un cambio en los lípidos causa un cambio en la conformación de la enzima y entonces cambia su actividad. La fluidez es un concepto dinámico que está relacionado con la estructura ordenada de la membrana en la que influyen la longitud de la cadena de ácido graso, su grado de insaturación, la cabeza polar de los lípidos y el empaquetamiento molecular de todos ellos. También, depende de la relación de esteroides a fosfolípidos y de proteínas presentes en la membrana. La otra teoría llamada de

lípidos adyacentes o anillo de lípidos, postula que la interacción entre los lípidos membranales adyacentes a la proteína influyen en la actividad de la enzima. Estos lípidos no son fácilmente removidos de la proteína y la cantidad de estos varía dependiendo del tamaño y de la forma de la enzima (Cooke y Burden 1990; Kasamo y Wada 1993; Kasamo y Sakibara 1995). Hay algunas evidencias experimentales que apoyan el que la ATPasa de la membrana plasmática pueda ser regulada a través de estos dos mecanismos, pero aún no resulta claro cual de las dos teorías se acerca más a lo que ocurre *in vivo*.

1.3.3.5 Formación de oligómeros.

Se ha demostrado que el péptido de 100Kda es capaz de llevar a cabo tanto la actividad de hidrólisis de ATP como el bombeo de protones, pero se desconoce si la enzima presenta algún tipo de arreglo oligomérico en la membrana. Se han utilizado dos estrategias diferentes para determinar el arreglo de la enzima. En uno de ellos se irradió a la enzima con diferentes dosis de radiación de alta energía (rayos γ) y después se analizó el decremento en la actividad de la ATPasa al aumentar la dosis de radiación total. El peso molecular estimado para la ATPasa de raíces de betabel fue de 225 Kda sugiriendo que la enzima puede ser un dímero (Briskin *et al.* 1985; Briskin y Niesman-Reynolds 1989). Por otra lado, Anthon y Spanwick (1986) añadieron agentes entrecruzadores a la enzima y determinaron un peso molecular de 336 Kda lo que supone un probable arreglo trimérico de ésta; sin embargo, para la ATPasa de protones de *Neurospora crassa* se han estimado dos diferentes valores de peso molecular: 220 Kda cuando se utilizó una preparación de membranas plasmáticas (Bowman *et al.* 1985) y 630 Kda para la enzima proveniente de una preparación solubilizada en tritón X-100 y reconstituida en lisofosfatidilcolina (Chadwick *et al.* 1987). Es probable que los detergentes y los fosfolípidos que se utilizan en la solubilización y reconstitución de la ATPasa de H^+ , puedan propiciar su oligomerización, por lo que aún resulta difícil determinar si fisiológicamente la ATPasa presenta un arreglo oligomérico y de que tipo es éste.

El otro tipo de evidencia se deriva de estudios cinéticos. La mayoría de los estudios sobre la actividad de la enzima reportan una cinética típicamente Michaeliana, sin embargo, hay tres trabajos recientes en los que la cinética es diferente (Ramos *et al.* 1994; Roberts *et al.* 1995; Roberts y Beaugé 1997). En ellos se presentan curvas de actividad con cooperatividad positiva o negativa. Una de las alternativas para explicar estos resultados consideró que había dos componentes enzimáticos que se revelaban a diferentes concentraciones de ATP, por lo que los autores utilizaron una ecuación que define la actividad observada como la suma de dos componentes enzimáticos y obtuvieron que estos componentes presentaban K_m diferentes, una de ellas definía un sitio de baja afinidad por el sustrato ($K_m=200$ a $1800\mu M$), componente que exhibe un valor similar al que se ha reportado por otros autores; el otro componente presentaba una afinidad alta ($K_m=2-16\mu M$). Las posibles explicaciones a estos resultados serían: a) que hubiera una población heterogénea de la enzima en la que por

ejemplo, una parte tuviera el carboxilo terminal intacto, es decir inhibiendo la actividad de la enzima y presentara la K_m de baja afinidad y que la otra población contuviera a la enzima con el carboxilo terminal desplazado y que entonces originara el sitio de muy alta afinidad; b) que se estuviera midiendo la K_m para ATP de cada una de las conformaciones en las que se presenta la enzima durante el ciclo catalítico, baja afinidad por ATP en la conformación E_2 y alta afinidad por ATP dada por la conformación E_1 , esta posibilidad es muy remota, ya que la velocidad a la que ocurre el cambio de conformación sería lo suficientemente grande como para no poder distinguir entre estas dos conformaciones. Sin embargo, Roberts y Beaugé (1997) plantean que el sitio catalítico se modifica durante el primer ciclo de unión de ATP y la posterior fosforilación-defosforilación de la enzima, transformándolo en un sitio regulatorio, de tal manera que la modificación que ocurre entre la primera y segunda exposición al nucleótido podría explicar las dos V_{max} y K_m que se han encontrado; c) que se formaran arreglos monómero-monómero y que funcionalmente cada uno de los sitios presentara una afinidad distinta por ATP y d) que hubiera una mezcla de isoformas de la enzima en el tejido examinado, aunque para los trabajos de Roberts *et al.* (1995) y Roberts y Beaugé (1997) esto no es factible, debido a que utilizaron una preparación de ATPasa de *Arabidopsis thaliana* obtenida por sobreexpresión de una sola isoforma de la enzima en levadura.

Debido a que los resultados obtenidos con estos dos enfoques experimentales pueden tener varias explicaciones, no se ha aceptado que el arreglo nativo de la enzima sea oligomérico y si estuviera presente tampoco se sabe cuales serían sus implicaciones funcionales.

II. Antecedentes inmediatos

El fenómeno de la germinación es muy interesante, ya que en él convergen una multitud de eventos que llevarán a la reactivación de la actividad metabólica de la célula, para prepararla para su posterior división. Sin embargo, los avances en el conocimiento de las características bioquímicas que son propias de la semilla en germinación y que la distinguen de la semilla en período de letargo son escasos, debido principalmente a las dificultades técnicas y metabólicas que ofrece la semilla. Algunos de los trabajos que se realizan en la actualidad van encaminados a la búsqueda de componentes bioquímicos propios de la germinación, mientras que otros investigan que compuestos, enzimas o vías metabólicas se "reprimen" o se "activan" para mantener a la semilla con una escasa actividad metabólica y poca habilidad para germinar.

La hidratación de los componentes celulares al inicio de la germinación, promueve la hidrólisis de los polímeros de reserva y su posterior transporte hacia las células embrionarias. La necesidad de las células tanto para mantener el metabolismo recién iniciado, como las condiciones de turgencia adecuadas, debe estar acorde con una actividad alta pero finamente regulada del sistema de transporte de solutos.

Una enzima que podría ser clave en el proceso de la germinación es la ATPasa de protones, debido a que la generación de un gradiente eléctrico y de pH a través de la membrana plasmática puede facilitar el transporte secundario de nutrientes, fenómeno que está relacionado con la nutrición y la turgencia celular. Además, se ha planteado que la acidificación que promueve la enzima en el apoplasto, es un factor inductor del aflojamiento de la pared celular, ya sea porque los protones puedan ejercer un efecto desestabilizador en la membrana, o bien, porque se ha encontrado que a pHs ácidos hay una mayor actividad catalítica de las xiloglucan-endotransglicosilasas, las β -glucanasas y las expansinas; las dos primeras rompen enlaces covalentes, mientras que las últimas rompen las interacciones iónicas de los componentes de la pared celular, promoviendo así su relajación (Bewley 1997; Crosgrave 1997).

En trabajos previos en este laboratorio se reportó que la actividad de ATPasa sensible a vanadato, en las vesículas de membrana plasmática obtenidas de embriones de maíz sin embeber era relativamente alta, lo cual ponía de manifiesto que la enzima permanece potencialmente activa para reiniciar su actividad durante el período de la germinación, aún después de pasar por el período de desecación natural de la semilla (García-Rubio *et al.* 1997; Sánchez-Nieto 1994; ver Apéndice). Además, se encontró que la actividad de la enzima se incrementa a las dos horas de la imbibición de los embriones y que posteriormente disminuye y se mantiene hasta las 5 h de imbibición (Sánchez-Nieto 1994).

Este aumento en la actividad a las dos horas de imbibición se podría explicar por síntesis *de novo* de la enzima; por modulación de la actividad de la enzima a través de la defosforilación, o a la proteólisis del carboxilo terminal por ejemplo, ya que estos caminos conducirían a un aumento en la actividad de la enzima. Esta posibilidad no es fácil de descartar, porque en el inicio de la germinación hay una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que deberán encargarse de la hidrólisis de las reservas almacenadas en la semilla. Tampoco, hay que olvidar que existe un cambio en el estado de hidratación de los embriones, desde un 7% hasta un 60% durante las primeras dos horas de imbibición, lo cual puede llevar a cambios en la estructura de la membrana, debidos ya sea a un rearrreglo de los componentes membranales, o bien a la incorporación o degradación de bloques estructurales producidos por el comienzo de la síntesis y degradación de los lípidos durante la reactivación del metabolismo celular. De esta manera, el cambio en el entorno membranal durante la germinación temprana, también puede constituir un factor que indujera una modificación de la actividad de la enzima, en virtud de la bien documentada sensibilidad de la enzima a los lípidos que la circundan (véase 1.3.3.4).

Por otra parte, hay que considerar que la disminución en la actividad de la enzima después de las 2 horas y su posterior estabilización, hasta valores de actividad cercanos a los que se obtuvieron en las vesículas de membrana de los embriones secos, podría ser explicado como la conjunción de los mecanismos de regulación ya descritos: el equilibrio entre la síntesis y degradación de la enzima, la modulación por fosforilación (que disminuye la activación de la enzima), el reacomodo del carboxilo terminal para dar lugar a una enzima con una actividad baja y finalmente, que la enzima que se encuentre en los tiempos de imbibición tardíos sea el producto de un gene diferente al que se expresó durante el proceso de embriogénesis, esto es, la síntesis de una isoforma específica.

Todos estos factores podrían participar individualmente o en combinación, y darían una explicación al patrón de actividad encontrado en el inicio de la germinación de los embriones de maíz.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar cuales son las causas que contribuyen a delinear el perfil de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en los tiempos tempranos de la germinación.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

III.2.1 Detectar la presencia de isoformas de la ATPasa de H⁺ al inicio de la germinación de los embriones de maíz.

III.2.1.1 Evaluar y comparar el efecto de diferentes modificadores en la actividad de la enzima de las vesículas de las membranas plasmáticas de los embriones embebidos diferentes tiempos, para encontrar diferencias que hagan evidente la presencia de formas diferentes de la enzima.

III.2.1.2 Purificar a la enzima de las membranas plasmáticas de embriones embebidos diferentes tiempos.

III.2.2 Medir el efecto de la modificación covalente (fosforilación y proteólisis) de la enzima a los diferentes tiempos de imbibición de los embriones

III.2.2.1 Determinar el efecto de la defosforilación de la enzima en la actividad de hidrólisis de ATP.

III.2.2.2 Remover la porción del carboxilo terminal de la enzima y medir los niveles de actividad.

III.2.3 Establecer la influencia del medio anfipático en la actividad de la enzima y determinar si existen diferencias en las membranas plasmáticas de los embriones embebidos diferentes tiempos.

III.2.3.1 Determinar y comparar los parámetros cinéticos de la enzima en diferentes medios anfipáticos.

III.2.3.2 Medir el contenido de radicales libres y el grado de peroxidación de las preparaciones de membrana plasmática de los embriones embebidos diferentes tiempos.

III.2.3.3 Cuantificar el contenido de fosfolípidos en las vesículas de membrana plasmática aisladas de los embriones con diferentes tiempos de imbibición.

III.2.4 Determinar la cinética de síntesis *de novo* de la enzima a los diferentes tiempos de imbibición de los embriones.

III.2.4.1 Medición de la síntesis *de novo* de la ATPasa por incorporación de Metionina-S³⁵.

III.2.4.1.2. Medir el efecto de la adición de inhibidores de la transcripción y traducción en los niveles de actividad de la ATPasa de protones en las vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos durante diferentes tiempos.

IV. Materiales y métodos complementarios

La mayoría de los materiales y métodos que se utilizaron en la realización del trabajo incluido en esta tesis se encuentra descrito en los dos manuscritos que se encuentran en el Capítulo de Resultados (V). En tanto que la metodología que se utilizó para la obtención de una fracción enriquecida en vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones embebidos diferentes tiempos, se presenta en el artículo del apéndice. Existen otros resultados relevantes que se realizaron durante el desarrollo del trabajo de esta tesis, pero que aún no forman parte de ningún manuscrito. Estos resultados se han agrupado bajo el capítulo de Resultados Complementarios y en el presente capítulo sólo se describen los métodos que se emplearon para obtener esos resultados.

IV. 1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Se hicieron minigeles de poliacrilamida-SDS según la técnica de Schägger y von Jagow (1987) como se describe en la Tabla 1. Se colocaron en cada pozo del gel 60 o 100 µg de proteína membranal y como referencia en un pozo se añadieron 15 µl de una mezcla proteínas de peso molecular conocido (estándares preteñidos de alto peso molecular Marca BIO-RAD). Se corrió el gel por 1 h a 50 mV hasta el gel separador y después a 90 mV por 2.5 horas o hasta que el indicador se saliera del gel. El gel se lavó con solución de transferencia (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.1% SDS) por 10 minutos o se trató con las soluciones para teñir las proteínas del gel.

Tabla 1. Cantidades de los diferentes componentes para preparar un minigel de poliacrilamida-SDS según la técnica de Schägger y von Jagow (1987). El grosor de los minigeles fue de 0.75 mm.

SOLUCIONES	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
Acrilamida-Bisacrilamida (30%-0.98%)	1.114 ml	178.1 µl
Amortiguador del gel	1.114 ml	333.94 µl
Glicerol	445 µl	-
Agua	668 µl	823.7 µl
Persulfato de amonio 10%*	11.14 µl	11.13 µl
TEMED*	1.11 µl	1.11 µl
Volumen total	3354.4 µl	1348 µl

* Adicionar justo antes de usarse.

Para teñir las proteínas, se agitaba el gel en una solución 50% metanol y 10% ácido acético por 30 minutos, después se transfería a una solución que contenía 0.1% de azul de Coomassie G en 10% de ácido acético y se agitaba de 10 a 15 min. Si el fondo del gel era muy intenso, se procedía a desteñir con 10% ácido acético toda la noche, seguido de un lavado con agua. Para almacenar el gel se sumergió en 1% glicerol por 10 minutos para colocarse después entre dos papeles de celofán, dejándose secar toda la noche a temperatura ambiente.

IV. 2 Electrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida SDS a papel de nitrocelulosa

Las proteínas del gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (0.45µm diámetro de poro) según la técnica de Towbin *et al.* (1979). La transferencia se realizó a 340 mA por 1.5 h en una cámara húmeda con sistema de enfriamiento. Después de la transferencia se lavó el papel por 10 minutos con solución de TBS (0.5M NaCl, 20mM Tris/HCl pH 7.5) con agitación lateral moderada y se bloqueó con 2% de leche en polvo descremada marca Sveltes en TBS por 30 minutos. Para detectar a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, se utilizó como primer anticuerpo un suero que reacciona contra la porción amino terminal de la enzima (Sánchez Nieto 1994) en una dilución de 1:1000 en TBS y se incubó toda la noche a temperatura ambiente, al término de la incubación se lavó el papel de nitrocelulosa dos veces por 5 minutos con solución TTBS (TBS adicionado con 0.05 % de Tween 20) y el tercer lavado se hizo con TBS por 5 minutos. Se usó como segundo anticuerpo el anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, en una dilución 1:1000 en TBS, incubándose con agitación lateral moderada y después de 6 horas se lavó el papel 2 veces con TTBS y una vez con TBS 5 minutos cada vez. Las bandas de reacción con el anticuerpo se revelaron después de 10 a 30 minutos por la adición de solución reveladora (25 ml de una solución de 1 mM MgCl₂, 0.1 M NaHCO₃/NaOH pH 9.8 suplementado con 7.5 µg de cloruro de p-nitro azul de tetrazolio, disueltos en 250 µl de dimetilformamida al 70 % y 3.75 µg de fosfato de 5-bromo-4 cloro, 3 indolil sal de toluidina disueltos en 250 µl de dimetilformamida). La absorbencia de las bandas de reacción se leyeron en un Ultrascan XL100 (Pharmacia LKB Biotechnology AB) y se determinó el peso molecular de la banda por comparación con las bandas de proteínas de los estándares.

IV.3 Medición de la incorporación de Metionina-³⁵S en las fracciones de homogeneizado sin núcleos y microsomal de embriones de maíz embebidos por diferentes tiempos.

Embriones de maíz (15) fueron incubados con agitación constante a 29°C por diferentes tiempos en 1.2 ml de agua o en agua suplementada con 100 µCi Metionina-³⁵S (Actividad específica 1000Ci/mmol). Pasado el tiempo de incubación se lavaron los embriones con una solución de 1 mM Metionina (no marcada radiactivamente) por tres veces, agitando vigorosamente, para luego congelarse los embriones con nitrógeno líquido y molerse con mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino, el cual se sometió a una segunda homogeneización utilizando un amortiguador que contuvo 250 mM sacarosa, 2 mM EDTA, 1 mM ATP y 70 mM Tris / HCl pH 8.0, en una relación de 1.5 ml de amortiguador por 1g de tejido. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el sobrenadante se centrifugó por 10 minutos a 1000 xg en el rotor TLA 100.4 a 4°C. Una parte del sobrenadante obtenido, al que denominamos "fracción H-N" (homogeneizado sin núcleos) fue centrifugado a 13,000 xg por 10.min en el rotor TLA 100.4, nuevamente se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 g por

1 h en el rotor TLA 100.4 a 4°C. El botón obtenido (microsomos) se resuspendió en una solución de 2M de Urea, 0.5% Tween-20 y 1% SDS.

Para medir la incorporación total de Metionina-³⁵S a las proteínas, se realizó lo siguiente: lavado de las fracciones H-N o microsomal con cuatro volúmenes de acetona por 2 h o toda la noche a -20°C. Después se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos a 4°C en la Microfuga MR1812 (Marca JOUAN) y el botón obtenido se lavó con éter y nuevamente se centrifugó a 15,000 rpm. El botón se resuspendió en 5% SDS y 5 o 10 µl de este botón se añadieron a 5 ml de líquido de centelleo, para leer la radiactividad de la Metionina-³⁵S incorporada a las proteínas.

Por otra parte, se tomaron 100 µg de proteína microsomal y se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS siguiendo la técnica de electroforesis descrita anteriormente. Después se transfirieron las proteínas a papel de nitrocelulosa y se detectó a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática con un anticuerpo específico. La banda que se detectó con el anticuerpo se cortó del papel de nitrocelulosa y se colocó en un vial que contenía 5 ml de líquido de centelleo. Se determinaron las cuentas por minuto por banda de proteína de 100 kDa.

IV.4 Inhibición de la síntesis *de novo* de la enzima utilizando cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) o α -amanitina (inhibidor de la síntesis de RNAm).

Se pusieron a embeber 7g de embriones de maíz A₆O₂ sobre papel filtro humedecido con agua y se incubaron por 1, 2, o 3 horas a 29°C. Al concluir el tiempo de incubación fueron transferidos a un vaso de precipitados que contenía 13 ml de 100 mM de cicloheximida o 200 µg/ml α -amanitina, se agitaron vigorosamente y el contenido del vaso se vació a un papel filtro seco en una caja de Petri estéril, se distribuyeron los embriones en el papel y se incubaron por 1 o 2 horas más a 29°C. Después de la incubación se procedió a obtener las vesículas de membrana plasmática según se describe en Sánchez-Nieto *et al.* (1997). A las VMP se les midió la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato según se describe en la sección de materiales y métodos del artículo que aparece en la Sección I del Capítulo de Resultados (V).

IV.5 Desfosforilación de la enzima.

Se mezclaron 100 µl de VMP (100 µg de proteína) de embriones embebidos 0 o 5 horas con 400 µl de fosfatasa alcalina unida a agarosa (40 Unidades de actividad) equilibrada en 20 mM de Tris/HCl pH 7 y 2 mM de MgCl₂, se incubó a 25°C durante 0, 5, 10, 15 y 20 min y la reacción se detuvo a cada uno de los tiempos indicados al filtrar el medio de reacción a través de una membrana de polisulfonato de 0.2 µm. Al filtrado se le midió la actividad de hidrólisis de ATP (ver Materiales y Métodos del artículo que aparece en la Sección I del Capítulo V de Resultados).

V. Resultados

Este capítulo se ha dividido en tres secciones. En las dos primeras se encuentran los artículos generados de este trabajo precedidos ambos por su correspondiente resumen. Mientras que en la última sección, se presentan resultados que no forman parte de ningún manuscrito, pero que son importantes porque completan la información obtenida en este trabajo de tesis en aspectos que pueden contribuir a explicar la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática al inicio de la germinación.

A continuación se mencionan las secciones contenidas en este capítulo:

V.1 Comparación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en vesículas obtenidas de embriones de maíz secos e hidratados (Biochim. Biophys. Acta 77475, 1-3. 1998).

V.2 Propiedades cinéticas de la ATPasa de H⁺ de embriones de maíz secos y embebidos 5 horas en una fracción de membranas plasmáticas y en una preparación solubilizada. (Enviado a Biochim. Biophys. Acta)

V.3 Resultados complementarios.

V.3.1 Efecto de la desfosforilación en la actividad de la ATPasa.

V.3.2 Detección de los niveles de ATPasa a los diferentes tiempos de imbibición con un anticuerpo específico.

V.3.3 Incorporación de Metionina-³⁵S a las proteínas totales, a la fracción membranal y a la banda de ATPasa de los embriones embebidos por diferentes tiempos.

V.3.4 Efecto de inhibidores de la traducción y transcripción en la actividad de la ATPasa.

V.3.5 Efecto de la concentración de Mg²⁺ libre en la actividad de la enzima y en su inhibición por vanadato.

Sección V.1 Comparación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en vesículas obtenidas de embriones de maíz secos e hidratados (Biochim. Biophys. Acta 77475, 1-3. 1998).

Resumen del trabajo

Una de las posibles explicaciones al patrón de actividad de ATPasa que se encontró al inicio de la germinación es la presencia de formas diferentes de la enzima, ya que hay evidencias de la expresión diferencial de los RNAm de las isoformas de la ATPasa en tejidos y estadios específicos del desarrollo de la planta (Ewing y Bennett 1994; Ewing *et al.* 1990; Harper *et al.* 1990; Harper *et al.* 1990; Michelet *et al.* 1994). Esto complementado con el reporte de las características bioquímicas de tres isoformas de la ATPasa de H⁺ de *Arabidopsis thaliana* (AHA1, AHA2 y AHA3), trabajo en el que se encontraron diferencias en algunas de las propiedades bioquímicas de estas isoformas (Palmgren y Christensen 1994).

Con el objetivo de encontrar evidencias que pudieran apoyar o descartar la presencia de formas diferentes de la enzima al inicio de la germinación, decidimos explorar el efecto de diferentes factores sobre la actividad de la ATPasa. Suponiendo de que si ocurrió algún cambio en la proteína (transcripcional o traduccional) durante la germinación, era entonces probable que sus parámetros bioquímicos también cambiaran.

Debido a que dentro de las propiedades bioquímicas que caracterizan a una enzima, está la de presentar sitios específicos para la unión de ligandos (por ejemplo inhibidores y activadores), aminoácidos que son clave para la catálisis o para el mantenimiento de la estructura terciaria del sitio activo o de la proteína entera, se eligió determinar los efectos de concentraciones crecientes de vanadato (inhibidor) y lisofosfatidilcolina (activador), el efecto del pH y la estabilidad de la enzima al incremento en la temperatura de preincubación en la actividad de la ATPasa de los embriones embebidos diferentes tiempos, por lo que modificaciones en la estructura de la enzima que influyen o participan en la catálisis, podrían ser detectados de manera indirecta con alguno o varios de los factores elegidos.

Se determinó el efecto del VO₄³⁻ sobre la actividad de hidrólisis de ATP en las VMP obtenidas de embriones embebidos diferentes tiempos. El vanadato es un inhibidor que se une fuertemente a las enzimas que presentan un intermediario fosforilado durante el ciclo catalítico, probablemente porque se parece al intermediario fosforilado, uniéndose al sitio activo de la ATPasa (Briskin 1992; Serrano 1990). Se obtuvieron los valores de I₅₀ para vanadato (concentración de vanadato capaz de inhibir al 50% la actividad de la enzima) de los embriones embebidos diferentes tiempos a partir de las curvas de actividad de la ATPasa en presencia de diferentes concentraciones de vanadato y a concentración saturante de sustrato (Ver Resultados complementarios Sección V.3.5). Los resultados indicaron que la enzima obtenida de los embriones embebidos 5 horas era 5 veces

más sensible a la inhibición por vanadato que la enzima proveniente de los embriones sin embeber o embebidos 1, 2 y 3 horas. Estos resultados sugerían que la enzima de los tiempos cortos de imbibición era diferente a la de los tiempos largos.

Para apoyar los resultados obtenidos con el inhibidor se midió el efecto de la lisofosfatidilcolina, el pH y la temperatura en la actividad de la enzima proveniente de embriones embebidos tiempos cortos (0h) y de embriones embebidos por tiempos largos (5h). La actividad de ATPasa de las preparaciones membranales de 0 y 5 horas aumentó por la adición de lisofosfatidilcolina (LPC), sin embargo, tanto la velocidad máxima obtenida como la concentración de LPC para alcanzar esta velocidad fueron diferentes en las dos preparaciones membranales. En cuanto a las curvas de pH se observó que ambas preparaciones membranales (0 y 5 h) presentaron el máximo de actividad a pH alrededor de 6.5, no obstante la actividad máxima y la forma de cada una de las curvas son significativamente distintas. Por otra parte, al aumentar la temperatura de preincubación de las VMP se observó un decremento en la actividad de ATPasa en ambas preparaciones membranales, aunque fue más pronunciada la disminución en la actividad de la enzima de 5 horas. Aún cuando estos hallazgos sí sugerían que a 0 y 5 horas hay dos actividades de ATPasa diferentes, no define si las diferencias encontradas se debían a isoformas distintas o a una forma modificada de la enzima.

Una modificación que podría explicar las diferencias en las propiedades de la enzima de tiempos cortos y largos, es el desplazamiento del carboxilo terminal de la enzima, ya que se ha comprobado que la remoción o el cambio conformacional del carboxilo terminal pueden causar un aumento en la actividad catalítica de la ATPasa (Palmgren *et al.* 1988, Palmgren *et al.* 1991). Se ha planteado que la enzima mantiene una actividad baja cuando el carboxilo terminal interacciona con el dominio de unión a ATP o el dominio de transducción, mientras que, cuando se encuentra el carboxilo alejado de esta región, la actividad de la enzima aumenta. La proteólisis del carboxilo es un tratamiento que se sabe libera a la enzima de la restricción que impone el carboxilo para llevar a cabo la catálisis. Aunque no es el único procedimiento que puede aumentar la actividad de la enzima, otra condición frecuentemente usada es la adición de lisofosfatidilcolina, la cual se ha sugerido que por ser un lípido membranar podría interaccionar con la porción hidrofóbica de la enzima e inducir el cambio conformacional necesario para alejar al carboxilo del dominio de unión (Gómez *et al.* 1997).

Para investigar los posibles cambios en el extremo carboxilo de la ATPasa de H^+ , se sometieron a las VMP de embriones embebidos 0 y 5 horas a dos condiciones, una de ellas fue el tratamiento con tripsina para eliminar el carboxilo y la otra condición fue la adición de lisofosfatidilcolina. Se encontró que la incubación de las membranas plasmáticas con tripsina o con LPC era capaz de incrementar la actividad de la enzima tanto de los embriones sin embeber como de los embebidos 5h, lo cual sugería que las dos enzimas mantienen intacto su extremo carboxilo terminal y que este se encuentra en la conformación de baja actividad.

Para establecer de manera directa si las diferencias observadas en la actividad de ATPasa de los embriones embebidos 0 y 5 horas se explicaban por la presencia de formas diferentes de la enzima, se procedió a purificar la proteína de las VMP de 0 y 5 horas de imbibición mediante un procedimiento ya reportado (Johannson *et al.* 1994). Primero se realizó la solubilización de la enzima y posteriormente se aplicó y eluyó de una columna de intercambio aniónico (MonoQ) mediante un sistema de FPLC. El perfil de actividad de ATPasa de las diferentes fracciones eluidas de la columna, mostró un pico máximo de actividad tanto para la enzima proveniente de los embriones no embebidos como para los embebidos 5 horas, sin embargo, la actividad máxima y el tiempo de retención en la columna fueron diferentes para ambas enzimas. Los resultados sugieren que existen diferencias estructurales entre la enzima de 0 y 5 horas puesto que presentan diferente afinidad por la columna, pero no define si esta diferencia se debe a un cambio en uno o más aminoácidos, a que una de las formas presentara más o menos sitios fosforilados o bien a ambos tipos de modificaciones; ya que la presencia de formas diferentes de la enzima como la aparición de una forma más o menos fosforilada podría explicar las diferencias que se encontraron en la sensibilidad de la enzima a los diferentes factores probados.

A pesar de los resultados anteriores no se puede descartar la participación del entorno membranar en los cambios de las propiedades en la actividad de la enzima, ya que la ATPasa es muy sensible a los cambios en el medio anfipático y además durante la germinación, los cambios en el estado de hidratación de las membranas celulares alteran la estructura membranar, probablemente no solo por el rearrreglo de los fosfolípidos de la membrana (Crowe *et al.* 1992, Black 1997), sino también por la modificación de los fosfolípidos (Sandoval *et al.* 1995) y por su degradación y síntesis *de novo*.



ELSEVIER



Biochimica et Biophysica Acta 77475 (1998) 1–13

Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos

Sobeida Sánchez-Nieto ^a, Marietta Tuena de Gómez-Puyou ^b, Rogelio Rodríguez-Sotres ^a, Aquiles Carballo ^c, Marina Gavilanes-Ruiz ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Conjunto E. UNAM, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico DF, Mexico

^b Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Cd. Universitaria, 04510 Mexico DF, Mexico

^c Centro de Botánica, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de Mexico, Mexico

Received 4 June 1998; revised 26 August 1998; accepted 26 August 1998

Abstract

ATP hydrolysis from H⁺-ATPase of plasma membrane was measured in vesicles from maize embryos imbibed at times between 0 and 5 h. The activity had a maximum at 2 h of imbibition. In order to detect whether the enzyme had the same characteristics through the first 5 h of imbibition, vanadate and lysophosphatidylcholine sensitivities, as well as trypsin, pH and temperature effects on the activity of the H⁺-ATPase from plasma membrane vesicles isolated from embryos imbibed at 0 or 5 h were studied. The results indicate that the activity expressed at 0 h is very different from the activity at 5 h. The activity from embryos imbibed for 5 h was less sensitive to vanadate, trypsin and lysophosphatidylcholine, more sensitive to denaturing temperatures and with a broader pH dependence, as compared to the activity from embryos that were not imbibed. When vanadate-sensitive ATPase activity was purified by anion exchange chromatography, the peaks obtained from the 0 and 5 h imbibed embryos were different and non-overlapping. These data could be interpreted in terms of different enzyme structures from dry and imbibed embryos due to either different primary structures or covalent modifications, or differences in membrane vicinities. 0005-2736/98/\$ – see front matter © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Embryo germination; H⁺-ATPase; Plant plasma membrane ATPase; Plasma membrane; Seed germination; *Zea mays*

1. Introduction

When a seed is imbibed, structural and metabolic changes occur in the embryo before radicle protrusion, which is the culmination of seed germination [1,2]. Many of these changes involve cellular membranes. It has been reported that the lipid bilayer undergoes structural modifications as phase transitions, as a consequence of the passage of the seed from the dry to the hydrated state [3–7]. However, information on the activity of membrane proteins in the transition from the dry to the hydrated state is

Abbreviations: AHA, *Arabidopsis* H⁺-ATPase; Btp, 1,3-bis[Tris(hydroxymethyl)-methylamino]propane; C₁₄E₈, polyoxyethylene-8-myristyl ether; CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenyl-hydrazine; DTT, dithiothreitol; LPC, lysophosphatidylcholine; MES, 2(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; MOPS, 3(*N*-morpholino)propane-sulfonic acid; PEG, polyethyleneglycol; TLCK, Na-*p*-tosyl-L-lysine chloro-methyl ketone; TPCK, *N*-tosyl-L-phenylalanine chloro-methyl ketone

* Corresponding author. Fax: +52 (5) 622-5329;

E-mail: gavilan@servidor.unam.mx

0005-2736/98/\$ – see front matter © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

PII: S 0005-2736(98)00164-3

scarce. Some of these enzymes are required to support growth in more advanced stages of seed germination, in order to produce radicle protrusion. The H^+ -ATPase, a housekeeping enzyme, is one of the plasma membrane enzymes that can fulfil some physiological functions associated to germination.

The H^+ -ATPase from the plant plasma membrane is an amphipathic protein that translocates H^+ against a concentration gradient: from the cytosol ($0.1 \mu M H_3^+O$) to the apoplasmic space (about $10 \mu M H_3^+O$), at the expense of energy derived from ATP hydrolysis [8–10]. The electrochemical H^+ gradient thus generated can be used for secondary transport [11–14], cell elongation [15,16], and pH regulation [17–19]. Previous work showed that this enzyme is present and potentially active in embryos from dry maize seeds and that the extent of activity changed in embryos imbibed for 1 and 7 h [20]. The present work describes the dynamics of the activity of the plasma membrane H^+ -ATPase and the different properties that it displays during the first 5 h of imbibition, when water penetrates the dry maize embryo, and no radicle elongation is still visible.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

Embryos were dissected from mature, dry maize seeds (*Zea mays* L. hybrid Montecillos A₆O₂, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de Mexico) using a scalpel and removing the endosperm. The integrity of the embryos was reflected in a germination of 96%, the same as that reached by the whole kernels and which coincided with the Trypan blue exclusion test [21].

2.2. Germination tests

Embryos were sterilized with 0.12% sodium hypochloride for 2 min, washed twice with distilled water, placed on wet filter paper in Petri dishes, and incubated at 29°C in darkness for different times. For germination recording, 30 embryos were imbibed from 0 to 72 h. The embryos were considered to be germinated when the radicle reached at least 1 mm of elongation.

2.3. Water uptake

Three hundred and ninety sterilized embryos were placed in 13 Petri dishes and samples of 30 embryos were taken to determine fresh weight at the indicated times.

2.4. Isolation of plasma membrane vesicles

At the end of each incubation time (0, 1, 2, 3 or 5.5 h), batches of 200 embryos were immediately frozen with liquid N_2 , ground initially with mortar and pestle, and then with a Tissue Tearor (Biospec products, Oklahoma, USA) at 12000 rpm for 4 min to produce a fine powder. The powder was suspended in homogenization buffer containing 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 1 mM ATP, 70 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM β -mercaptoethanol, 4 mM dithiothreitol (DTT), 100 $\mu g/ml$ *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 50 $\mu g/ml$ *N*-*p*-tosyl-L-lysine chloro-methyl ketone (TLCK) and 7 mg/ml chymostatin, at a ratio of 1.5 ml buffer per g of embryo fresh weight. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at 1000 g for 7 min. The supernatant was used to obtain an enriched plasma membrane vesicles by the aqueous PEG/Dextran two-phase partitioning system [22], following the modifications described by Sánchez-Nieto et al. [20].

2.5. Solubilization and purification of the enzyme

The procedure was performed according to Johansson et al. [23] with some modifications. Plasma membranes at a concentration of 4 mg/ml were mixed with an equal volume of buffer A containing 10 mM MOPS/BTP pH 7.0, 20% (v/v) glycerol, 5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.5 mM ATP and supplemented with 1 M KCl and 1.5 mg/ml $C_{14}E_4$. This buffer was added dropwise under continuous stirring and followed by an incubation at room temperature for 30 min. The mixture was then centrifuged at $100\,000 \times g$ for 45 min. The pellet was resuspended in the initial volume of buffer A and the enzyme was solubilized by dropwise addition of buffer A containing 20 mg/ml dodecyl- β -D-maltoside (1 ml resuspended pellet per 1 ml buffer for solubilization; for optimal recovery of the ATPase activity the deter-

gent/protein ratio was about 10), under continuous stirring. After 30 min at room temperature, unsolubilized material was pelleted at $100\,000\times g$ for 45 min. The supernatant was applied to a MonoQ HR5/5 (Pharmacia) FPLC anion-exchange column. The column was equilibrated with 10 mM histidine-HCl, 5% (w/v) glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM ATP, pH 6. Bound protein was eluted by applying a 0–1.0 M linear gradient of NaCl at a flow rate of 0.3 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected and assayed for ATPase activity in the presence and absence of sodium orthovanadate.

2.6. Lipid activation of the H^+ -ATPase

Soybean phospholipids were added to restore the ATPase activity lost during the purification of the H^+ -ATPase [23]. A solution consisting of 10 mM MOPS/Btp pH 7.0, 5% (v/v) glycerol, 0.1 mM DTT (dithiothreitol), 2 mg/ml asolectin and 2 mg/ml dodecyl- β -D-maltoside was mixed with an equal volume of the column eluate or the supernatant of the dodecyl- β -D-maltoside solubilization, and the mixture was incubated for 8 min at room temperature before doing ATPase activity measurements.

2.7. Determination of ATPase activity

ATP hydrolysis from plasma membrane H^+ -ATPase (EC 3.6.1.35) was measured as described in Sánchez-Nieto et al. [24] in 150 μ l of assay medium that contained: 250 mM sucrose, 7 μ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone (CCCP) and 2 mM sodium azide to prevent ATP hydrolysis from traces of contaminant mitochondrial ATPase (EC 3.6.1.3). ATP/Tris pH 7.0 and $MgCl_2$ were added at the concentration indicated in each experiment. The calculation of the concentration of ATP and Mg^{2+} complexes was done as described in Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares [25] and the substrate concentration was given in terms of ATPHmg [24]. The standard reaction mixtures also included 100 μ M (54 μ g/ml) egg lysophosphatidylcholine (type I, Sigma), or concentrations between 15 and 125 μ g/ml in titration experiments. Brij 58 had no effect on ATPase activity, either in 0 or 5 h preparations. Therefore, this detergent was not added in further experiments. Sodium orthovanadate prepared according to Gallagh-

er and Leonard [26], was used in concentrations from 10 to 300 μ M. ATP hydrolysis was initiated by the addition of 3.3 μ g of membrane protein. After 3 h at 30° C, the reaction was stopped by adding SDS (12% final concentration). Released Pi was determined with the method of González-Romo et al. [27]. All assays were done in triplicate for each treatment and all experiments were repeated with three to six different membrane preparations, each one at least twice.

Data from ATP hydrolysis in the presence of inhibitor were analyzed with the aid of non-linear regression algorithms implemented in the software package Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA) by fitting the experimental points to the following equation:

$$v = V_0 I_{50} / (I_{50} + [VO_4^{3-}]) \quad (1)$$

where, V_0 is the activity in the absence of inhibitor and v the observed activity.

2.8. Determination of ITPase activity

Ca^{2+} -dependent ITP hydrolysis was determined in a medium containing 250 mM sucrose, 20 mM MOPS/Btp pH 7.0, 2 mM NaN_3 , 7 mM CCCP, 10 mM ITP, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM EGTA, 54 mg/ml LPC and 50 mM free Ca^{2+} , which was estimated as described by Carnelli et al. [28]. The reaction was started by addition of 3.3 mg of plasma membrane protein and stopped by 24% SDS addition. The released phosphate was determined as described by González-Romo et al. [27].

2.9. Trypsin treatment

A 600 mg amount of plasma membrane protein was added to 480 ml of proteolysis medium containing 250 mM sucrose, 2 mM DTT, 5 mM EDTA/Btp pH 7.5 and 4 mM ATP/Btp pH 7.5. This was mixed with an equal volume of proteolysis medium supplemented with 24 mg of soybean trypsin (Boehringer Mannheim). After 20 min of digestion at 20°C, the reaction was stopped with the addition of 240 mg of soybean trypsin inhibitor in 240 ml of proteolysis medium. The membranes were washed with 5 vols. of solution containing 250 mM sucrose and 20 mM MOPS/Btp pH 7.0. After centrifugation at $100\,000\times g$, the pellet was resuspended in the same

solution at a concentration of about 1.0 mg/ml. Measurements of ATP hydrolysis were immediately performed.

2.10. pH dependence of ATPase activity

ATP hydrolysis was measured in the assay mixture described above (with 8.11 mM ATPMg and 35 μ M free Mg^{2+}), but buffered with 50 mM MES/Btp when pH was ≤ 7.0 or using 50 mM MOPS/Btp when pH was ≥ 7.0 . Activity at pH 7.0 was the same regardless of the buffer employed. The calculation of the parameters V_{max} , pK_1 , and pK_2 were performed according to Segel [29], or by fitting the above data to the Eq. 2:

$$V = V_{max} / (1 + 10^{(pK_1 - pH)} + 10^{(pH - pK_2)}) \quad (2)$$

2.11. Effect of denaturing temperatures on ATPase activity

A 3.3 μ g amount of plasma membrane vesicles in an ATPase assay mixture without ATP and $MgCl_2$, was incubated at 35, 40, 45, 50, 55 or 60°C, in a water bath for 10 min, and then the tubes were immediately transferred to a water bath at the temperature of the ATPase assay (30°C). The activity of the

latter samples was determined by mixing with ATP and $MgCl_2$ (8.11 mM ATPMg final complex concentration and 35 μ M free Mg^{2+}), the reaction was arrested after 3 h and the remaining enzyme activity was measured as described above.

2.12. Protein determination

The method of Peterson [30] with bovine serum albumin as standard was used.

3. Results

3.1. Water uptake and germination

When dissected embryos were imbibed in water, a rapid increase in their fresh weight took place (phase I) followed by a slower phase (phase II) and finally by a faster phase of fresh weight increase (phase III, Fig. 1), resembling the pattern previously observed in whole seeds [2]. The first phase of water uptake has been described as a period in which some tissue injury takes place, and the second to the time when a re-assumption of metabolic activity and re-organization of cell structures occur [2]. Fig. 1 shows that in our cultivar, phase II has already started after 1 h of

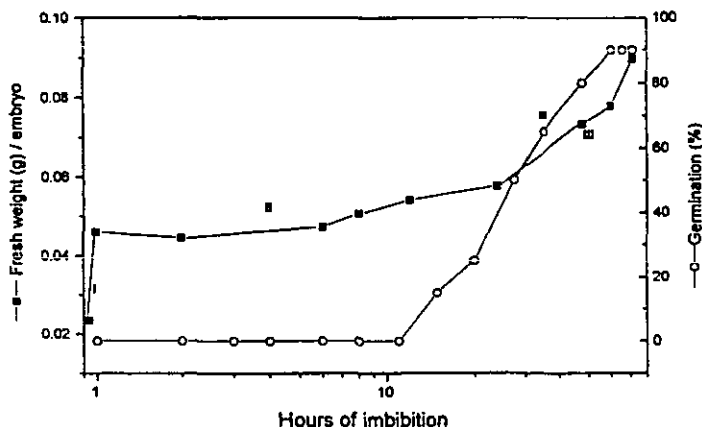


Fig. 1. Time course of germination (○) and fresh weight (■) increase of maize embryos. Embryos were imbibed at the indicated times and batches of 30 embryos were used to measure viability and fresh weight. This experiment is representative of three different experiments.

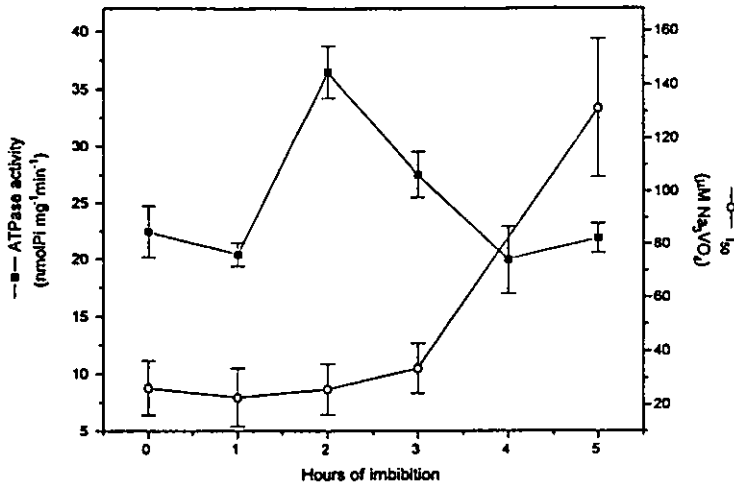


Fig. 2. Patterns of ATPase activity and vanadate sensitivity at early imbibition times. ATPase activity (■): 200 g of embryos were imbibed for the indicated times, then were homogenized in liquid N₂. The plasma membrane enriched fraction was obtained by the aqueous polymer two-phase partitioning system and the resulting U₂ fraction was used to measure ATP hydrolysis with 3.3 μg of membrane protein. The assay medium consisted of 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 2 mM NaN₃, 100 μM (54 μg/ml) lysophosphatidylcholine, 8.11 mM ATPMg and 35 μM free Mg²⁺. Vanadate sensitivity of ATPase activity (○): the inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase activity by increasing concentrations of Na₃VO₄ was determined in plasma membrane vesicles obtained from 0, 1, 2, 3 and 5 h imbibed embryos. To obtain the I₅₀ values, increasing vanadate concentrations were added to the reaction medium and the vanadate-sensitive ATPase activity was fitted to Eq. 1 in Section 2.

imbibition and phase III was initiated at about 8 h. The latter was close to the time when radicle elongation started (as inferred from the germination percent which was about 15% at 15 h of imbibition). The germination curve (Fig. 1), shows that during the first 10 h of imbibition, no germination of embryos took place.

We followed the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase during the first 5 h of imbibition; this included phase I and the initial part of phase II, when the metabolism reactivation starts to take place and there is no germination yet, assessed as radicle protrusion [2].

3.2. ATPase activity profile

The activity of the plasma membrane H⁺-ATPase was measured as vanadate-sensitive ATP hydrolysis in plasma membrane vesicles purified from embryos imbibed from 0 to 5 h (Fig. 2). The non-imbibed embryos showed a high activity that increased to a

maximum after imbibition for 2 h; this subsequently decreased to a level of constant activity similar to that of the non-imbibed embryos.

3.3. Properties of the enzyme throughout the first hours of imbibition

3.3.1. Vanadate inhibition

To explore if the variation in ATPase activity during the first 5 h of imbibition was associated to changes in some properties of the enzyme, we compared the sensitivity to vanadate, a highly specific inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase [8], on the activity present in membranes isolated from non-imbibed embryos or imbibed for 1, 2, 3 and 5 h. Fig. 2 shows that the enzyme activity from membranes of non-imbibed embryos and those imbibed for 3 h was more sensitive to vanadate than that of membranes after 5 h of imbibition, as it can be deduced from the I₅₀ values obtained for vanadate effect. It is shown that the I₅₀ values for vanadate

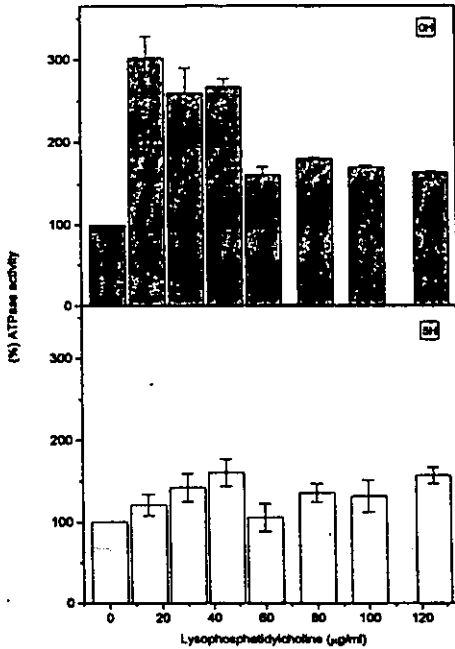


Fig. 3. Effect of increasing lysophosphatidylcholine concentrations in the plasma membrane ATPase activity from embryos imbibed for 0 (upper panel) and 5 h (lower panel). A 3.3 µg amount of membrane protein from 0 and 5 h imbibed embryos was added to an ATPase assay containing 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 2 mM Na₂S₂O₈, 8.11 mM ATPH₂Mg and 35 µM free Mg²⁺ and lysophosphatidylcholine at the indicated concentrations. Each value was expressed as percent of the activity without lysophosphatidylcholine as 100%. The control activities were 13.61 nmol Pi/mg/min and 16.0 nmol Pi/mg/min for 0 and 5 h, respectively.

inhibition of the plasma membrane ATPase activity from embryos imbibed for 5 h was about 5-fold higher than that at earlier times.

In view of the differential sensitivity of ATPase activity to vanadate at early and late imbibition times, we investigated the possible changes in other properties of the enzyme in embryos from an initial time, i.e. 0 h (dry, non-imbibed embryos) and in embryos at longer times, i.e. 5 h (hydrated, imbibed embryos). The peak of activity at 2 h was not further studied.

3.3.2. Lysophosphatidylcholine activation

Fig. 3 shows the effect of a plasma membrane H⁺-ATPase activator lysophosphatidylcholine (LPC) [31–33] on the ATPase activity of plasma membranes from 0 and 5 h imbibed embryos and we found significant differences. The concentration of LPC required to attain the maximal stimulation of H⁺-ATPase activity from non-imbibed embryos was 1.5 times higher than in embryos imbibed 5 h. The activity from non-imbibed embryos exhibited a maximal stimulation 1.35-fold higher, as compared to the activity of embryos imbibed 5 h. The lack of effect of Brij-58 on ATPase activity from both preparations implies that detergent action of LPC can be ruled out (see Section 2).

3.3.3. pH profile

The pH profile of the activity from the plasma membrane H⁺-ATPase was also different in embryos imbibed for 0 or 5 h. Fig. 4 shows that although both activities exhibited broad peaks, the enzyme from non-imbibed embryos showed larger activity changes in response to the variation of pH. The activity of 0 h was 2.3-fold higher than the activity from 5 h imbibed embryos. Estimates of the optimal pH for both types of embryos were of 5.9 and 6.2 for the 0 and 5 h imbibed embryos, respectively, and the corresponding pK values were 5.5 and 6.3 for dry embryos and of 5.2 and 7.2 for 5 h imbibed ones.

3.3.4. Temperature stability

Since enzyme stability at denaturing temperatures is a good parameter to detect differences in protein structure, we measured the behavior of the plasma membrane H⁺-ATPase from 0 and 5 h imbibed embryos as function of temperature (Fig. 5). The enzyme from non-imbibed embryos was stable and active up to 40°C for 10 min, but it progressively lost activity as the temperature was raised. In contrast, the activity from 5 h imbibed embryos suffered progressive loss of activity as temperature was raised above 35°C.

3.3.5. Trypsin sensitivity

Palmgren et al. [34,35] have shown that cleavage of the C-terminal of the PM H⁺-ATPase with trypsin increases the enzyme activity. In order to test if the 0 and 5 h enzymes showed a different response to tryp-

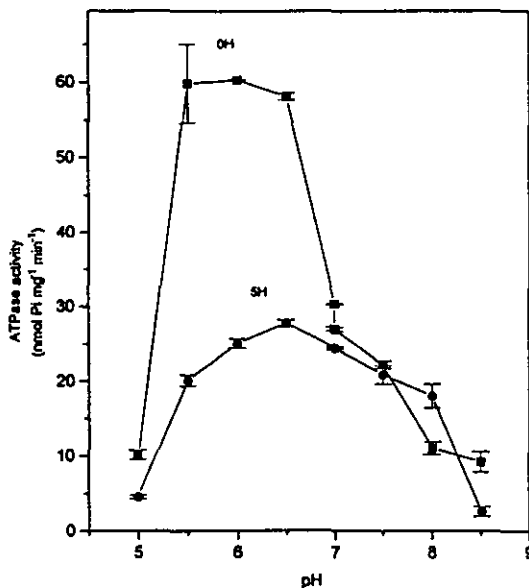


Fig. 4. pH dependence of the plasma membrane ATPase activity from 0 (■) and 5 (●) h imbibed embryos. ATP hydrolysis was assayed in a medium consisting of 250 mM sucrose, 2 mM NaN_3 , 100 μM (54 $\mu\text{g/ml}$) lysophosphatidylcholine, 8.11 mM ATPHMg, 35 μM free Mg^{2+} and 50 mM MOPS/Btp (pH 7.0) or 50 mM MES/Btp (pH 7.0) over the pH range 5.5–8.5. The experimental values were used to obtain the pK constants values with Eq. 1 in Section 2.

sin activation, the experiment presented in Table 1 was performed. The results show that the 0 h preparation was stimulated 90% by trypsin and 75% by LPC. On the other hand, the 5 h preparation was stimulated 35% by trypsin and 43% by LPC. The stimulations observed with trypsin and LPC were not additive.

3.4. Purification of the plasma membrane ATPase

A possible explanation for the biochemical differences observed was that non-imbibed embryos possessed one form of the enzyme which was different from the form present in 5 h imbibed embryos. Thus, the plasma membrane H^+ -ATPase from membrane preparations of embryos imbibed 0 and 5 h was solubilized with dodecyl- β -D-maltoside and then purified in a FPLC system with an anion exchanger. The yields of the different steps are in Table 2. It is shown that in relative terms, the wash with the detergent

C_{14}E_8 rendered pellets with similar enrichment in specific activities (1.5-fold and 1.9-fold for 0 and 5 h, respectively) to the preparation obtained in the Johansson et al. procedure (1.8-fold, [23]). In the same way, the solubilized enzyme after dodecyl- β -D-maltoside treatment presented recoveries of specific activity of 1.8-fold and 3.0-fold for 0 and 5 h, respectively, which is in the same range (2.6-fold), as for the analogous enzyme reported by Johansson et al. [23]. The final step of purification produced an 0 h enzyme of a 2.8-fold purification and a 5 h enzyme with a 5.2-fold increase in specific activity. This purification is higher than the one attained by Grandmougin-Ferjani et al. [36], but lower than Johansson et al. procedure [23], which yields a preparation with an 8.6-fold increase in specific activity. It is clear that 0 and 5 h preparations have low specific activities throughout the purification procedure as compared to other preparations from more conventional sources [23]. This might be due to the nature of tissue,

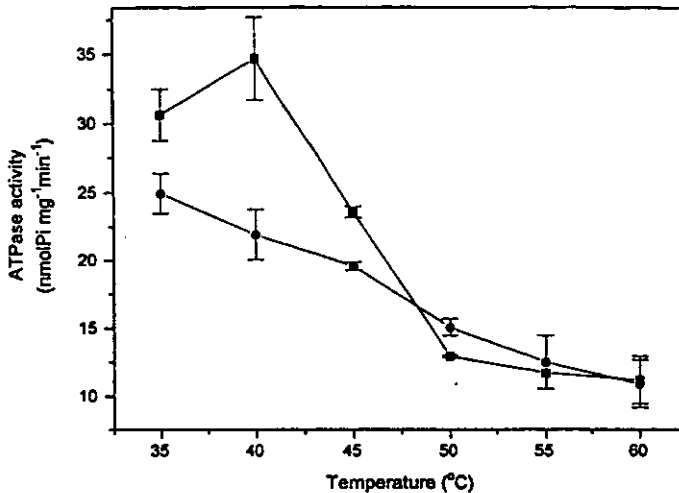


Fig. 5. Sensitivity of plasma membrane ATPase activity to high temperatures. A 3.3 μg amount of membrane protein from plasma membrane vesicles 0 (■) and 5 (●) h imbibed embryos was preincubated in the ATP assay mixture containing 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 2 mM NaN_3 and 100 μM (54 $\mu\text{g/ml}$) lysophosphatidylcholine for 10 min at the indicated temperature. Then, the mixture was transferred to an incubation temperature of 30°C to measure ATPase activity. This was initiated by the addition of ATP and Mg^{2+} at the final concentration of 8.11 mM ATP/Mg and 35 μM free Mg^{2+} .

which is embryonic tissue in a quiescent state (0 h) or just about re-starting metabolic functions (5 h).

The MonoQ column elution profiles of the solubilized ATPase from plasma membranes of embryos imbibed for 0 and 5 h are shown in Fig. 6. Each preparation had a unique symmetrical and non-overlapping peak of vanadate-sensitive ATPase activity, but with different retention times. The maximal activity of the peak from dry embryos was found in

fraction 12 and that from the imbibed embryos was in fraction 20.

4. Discussion

The rapid initial phase of water uptake is accompanied by a leakage of solutes from the seed or the embryo [2]. This has been interpreted as an increase of permeability by injury of the cell membranes that simultaneously undergo a process of self-reassembly upon the water influx to the seed tissues [3,6,37]. This phenomenon continues during the subsequent slower phase of water uptake (phase II), when many metabolic pathways are re-established [2,5]. In our study, maize embryos after the first 5 h of imbibition were in the second phase of water uptake. Therefore, we considered that this was an appropriate period of time to study the onset of expression and the course of the H^+ -ATPase activity from the plasma membrane upon hydration of the embryo.

The plasma membrane preparations used were highly pure, as estimated by the enrichment of glucan

Table 1
Effect of trypsin treatment on the ATPase activity from plasma membrane H^+ -ATPase from embryos imbibed 0 and 5 h

Treatment	ATP hydrolysis (nmol Pi/mg/min)	
	0 h	5 h
Control	13.0 \pm 0.7	16.1 \pm 0.4
Trypsin	24.6 \pm 0.7	21.6 \pm 0.4
LPC	22.7 \pm 0.3	22.9 \pm 0.3
Trypsin, LPC	22.9 \pm 0.7	22.0 \pm 0.6

Plasma membrane vesicles were exposed to trypsin or LPC action as described in Section 2 and after washing. ATPase activity was measured as Pi release.

synthase II (EC 2.4.1.12), a plasma membrane marker enzyme [20]. In addition, similar extents of vanadate-sensitive ATPase activity (about 85%) and the contaminant ATPase (mitochondrial ATPase, about 15%) were recovered in preparations either from non-imbibed or imbibed embryos (results not shown), thus allowing a fair comparison of the activity throughout the course of imbibition.

The ATPase activity of the plasma membrane vesicles obtained from non-imbibed embryos was remarkably significant considering that the tissue was in physiological latency and it was not exposed to water before homogenization. This suggests that at least part of the enzyme synthesized during embryogenesis remains in the membrane and is potentially active through the desiccation period, being able of functioning during early imbibition. This finding is consistent with reports that indicate that cytochrome oxidase (EC 1.9.3.1), ATPase and other enzyme activities from oxidative phosphorylation are present in mitochondria from dry sunflower seeds [38], and maize embryos of dry seeds [39]. It is possible that the plasma membrane H^+ -ATPase is related to trans-membrane solute transport, an essential function for the survival of the embryo during germination [1]. In fact, because of its importance as a primary pump,

this ATPase has been postulated as a housekeeping enzyme [40].

Another characteristic of the enzyme activity profile is the presence of a maximum activity at 2 h of imbibition. There are enzymes as superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) [41], peroxidase (EC 1.11.1.17) [41], and mitochondrial ATPase [39], that also show a peak of activity during the first 5 h of imbibition. However, no explanation has been found for this transient increase. In our case, once that the maximum activity was reached, a progressive decrease leading to the same initial levels of activity was observed. However, it is likely that the ATPase activity increases again during radicle elongation, since a direct correlation between cell elongation and ATPase activity in growing coleoptiles has been reported [15].

The changing profile of ATPase activity during the first 5 h of imbibition could be due to several causes: (a) changes of turnover rates, which could involve changes in the amount and/or expression of different isoforms; (b) modification of the enzyme; (c) changes in membrane properties; (e) a combination of more than one of these possibilities. Some of these various alternatives may be the result of differences in structural features of the enzyme.

Table 2

Purification of the plasma membrane H^+ -ATPase from dry and 5 h imbibed maize embryos by solubilization with dodecyl- β -D-maltoside and by anion exchange chromatography according to Johannsson et al. [23]

Fraction	Protein (mg)		Total ATPase activity (nmol Pi/min)		Specific ATPase activity (nmol Pi/mg/min)	
	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
Plasma membrane fraction	5.0 (100%) ^a	8.0 (100%)	110.5	174.4	22.1	21.8
$C_{14}E_8$ wash						
Pellet (ATPase)	1.9 (38.0)	4.08 (51)	63.6	169.3	33.5	41.5
Supernatant	3.0	2.95	9.9	17.6	3.3	5.9
Dodecyl- β -D-maltoside solubilization						
Pellet	0.7	1.2	7.77	11.7	11.1	9.8
Supernatant (solubilized ATPase)	1.0 (20)	2.7 (33.7)	40.6	173.3	40.6	64.2
MonoQ fractionation						
Best fraction ^b	0.09 (1.8)	0.08 (1.0)	5.6	9.1	61.9	114.3

Plasma membrane vesicles used for purification were obtained from 20 g of embryos by the aqueous phase partitioning system according to the method of Sánchez-Nieto et al. [20].

^aPercent of a recovery of each fraction.

^bReferred as the eluted fraction with the highest ATPase activity (corresponded to fraction 12 in dry embryos and fraction 20 in imbibed embryos).

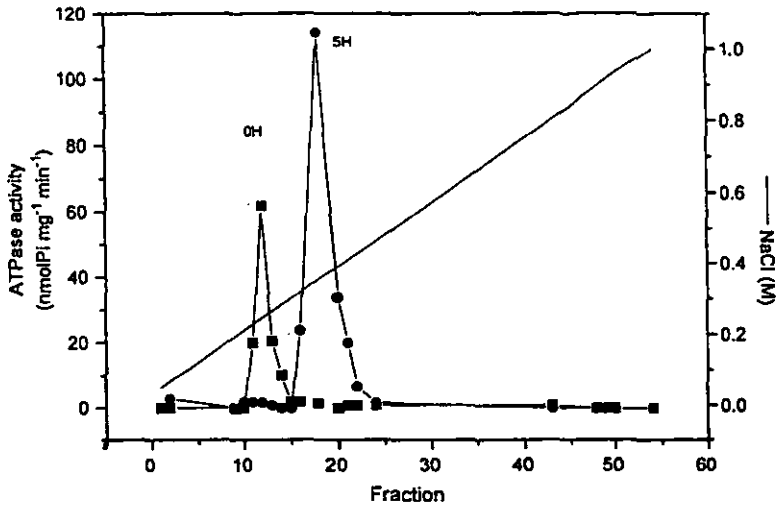


Fig. 6. Elution profile of the ATPase activity from a MonoQ S/5 column from *n*-dodecyl- β -*D*-maltoside solubilized enzyme from 0 (■) and 5 (●) h imbibed embryos. The bound enzyme was eluted with a NaCl linear gradient in a buffer containing 10 mM histidine-HCl pH 6.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM DTT and 0.1 mM EDTA with a flow rate of 0.3 ml/min and 0.5 ml fractions were collected. An aliquot of 300 μ l was supplemented with asolectin phospholipids to restore activity [23]. From this mixture, samples of 2 μ g of protein were withdrawn to measure ATPase activity as described in Section 2.

In relation to the first possibility, the only work relating the biochemical properties of the enzyme to different isoforms has been done by Palmgren and Christensen [42]. Their work established that the three AHA isoforms have different pH profile, vanadate sensitivity and LPC activation. In addition, an induced point mutation in an essential residue of the carboxy terminal segment of the yeast enzyme has been reported to shift the pH activity profile above 6.5 to a higher value [43]. Thus, the differences regarding values of optimal pH and pK shown by the enzymes of 0 and 5 h, may be due to differences in the isozyme expressed.

In relation to enzyme modification, it is well known that an increase in activity is promoted by phosphorylation of the enzyme [44,45]. Indeed, Eraso and Portillo, [46] showed that substitution of a negatively charged amino acid in the potential phosphorylation site of the yeast ATPase caused an increase in the activity and in the sensitivity to vanadate, and a displacement of the optimal pH to neutral values. On the other side, vanadate, an inhib-

itor that prevents the formation of the H^+ -ATPase phosphoenzyme intermediate [47] is highly specific (K_i in the range of 1–10 μ M). Mutations in and around the essential phosphorylation site in yeast H^+ -ATPase caused an increase in the K_i for vanadate [43]. Our results show that the I_{50} values found for vanadate of the enzyme of 5 h and the enzyme from earlier times are markedly different. In addition, the difference found in thermal stability of the activities from 0 and 5 h may also be explained by distinct structural characteristics in both enzymes. This last difference and those observed in the pH profile and vanadate sensitivity of the two enzyme preparations would suggest possible changes in the amino acid sequence, or covalent modifications such as phosphorylation.

The differences in the properties of the enzyme at the times of imbibition tested could also reflect variations in the membrane environment, since it is well known that the activity of this enzyme is strongly influenced by the lipid surroundings [48]. In our system, it is possible to expect changes in the lipid com-

position of the membrane during the early stages of germination, due to the presence of endogenous enzymes, i.e. lipoxygenases (EC 1.13.11.12) and fatty acid lyases [49].

Our data with LPC also show a difference in the pattern of activation of the enzyme, both in terms of maximal activation, and in terms of dependence of LPC concentration. Palmgren and Sommarin [32] and Palmgren et al. [50] reported that the range for both maximal activation and a complete detergent action by LPC was from 0.9 to 0.14 protein/LPC ratios. In our experimental conditions, the range of protein/LPC ratios explored was from 0.73 (at 30 µg LPC per ml) to 0.18 (at 120 µg LPC per ml), therefore, we considered that all the enzyme was fully activated by the LPC concentrations tested and had complete availability of substrate due to absence of latency release by Brij 58 addition. Olsson et al. [33] suggested that there is a direct interaction of LPC with the C-terminal of the ATPase, and Gomés et al. [51] proposed that LPC interacts with the membrane hydrophobic boundaries of the enzyme. In the same token, the smaller effect of trypsin on the 5 h enzyme could suggest that this enzyme was partially devoid of the C-terminal; however, according to the primary structure of the two maize isoforms reported so far [52,53], a removal of the C-terminal by trypsin cleavage would render proteins with a *pI* of 5.57 (Mha1) or 6.58 (Mha2). In both cases, the protein would not bind to the anion exchanger at pH 6.5 in our chromatographic conditions [54]. In fact, the 5 h enzyme eluted at a longer retention time than 0 h enzyme. Thus, the differences between the trypsin activation at the two times of imbibition could be interpreted as either structural differences in the protein or in the lipid composition of the membrane.

Our results with the MonoQ column showed closed, but defined, and different retention time peaks for the 0 and 5 h imbibition time samples. We have interpreted these data as an existence of different forms of the H⁺-ATPase from plasma membrane, but the possibility that the differences found correspond to two types of ATPase was considered. Against this speculation, we observed that both the 0 and 5 h preparations reacted with specific anti-plasma membrane H⁺-ATPase antibodies giving the same band of about 100 kDa (results not shown). The other possible ATPase present was the plasma

membrane Ca²⁺-ATPase, since endomembranes are in very low amounts in these preparations [20]. This Ca²⁺ pump has a characteristic calcium-dependent ITPase activity, which in our 0 and 5 h preparations was similar (0.7 and 1.1 nmol ITP hydrolyzed/mg/min, respectively), and very low as compared to the analogous activity from radish roots (16.7 nmol ITP hydrolyzed/mg/min, [28]). This result argues against the possibility that the Ca²⁺-ATPase was one of the two enzymes.

The nature of the dissimilarity (covalent modification, isoforms) was not studied in this work; nonetheless, the difference in the elution profiles of the solubilized enzyme obtained from embryos imbibed 0 and 5 h, is consistent with the different responses of the activity to pH, temperature, vanadate, LPC and trypsin.

So far, there are reports documenting the differential expression of the H⁺-ATPase isoforms at the level of mRNA in different tissues [36,55–57] or the characterization of some isoforms expressed in yeast endoplasmic reticulum [42]. In our work, we describe two distinct ATPase activities based on a biochemical characterization in the native membranes from imbibed and non-imbibed embryos. These differences could be explained in terms of two distinct forms of the enzyme or due to different membrane environments of the protein in the onset of germination. Such behavior of the enzyme is relevant in order to know the dynamics of the membrane components in the transition from the dry to the hydrated state of the seed embryo.

Acknowledgements

The authors are indebted to Drs. Armando Gómez-Puyou and Diego González-Halphen for the review of the manuscript and Irma Bernal-Lugo for helpful discussions on this work. They thank Consuelo Enriquez-Arredondo for excellent technical assistance. The technical support of Laurel Fabila Ibarra is also recognized. This work was supported by Grants 4836-N9406 from CONACyT and IN206691 from DGAPA, UNAM, Mexico. S.S.N. has a fellowship by DGAPA, UNAM.

References

- [1] A.M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber, *The Germination of Seeds*, Pergamon Press, Oxford, 1989, pp. 111–173.
- [2] J.D. Bewley, M. Black, *Seeds: Physiology of Development and Germination*, Plenum, New York, 1994, pp. 147–197.
- [3] J.D. Bewley, Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage, in: M.B. McDonald, C.J. Nelson (Eds.), *Physiology of Seed Deterioration*, CSSA, Madison, 1986, pp. 27–45.
- [4] L.M. Crowe, J.H. Crowe, Hydration-dependent phase transitions and permeability properties of biological membranes, in: A.C. Leopold (Ed.), *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*, Comstock Publishing Associates, Ithaca, 1986, pp. 210–229.
- [5] F. Bruni, A.C. Leopold, Hydration, protons and onset of physiological activities in maize seeds, *Physiol. Plant.* 81 (1991) 359–366.
- [6] J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.* 54 (1992) 579–599.
- [7] O. García-Rubio, S. Sánchez-Nieto, C. Enriquez-Arredondo, J. Sepulveda, A. Carballo, M. Gavilanes-Ruiz, Structural and biochemical changes in the plasma membrane from dry and imbibed embryos, in: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong (Eds.), *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, Vol. 30, 1997, pp. 499–505.
- [8] R. Serrano, Plasma membrane ATPase, in: C. Larsson, I.M. Møller (Eds.), *The Plant Plasma Membrane*, Springer, Berlin, 1990, pp. 127–153.
- [9] D.P. Briskin, J.B. Hanson, How does the plant plasma membrane H⁺-ATPase pump protons?, *J. Exp. Bot.* 43 (1992) 269–289.
- [10] B. Michelet, M. Boutry, The plasma membrane H⁺-ATPase, *Plant Physiol.* 108 (1995) 1–6.
- [11] L.E. Williams, S.J. Nelson, J.L. Hall, Characterization of solute/proton cotransport in plasma membrane vesicles from *Ricinus* cotyledons, and a comparison with other tissues, *Planta* 186 (1992) 541–550.
- [12] T.J. Buckhout, Kinetic analysis of plasma membrane sucrose-H⁺ symporter from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves, *Plant Physiol.* 106 (1994) 991–998.
- [13] D.R. Bush, Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 513–542.
- [14] D.R. Bush, T.J. Chou, L. Chen, Molecular analysis of plant sugar and amino acid transporters, *J. Exp. Bot.* 47 (1996) 1205–1210.
- [15] A. Hager, G. Debus, H.G. Edel, H. Stransky, R. Serrano, Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase, *Planta* 185 (1991) 527–537.
- [16] D.L. Rayle, R.E. Cleland, The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well, *Plant Physiol.* 99 (1992) 1271–1274.
- [17] A. Kurkdjian, J. Guern, Intracellular pH: measurement and importance in cell activity, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 271–303.
- [18] E. Gout, R. Bligny, R. Douce, Regulation of intracellular pH values in higher plant cells, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13903–13909.
- [19] N. Belfagna, G. Romani, Suitability of *Arabidopsis* for studies on intracellular pH regulation: correlation between H⁺ pump activity, cytosolic pH and malate level in wild-type and in a mutant partially insensitive to fusicoccin, *Plant Cell. Environ.* 17 (1994) 681–690.
- [20] S. Sánchez-Nieto, O. García-Rubio, F. Pacheco-Moiaés, A. Carballo, R. Rodríguez-Sotres, M. Gavilanes-Ruiz, Purification of plasma membranes from dry maize embryos, *Physiol. Plant.* 101 (1997) 157–164.
- [21] H.J. Phillips, Dye exclusion test for cell viability, in: P.F. Kruse, M.K. Patterson (Eds.), *Tissue Culture: Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1973, pp. 406–407.
- [22] C. Larsson, M. Sommarin, S. Widell, Aqueous two-phase system, in: H. Walter, G. Johansson (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 288, Academic Press, San Diego, CA, 1994, pp. 451–469.
- [23] F. Johansson, M. Sommarin, C. Larsson, Rapid purification of the plasma membrane H⁺-ATPase in its non-activated form using FPLC, *Physiol. Plant* 92 (1994) 389–396.
- [24] S. Sánchez-Nieto, R. Rodríguez-Sotres, P. González-Romo, I. Bernal-Lugo, M. Gavilanes-Ruiz, Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize line of high or low vigour, *Seed. Sci. Res.* 2 (1992) 105–111.
- [25] R. Rodríguez-Sotres, R.A. Muñoz-Clares, Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase, *Arch. Biochim. Biophys.* 276 (1990) 180–190.
- [26] S.R. Gallager, R.T. Leonard, Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots, *Plant Physiol.* 60 (1982) 1335–1340.
- [27] P. González-Romo, S. Sánchez-Nieto, M. Gavilanes-Ruiz, A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration, *Ann. Biochem.* 200 (1992) 235–238.
- [28] A. Carnelli, M.I. de Michellis, F. Rasi-Caldogno, Plasma membrane Ca-ATPase of radish seedlings. I Biochemical characterization using ITP as a substrate, *Plant Physiol.* 98 (1992) 1196–1201.
- [29] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*, John Wiley and Sons, New York, 1993, pp. 884–926.
- [30] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anat. Biochem.* 83 (1977) 346–356.
- [31] R. Serrano, C. Montesinos, J. Sánchez, Lipid requirements of the plasma membrane ATPases from oat roots and yeast, *Plant Sci.* 56 (1988) 117–122.
- [32] M.G. Palmgren, M. Sommarin, Lysophosphatidylcholine

- stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles, *Plant Physiol.* 90 (1989) 1009–1014.
- [33] A. Olsson, F. Johansson, M. Sommarin, C. Larsson, Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H⁺-ATPase, *Plant J.* 8 (1995) 959–962.
- [34] M.G. Palmgren, C. Larsson, M. Sommarin, Proteolytic activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A₂, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13423–13426.
- [35] M.G. Palmgren, M. Sommarin, R. Serrano, C. Larsson, Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20470–20475.
- [36] A. Grandmoungin-Ferjani, I. Schuler-Muller, M. Hartmann, Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipid, *Plant Physiol.* 113 (1997) 163–174.
- [37] A.A. Powell, S. Mathews, The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition, *J. Exp. Bot.* 29 (1978) 1215–1229.
- [38] S. Attuci, J.P. Carde, P. Raymond, V. Saint-Ges, A. Spiteri, A. Pradet, Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds, *Plant Physiol.* 95 (1991) 390–398.
- [39] M. Ehrenshaft, R. Brambl, Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize, *Plant. Physiol.* 93 (1990) 295–304.
- [40] C. Pérez, B. Mitchelet, V. Ferrant, P. Bogaerts, M. Boutry, Differential expression within a three gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana glauca*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1204–1211.
- [41] S. Puntarulo, A. Boveris, Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes, *Plant Sci.* 68 (1990) 27–32.
- [42] M.G. Palmgren, G. Christensen, Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3027–3033.
- [43] R. Serrano, F. Portillo, Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H⁺-ATPase studied by directed mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1018 (1990) 195–199.
- [44] A.P. Bidway, L. Zhang, R.C. Bachmann, J.Y. Takemoto, Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin. Stimulation of red beet plasma membrane ATPase activity, *Plant Physiol.* 83 (1987) 39–43.
- [45] G.E. Schaller, M.R. Sussman, Phosphorylation of the plasma-membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase, *Planta* 173 (1988) 509–518.
- [46] P. Erasó, F. Portillo, Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose interaction between domains and identification of new regulatory sites, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10393–10399.
- [47] L.E. González de la Vara, G. Medina, Phosphorylation by inorganic phosphate of the plasma membrane H⁺-ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.), *Plant Physiol.* 94 (1990) 1522–1527.
- [48] K. Kasamo, Y. Sakibara, The plasma membrane reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids, *Plant Sci.* 111 (1995) 117–131.
- [49] R.H. Andrianarison, J.L. Beneytout, Appearance of a new lipoxygenase isozymes during seedling germination of *Vicia sativa*, *Plant Sci.* 87 (1992) 143–150.
- [50] M.G. Palmgren, M. Sommarin, P. Ulvskov, C. Larsson, Effect of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1021 (1990) 133–140.
- [51] E. Gomes, X. Venema, F. Simon-Plas, M.L. Milat, M.G. Palmgren, J.P. Blein, Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme?, *FEBS Lett.* 398 (1996) 48–52.
- [52] Y. Jin, J.L. Bennetzen, Integration and non-random mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the BSI retroelement of maize, *Plant Cell* 6 (1994) 1177–1186.
- [53] I. Frias, M.T. Caldeira, J.R. Pérez-Castifeira, J.P. Navarro-Aviñó, F.A. Culiñez-Maciá, O. Kupping, H. Stranky, M. Pagés, A. Hager, R. Serrano, A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles, *Plant Cell* 8 (1996) 1533–1544.
- [54] C. Horvath (Ed.), High Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives, Vol. III: HPLC of Nucleic Acid Fragment, Proteins, Peptides, Effects of the Mobile Phase, Academic Press, New York, 1980.
- [55] N.N. Ewing, A.B. Bennet, Assessment of number and expression of P-type H⁺-ATPase genes in tomato, *Plant Physiol.* 106 (1994) 547–557.
- [56] B. Michelet, M. Lukaszewicz, V. Dupriez, M. Boutry, A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of translational regulation, *Plant Cell* 6 (1994) 1375–1389.
- [57] L. Moriau, J. Bogaerts, L. Jonniaux, M. Boutry, Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Nicotiana glauca*, *Plant Mol. Biol.* 21 (1993) 955–963.

V.2 Propiedades cinéticas de la ATPasa de H⁺ de embriones de maíz secos y embebidos 5 horas en una fracción de membranas plasmáticas y en una preparación solubilizada. (Enviado a *Biochim. Biophys. Acta*).

Resumen del trabajo

Para explorar el papel del medio anfipático en las propiedades de la ATPasa, se determinaron y compararon sus parámetros cinéticos, tanto en las membranas nativas de los embriones con 0 y 5 horas de imbibición, como después de su solubilización y restauración con fosfolípidos de frijol soya. Además, se midieron algunas propiedades de la porción lipídica de la membrana plasmática, en los embriones embebidos 0 y 5 horas.

Las curvas obtenidas de la actividad de la ATPasa de los embriones embebidos 0 y 5 horas a diferentes concentraciones de sustrato y manteniendo constante la concentración de Mg²⁺ libre a 35 μM (ver Resultados Complementarios Sección V.3.5), no mostraron el típico comportamiento Michaeliano, anteriormente reportado para la enzima (Briskin *et al.* 1992; De Michelis y Spanswick 1986; O'Neill y Spanswick 1984; Serrano 1990), sino que el mejor ajuste de los datos experimentales se obtuvo con el modelo de Hill. Ambas curvas mostraban cooperatividad negativa ($n=0.45 \pm 0.2$ y 0.5 ± 0.2 para la enzima de 0 y 5 horas de imbibición respectivamente).

La detección de cooperatividad negativa en una actividad enzimática se puede explicar por la presencia de una enzima con más de un sitio para el sustrato, o a la existencia de más de una enzima en la preparación enzimática que catalice la misma reacción. En cuanto a esta última posibilidad, nosotros habíamos comprobado que en nuestra preparación de vesículas de membrana plasmática existían dos actividades de enzimas que hidrolizan ATP, una actividad del 85% sensible a Na₃VO₄ y un 15% restante que correspondía a la actividad de la ATPasa mitocondrial, pero dado que siempre incluimos en el medio de reacción 2 mM de NaNa₃ la actividad de la ATPasa mitocondrial como interferencia puede descartarse (Ver apéndice A). Otro candidato probable de existir en la preparación sería una ATPasa que fuera sensible a VO₄³⁻, que podría ser la ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática, se determinó la actividad de ITPasa dependiente de calcio en las dos preparaciones membranales (0 y 5 horas), encontrándose que tanto a 0 como a 5 horas los valores de actividad de ITPasa eran muy bajos y similares (0.8 and 1.1 nmol Pi mg⁻¹min⁻¹ para 0 y 5 horas respectivamente), comparados con los de la actividad de ATPasa que fueron de 17.3 y 17.8 nmol Pi mg⁻¹min⁻¹ para la enzima de 0 y 5 horas respectivamente. Con estos resultados corroboramos que la actividad de hidrólisis de ATP se debía a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y no a la ATPasa de calcio.

La posibilidad de que la enzima tuviera dos sitios catalíticos que produjeran el fenómeno de cooperatividad es también muy poco probable, ya que según la

secuencia de aminoácidos del único polipéptido de la enzima, solo hay un sitio de unión para ATP.

Habiendo considerado lo anterior y que en la literatura se encontraban tres reportes que indicaban la presencia de cooperatividad (Ramos *et al.* 1994; Roberts *et al.* 1995; Roberts y Beauge 1997), se ajustaron los datos experimentales a una ecuación que plantea la velocidad total observada como la suma de dos componentes enzimáticos en la preparación (sitios o enzimas); con este modelo los datos experimentales se ajustaron satisfactoriamente, obteniéndose dos componentes para cada preparación membranal (0 y 5 horas): uno de baja afinidad y otro de alta afinidad. Solo el componente 1, el de baja afinidad por ATPHMg, exhibió un valor de K_m similar al que se ha reportado para la enzima que presentó una cinética Michaeliana (K_m 775 y 560 μM para 0 y 5 horas respectivamente), mientras que la K_m del componente 2 fue extremadamente baja pero similar a la de la enzima que se reportó con cinética cooperativa (Ramos *et al.* 1994; Roberts *et al.* 1995; Roberts y Beauge 1997).

Por otra parte, ya que en la secuencia de aminoácidos de la enzima solo se ha encontrado un sitio de unión para ATP, los resultados anteriores podrían explicarse si existiera una asociación asimétrica de dos monómeros para producir una enzima con dos sitios catalíticos, cada uno con afinidades distintas por ATP.

En cuanto a la comparación de las V_{max} de la enzima en las membranas nativas de 0 y 5 horas de imbibición, se encontró que solamente la V_{max} del componente 2 era significativamente diferente: 1.7 veces mayor la V_{max_2} de la enzima de 0h comparada con la V_{max_2} de 5h. Lo cual sugiere que aún cuando hay diferencias estructurales entre estas dos enzimas, la o las modificaciones no tienen un impacto notable en las propiedades cinéticas de la enzima y probablemente se necesite un factor adicional para explicar los cambios en la sensibilidad de las dos enzimas a los diferentes factores probados anteriormente (pH, LPC, VO_4^{3-} y temperatura).

Considerando que el ambiente membranal es un factor importante que puede alterar la actividad y la cinética de la ATPasa. Se procedió a sustituir el ambiente lipídico nativo solubilizando a la ATPasa con detergente (fracción solubilizada) y suplementando parte de esta fracción con dodecil- β -maltosido y asolectina (fracción restaurada). Las curvas de actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato se sometieron a varios modelos matemáticos para obtener el mejor ajuste de los datos experimentales y entonces se determinaron los parámetros cinéticos de cada una de las preparaciones.

La actividad de la ATPasa en la fracción solubilizada nuevamente se ajustó al modelo de dos componentes enzimáticos, sin embargo uno de estos componentes presentó un comportamiento michaeliano con una K_m baja por ATP, mientras que el otro componente presentó cooperatividad positiva y una baja afinidad por el sustrato. Una posible explicación es que la concentración de detergente utilizada en

la solubilización no haya sido suficiente para solubilizar a toda la enzima que se encontraba asociada formando el probable dímero, por lo que aún encontramos un componente con comportamiento cooperativo.

Por otra parte, en la fracción restaurada con fosfolípidos de soya sólo se logró encontrar un componente, el cual expresó una afinidad intermedia comparada con la afinidad de los componentes encontrados en las VMP y la fracción solubilizada, además de mostrar cooperatividad positiva, la cual puede ser explicada si se propone que hay formación nuevamente del dímero, pero que esta nueva interacción entre los monómeros es diferente a la que se presentó en las membranas nativas, o a la de la enzima solubilizada sin restaurar.

El modelo planteado sobre la asociación monómero-moñómero, no solamente se apoya en la información aquí presentada, sino también en evidencias de que la enzima en estado nativo podría encontrarse formando un dímero (Briskin et al. 1985; Briskin y Niesman-Reynolds 1989), además de que la modificación del medio anfipático puede inducir cambios en la cinética de la enzima (Ramos *et al.* 1994; Roberts *et al.* 1995) y por último en que la enzima es altamente sensible a cambios en los fosfolípidos membranales (Palmgren *et al.* 1991; Kasamo *et al.* 1995).

Por otra parte, se observó que la V_{max} del Componente 1 de la fracción solubilizada de los embriones sin embeber (componente correspondiente al dímero) es cuatro veces mayor que la V_{max} del componente 1 de 5 horas. Mientras que en la fracción restaurada no se detectaron diferencias en las constantes cinéticas de la enzima de 0 y 5 horas. Lo anterior sugiere que el medio anfipático que rodea a la enzima influye en sus propiedades catalíticas, ya que no son suficientes las diferencias estructurales que existen entre la enzima de 0 y 5 horas para que la enzima respectiva, presente propiedades catalíticas distintas cuando el medio anfipático que la rodea es similar.

Por lo tanto, el medio anfipático nativo podría influir en las diferencias que se encontraron en la enzima de 0 y 5 horas cuando se probaron la adición de lisofosfatidilcolina, tripsina, el efecto del pH y las temperaturas de desnaturalización (Artículo del Capítulo V.1)

Con el objeto de detectar posibles diferencias en las membranas plasmáticas de los embriones con 0 y 5 horas de imbibición, se determinaron tanto el contenido de radicales libres, como los niveles de dienos conjugados que son productos de la lipoperoxidación. Se hicieron estas determinaciones porque se sabe que durante la imbibición la semilla experimenta un estrés oxidativo, el cual puede afectar a los fosfolípidos de la membrana.

Los niveles de radicales libres en las VMP de los embriones embebidos 5 horas fueron 2 veces más altos que en las VMP de los embriones sin embeber, sin embargo los niveles de lipoperoxidación son similares en ambas preparaciones

membranales. Una explicación a estos resultados es que ambas semillas presenten diferencias en los mecanismos de detoxificación de los radicales libres.

Sin embargo, un indicio inequívoco de que hay diferencias en la composición de las membranas plasmáticas se obtuvo al determinar algunos de los fosfolípidos membranales: fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. La cantidad total de los cuatro fosfolípidos medidos en las membranas plasmáticas de los embriones fue de 389 para las membranas de 0h y 200 nmolPi/ mg de proteína para las VMP de 5h. En cuanto a las proporciones de los cuatro fosfolípidos medidos en las VMP de los embriones embebidos 0 y 5 horas se encontraron diferencias importantes. En las membranas plasmáticas de los embriones secos se detectó 6 y 3 veces más fosfatidilserina y fosfatidilinositol respectivamente, comparada con la cantidad de estos fosfolípidos en las membranas plasmáticas de los embriones embebidos 5 horas. Mientras que se detectó aproximadamente 2 veces menos fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en la preparación membranar de los embriones secos comparada con la fracción membranar de los embriones embebidos 5 horas. Estos resultados indican que al inicio de la germinación hay un cambio en la composición de fosfolípidos de la membrana, producto probablemente de las actividades de síntesis y de degradación de lípidos.

Los resultados obtenidos sugieren que el cambio en el ambiente anfipático de 0 a 5 horas de imbibición, conduce a una modificación importante en el comportamiento cinético de la enzima.

KINETIC PROPERTIES OF THE H⁺-ATPase IN A PLASMA MEMBRANE FRACTION
AND IN A SOLUBILIZED PREPARATION FROM DRY AND 5 HOURS IMBIBED MAIZE
EMBRYOS

Sobeida Sánchez-Nieto¹, Rogelio Rodríguez-Sotres¹, Rolando Hernández-Muñoz²,
Marietta Tuena de Gómez-Puyou², Aquiles Carballo³ and Marina Gavilanes-Ruiz¹.

¹Departamento de Bioquímica. Facultad de Química, Conjunto E. UNAM. Cd
Universitaria, 04510. México, D.F. México

²Departamento de Genética Molecular. Instituto de Fisiología Celular. UNAM. Cd
Universitaria, 04510 México, D.F. México

³ Centro de Botánica. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México, México

Corresponding author:

Marina Gavilanes-Ruiz.

Depto. de Bioquímica.

Facultad de Química, Conj. E.

UNAM

Cd. Universitaria, Coyoacán

04510 México, D.F. México

Mexico

Tel Nu. (525) 6225275

Fax Nu. (525) 6225329

E-mail: gavilan@servidor.unam.mx

Abstract

In an earlier work, we found different sensitivities of the plasma membrane H^+ -ATPase activity to vanadate, pH, thermal denaturation, trypsin and lysophosphatidylcholine in vesicles from non-imbibed and 5 h imbibed embryos. We also purified the enzyme by anion-exchange chromatography and found that the peak of ATPase activity from dry seed was eluted at different time than that from the 5 h imbibed seed. These results could be explained through a covalent modification of the enzyme (dephosphorylation-phosphorylation or proteolysis) or through differences in the amino acid sequences or the influence of the surrounding membrane environment. In order to examine the nature of these differences, in this work we compared the kinetic parameters of these enzyme preparations and determined some properties of the native membrane. We found negative cooperativity curves for ATPase activity for both membrane preparations with low and high K_m components. In the two preparations, the two components or sites persisted after solubilization of the enzyme with dodecyl- β -D-maltoside; however, the kinetic patterns were more complex. When we added soybean phospholipids to the solubilized enzyme, one component with positive cooperativity was observed. Contrasting the kinetics parameters between 0 and 5 hours in the different fractions we only detect significant differences on the V_{max2} of the native membranes and in the V_{max1} on the solubilized fraction. On the other hand, the native membrane from 5h showed 2 fold more production of free radicals than that at 0h, but the lipid peroxidation was similar for both preparation. However, the content of phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine on the plasma membrane from dry seed were different from the 5 hours imbibed embryos. The results could be interpreted as showing the enzyme in the native membrane acquires a dimeric conformation generating two binding sites with different affinity for ATP, and the lipid environment can alter the kinetic parameters of the enzyme through changes in monomer interaction.

Abbreviations and symbols

Btp	1,3-bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]propane)
FPLC	fine performance liquid chromatography
Mops	3(N-morpholino)propanesulfonic acid
C ₁₄ E ₈	polyoxoethylene 8 myristyl ether
PS	phosphatidylserine
PI	phosphatidylinositol
PE	phosphatidylethanolamine
PC	phosphatidylcholine

1. Introduction

Enzymes have multiple ways for regulating their activity. Such regulation is important in the adjustment of catalytic rates to physiological demands. Common mechanisms that modulate activity are covalent modification of the primary structure of the enzymes (proteolysis, phosphorylation, etc.), changes in the primary structure itself (differential expression of isoforms), alterations in the transcription rate of the genes coding the enzymes, changes in the oligomeric state of multimeric enzymes, and variations in the lipid environment in the case of membrane proteins [1,2].

The plasma membrane H^+ -ATPase is an essential enzyme for the plant. It hydrolyzes ATP to cover the energy cost required for pumping H^+ from the cytosol to the apoplasmic space. It also generates an electrochemical gradient that is used to drive processes such as secondary transport, cell enlargement, stomata opening and regulation of the apoplast and cytoplasmic pH [3,4].

The function of this enzyme can be modulated by different factors including phytohormones, fungal toxins, lipids and phosphorylation [3,5], some of which are thought to act through an interaction with the autoinhibitory carboxy terminal region of the enzyme [5-8]. In addition, it has been found that several mRNAs which code for isoforms of the H^+ -ATPase are differentially expressed in tissues and developmental stages of the plant [9-13]. Taking into account its physiological role and the series of complex physiological processes that germination involves for the embryo cells [14], a display of several strategies to control the enzymatic activity of the plasma membrane H^+ -ATPase is expected.

In a preceding work [15], we found that plasma membrane H^+ -ATPase activity from dry maize embryos had different sensitivities to pH, vanadate, trypsin, lysophosphatidylcholine and thermal denaturation as compared to the analogous activity from embryos imbibed for 5h. This led us to propose that the two different activities represent enzymes that are distinct in their amino acid sequence, covalent modification or in their surrounding membrane environment. Using 0 and 5 hours imbibed embryos, we purified the ATPase activity by anion-exchange chromatography, and we found two symmetrical, close but no overlapping peaks. The aim of the present work was to determine if the differences found between the activities, at the times tested during embryo imbibition, were due to the presence of two different forms of the plasma

membrane H⁺-ATPase, or to a different membrane environment. The approaches used here were to determine the kinetic constants of the ATPase activity in plasma membrane vesicles, in the detergent-solubilized enzyme, and in a detergent-phospholipid mixture, from 0 and 5h imbibed embryos. We also measured some lipid phase properties, such as free radicals, lipid peroxidation and the content of four phospholipids of the plasma membranes isolated from dry and 5h-imbibed embryos.

2. Materials and methods

2.1 *Biological material.*

Maize embryos were manually dissected from mature, dry seeds (*Zea Mays L. cv. Montecillos A₆O₂*, Montecillo, Colegio de Posgraduados Edo. de México). The germination tests showed 90% of viability assessed by radicle protrusion or by the trypan blue test [16].

2.2 *Imbibition.*

Embryos or seeds were sterilized with 2% NaClO for 2 min, then rinsed 2 times with distilled water. The embryos were imbibed for 5 h and the seeds for 72 h at 29°C on wet filter paper. At the indicated times the embryos were frozen with liquid N₂, while the roots were excised from the maize plantlet and then frozen with liquid N₂. Both tissues were stored at -70°C until use.

2.3 *Preparation of the microsomal fraction of maize roots.*

The microsomal fraction of maize roots was obtained by differential centrifugation as described by Sánchez-Nieto *et al.* [17].

2.4 *Preparation of plasma membrane vesicles.*

The enriched plasma membrane fraction (PMF) from 0 and 5 h imbibed embryos was obtained by the aqueous polymer two-phase partitioning system described by

Larsson [18] and modified by Sánchez-Nieto *et al.* [17]. All procedures were performed at 4°C. Aliquots of the membrane preparation were immediately frozen and kept at -70°C until use.

2.5 Solubilization.

The procedure was performed according to Johansson *et al.* [19] with the modifications described in Sánchez-Nieto *et al.* [15]

2.6 Lipid activation of the H⁺-ATPase.

Soybean phospholipids were added to restore the ATPase activity lost during the purification of the H⁺-ATPase [19]. A solution containing 10 mM Mops/Btp pH 7.0, 5% (v/v) glycerol, 0.1mM DTT (dithiothreitol), 2mg/ml azolectin and 2mg/ml dodecyl-β-D-maltoside was mixed with an equal volume of the column eluate or the supernatant of the dodecyl-β-D-maltoside solubilization, and the mixture was incubated for 8 min at room temperature before ATPase activity measurements.

2.7 ATP hydrolytic activity.

This was measured by Pi release by the method described by González *et al.* [20]. The reaction mixture of the hydrolytic activity (150μl) contained 250mM sucrose, 20 mM Mops/Btp pH 7.0, 7μM CCCP (carbonylcyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone), 2mM NaN₃ (to inhibit traces of the contaminant mitochondrial ATPase), 100μM (54μg/ml) egg lysophosphatidylcholine (type I, Sigma Chemicals). ATP/Btp pH 7.0 and MgCl₂ were added to a concentration of 0.05 to 8.11mM ATPMg and the free Mg²⁺ was kept constant at 35μM. The calculation of the concentrations of ATP and MgCl₂ necessary to obtain the desired concentration of the substrate complex and free Mg²⁺ were done as in Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares [21], and the stability constants used were the same as in O'Sullivan and Smitters [22]. The reaction was started by the addition of 3.3 μg of protein, and after 3h at 30°C, the reaction was stopped by the addition of SDS (12% final). The activity was assayed in single experiments by triplicate determinations and was

done with at least three different membrane preparations. All repetitions for each independent experimental point were considered when fitting to the various kinetic models. When means and standard deviations (4-8%) were calculated before the fit was performed, the results were basically the same.

Data analysis of ATP hydrolysis was made with non-linear regression algorithms implemented in the software package Origin (Microcal Software, Inc. Northampton Ma, USA) by fitting the experimental points to the following equations:

Hill model:

Equation 1

$$v = V_m [ATPHMg]^n / (S_{0.5}^n + [ATPHMg]^n)$$

Two enzymatic components with Michaelis kinetics:

Equation 2

$$v = V_{M1} [ATPHMg] / (K_{m1} + [ATPHMg]) + V_{M2} [ATPHMg] / (K_{m2} + [ATPHMg])$$

Two enzymatic components, the first with Michaelis kinetics and the second with cooperativity kinetics:

Equation 3

$$v = V_{M1} [ATPHMg] / (K_{m1} + [ATPHMg]) + V_{M2} [ATPHMg]^n / (S_{0.5}^n + [ATPHMg]^n)$$

Where v is the initial velocity, V_m , V_{M1} and V_{M2} are the maximum velocities, K_{m1} and K_{m2} are the Michaelis constants for the first and the second enzymatic component respectively. $S_{0.5}$ is the half-saturating ATPHMg concentration, and n the Hill number.

2.8 Protein determination.

The protein content was estimated according to Peterson [23] using bovine serum albumin as standard.

2.9 Assay for lipid peroxidation and free radicals.

Free radicals production was detected on 60 μg of plasma membrane protein in duplicate samples by a technique based on luminol chemiluminiscence [24]. The presence of conjugated dienes as a product of lipid peroxidation was detected by their absorption in the ultraviolet range (233nm) as described by Recknagel and Glende [25], using 1.5 mg of membrane protein for each assay.

2.10 Phospholipid determination.

The amounts of phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on the plasma membrane vesicles from 0 and 5 hours imbibed embryos were determined by the method of Garcia-Sainz and Fain [26].

3. Results

3.1 Kinetics of H^+ -ATPase from plasma membrane preparations.

In order to compare the kinetic constants of the vanadate-sensitive ATPase activity in the embryos imbibed 0 and 5 h, we measured rates of ATP hydrolysis as a function of ATPMg concentrations. The curves for membrane preparations from both times of imbibition did not exhibit a typical Michaelis-Menten kinetics (Fig 1A), as clearly shown by the Lineweaver-Burk plots (Fig. 1A, inset). Moreover, the shapes of the curves are typical of negative cooperativity [27]. When data were fitted to the Hill model (equation 1), a reasonable fit was obtained (Fig. 1A). The plasma membrane preparations from dry embryos and 5 h imbibed embryos exhibited Hill numbers of 0.45 ± 0.2 and 0.5 ± 0.2 respectively, which are indicative of negative cooperativity. In contrast, the ATP hydrolytic activity from maize root shows typical Michaelis kinetics (Fig.1B), with a linear fit in a double reciprocal plot (Fig 1B, inset).

There are reports of the existence of negative cooperativity in the plant plasma membrane ATPase [28,29], and this has been explained on the basis of two catalytic sites or the mixture of two different enzymes. Therefore, we fit our data in a model where the total velocity was expressed as the sum of two enzymatic components both with Michaelis-Menten kinetics. The fit of the data was as good as that obtained with the Hill

model, and provided the kinetic parameters for the two possible components in each type of embryo preparation (Table 1). Components 1 from 0 and 5 h preparations were very similar in K_m and V_{max} values, while Components 2 from 0 and 5 h were different. However, the major difference was found in contrasting K_m values from Components 1 against K_m values from Components 2 in both preparations (0 and 5 h activity). In Component 2, K_m values were 136-fold and 467-fold lower than the respective values obtained for Component 1 in both preparations. These results suggested that there were a low and a high affinity sites for ATPHMg in membrane preparations from both 0 and 5 h imbibed embryos.

3.2 Kinetics of H^+ -ATPase activity from solubilized fractions.

Ramos *et al.* [28] and Roberts *et al.* [29] have reported that the cooperative behavior of the plant plasma membrane ATPase is modified by the lipid environment. Since germinating seeds have an active metabolism, involving turnover of structural components of the cell [14], we tested this possibility in our membrane preparations. We solubilized the enzyme from membranes from embryos imbibed 0 or 5 h using the procedure developed by Johansson *et al.* [19]. The rationale behind this was that the solubilization procedure could eliminate the differences between 0 and 5 h preparations by removal of the different membrane lipids surrounding the enzyme. The data from those experiments were analyzed with several kinetic models, but the best fit was obtained when we included in the model two components (enzymes or sites) (Fig. 2A, 2B): one component showed a positive cooperativity and the second component showed hyperbolic kinetics. The kinetic parameters are presented in Table 2. The existence of two components in the solubilized preparation at every imbibition time persisted, however, the low affinity components (Components 1) showed differences. Only the K_m of the solubilized enzyme from 5 h was similar to the corresponding value in the native membrane (see Table 1; 461 and 560 μM respectively). On the other hand, the K_m value from the solubilized enzyme of 0 h was about 2-fold higher than that of the enzyme in the native membrane. At 5h, the V_{max} of the solubilized enzyme was 1.9-fold higher than the activity from the native membranes. In contrast, Components 2 (high affinity site) were no longer different in terms of $S_{0.5}$ and were approximately 2 and 10-fold higher than the K_m values from the non-solubilized enzyme of 0 and 5 h, respectively. Surprisingly, in this

case Component 2 exhibited positive cooperativity in both solubilized preparations, although it was stronger in the non-imbibed embryos. All these differences indicate that the exchange of native lipids for detergent molecules affected the kinetic properties of the enzyme, and that the positive cooperativity in this component could be due to different amphipatic surroundings, a different oligomeric state or changes in the regulatory domain located in the carboxy terminus of the enzyme [28-30].

3.3 Kinetics of H^+ -ATPase activity from solubilized-restored fractions.

When the solubilized enzyme activity from embryos at 0 and 5 h of imbibition were supplemented with soybean phospholipids, as described by Johansson *et al.* [19], the enzyme exhibited a unique component with positive cooperativity for both imbibition times (see SOL-RES in Fig. 2A, 2B and Table 2). The kinetic constants of this component were practically identical for both preparations. From a comparison of the K_m figures from the preparation of native membranes (Table 1) or solubilized enzyme (Table 2), with the K_m values obtained in the preparation of the solubilized and lipid-treated enzyme, it is apparent that the latter preparation contained a component similar to the low affinity site but with positive cooperativity ($n=1.43$ and 1.52 for 0 and 5 h, respectively). The multiple changes in the kinetic behavior of the activity reflect the high dependence of the enzyme on the lipid environment.

3.4 Free radicals and lipoperoxidation production of plasma membrane vesicles.

Since the major differences found in the ATPase activity are related to residence in the native membranes, we measured some lipid properties of the plasma membrane vesicles from 0 and 5h imbibed embryos (Table 3). We found that plasma membrane vesicles from 5 h had double the production of free radicals compared to the plasma membranes of non imbibed embryos. However, the lipoperoxidation rates detected as conjugated dienes were similar in both preparations. The lack of correlation between free radicals and lipoperoxidation could be due to different levels of antioxidant systems in the embryo at the two imbibition times (0 and 5h).

3.5 Phospholipid content of the plasma membranes from 0 and 5 hours imbibed embryos.

The total phospholipid content was two-fold higher for dry seed than the 5 hours imbibed embryos, and the two plasma membrane preparations showed large differences in the relative proportions of the four phospholipids measured (Table 4). The plasma membrane from non-imbibed embryos showed markedly higher content of phosphatidylserine and phosphatidylinositol (48.6 and 34.5% respectively) compared with the amount of these two phospholipids in the plasma membranes from 5 h imbibed embryos, that is 15.5% PS and 20.7% PI. The content of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine were at half the levels in the non-imbibed embryos compared with the 5 hours imbibed embryos. However the ratio of PC / PE for both membrane preparations were similar.

4. Discussion

The vanadate sensitive ATPases from membranes of non-imbibed and 5h-imbibed embryos differed in lysophosphatidylcholine sensitivity, thermal stability and pH dependence. The differences were explained in terms of variation in the structure of the enzyme due to covalent modification (dephosphorylation or phosphorylation or proteolysis) or to changes in the amino acid sequences (presence of isoforms) or the lipid composition. These types of regulation of the vanadate-sensitive H⁺-ATPase have been described in the literature [6,10-13, 31-34]. The phosphorylation of the enzyme by a calcium-dependent protein kinase [33] in the carboxy terminus of the enzyme has been documented in the calcium plasma membrane pump [35]. However, no evidence has been given for changes in the ATP affinity in the phosphorylated enzyme, but changes in the K_m and V_{max} were observed after the removal (*in vitro*) of the carboxy terminus, or after the expression of a truncated form of the plant ATPase in yeast. Similar changes can be elicited by the stimulation of the enzyme with lysophosphatidylcholine [6, 36, 37]

Our previous results using the MonoQ column showed a defined peak but the 0 and 5 h imbibition time samples exhibited different retention times, indicating the existence of different enzyme forms, which is consistent with the different behavior of the activity at varying pH, temperature, vanadate, trypsin and LPC concentrations [15].

When we measured the kinetic constants of the vanadate-sensitive ATPase activity from plasma membranes obtained from embryos imbibed 0 and 5h, we found two

components, a high ($K_m = 5.7$ and $1.2 \mu\text{M}$ for 0 and 5 h, respectively) and a low affinity ($K_m = 775$ and $560 \mu\text{M}$ for 0 and 5h, respectively). These two components were present in both preparations of embryos and the K_m values obtained were similar to those in earlier reports (high affinity $K_m = 1-16 \mu\text{M}$ and low affinity $K_m = 100-600 \mu\text{M}$) [28,29]. In addition, we found that the high affinity component differed in both membrane preparations (0 and 5 h), although these differences are not unequivocal since there are technical difficulties in measuring accurately ATP hydrolysis in $1-20 \mu\text{M}$ ATP concentration range.

A kinetic model of cooperativity involves the presence of, at least, two catalytic sites. Since the analysis of the primary structure of the H^+ -ATPase from plasma membrane contains only one ATP binding site [38,39], cooperativity could be explained by the association of two monomers, thus exhibiting two independent interacting catalytic sites (Figure 4A). Roberts *et al.* [29] have shown that changing the lipid surrounding the ATPase for soybean phospholipids results in a shift of positive cooperativity to negative behavior, or to a Michaelis pattern if the enzyme is solubilized in lysophosphatidylcholine. These data have been interpreted in terms of oligomeric interactions regulated by the lipid environment. Moreover, the composition of the surrounding amphipathic milieu of the enzyme has proved to have a strong influence on the activity of the plasma membrane ATPase [3,5,36,40-42].

There are evidences of incomplete membrane organization in non imbibed seed and the stress that occurs at the beginning of the water uptake to the embryo [43]. Although, the mechanisms of membrane structure repair and stabilization are unknown, an increase of N-acetylphosphatidylethanolamine concentration, a phospholipid with membrane stabilization properties, was detected during cotton seed imbibition [44]. In this work, we detected a decrease of about 6 and 3-fold in the content of phosphatidylserine and phosphatidylinositol from dry to 5 hours imbibed embryos and a increase of about two-fold in the phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine content from 0 to 5 hours imbibed embryos. These data imply that during this stage of development, the synthesis or repair activities of the membrane components occurs.

In this framework, it is possible that the differences found between the activities of 0 and 5h in the FPLC elution profiles could also be due to different membrane environments. Therefore, we measured the kinetic constants in the detergent solubilized enzymes. Solubilization of the enzyme from the membrane preparations of 0 and 5 h to

remove the native lipids produced complex ATPMg saturation curves which were better explained as two components: one with low affinity site, and the other with high affinity and a positive cooperativity behavior. The low affinity site differed in the two preparations tested, contrary to the low affinity site found in the native membranes, which was similar at both times of imbibition (Figure 4B). The possible existence of tightly bound lipids after the solubilization step can not be ruled out. The severe change that solubilization imposed on the lipid environment of these preparations indicates that the observed differences are a consequence of alterations of the enzyme molecule itself. However, contrary to our expectation, when we added phospholipids to the solubilized preparations, only the low affinity component with a positive cooperativity persisted. Likewise, the preparations of 0 and 5 h had similar kinetic constants. These data may be explained in terms of changes in the lipid environment of the enzyme, or may be due to loss of a component sensitive to one or more of the phospholipids present in the mixture employed to restore the enzyme (Figure 4C). The variety of kinetic curves displayed by the enzyme clearly indicates the high plasticity of the enzyme in response to changes in the amphipathic milieu, due to direct interactions of the enzyme with the lipids or the surrounding detergent. This may result from changes in protein-protein or domain-domain differential interactions. The possibility of monomer-monomer association is plausible, since the addition of the detergent and its replacement by phospholipids induces cooperative responses, which have been traditionally explained with models that involve multisite homotropic allostereism [27]. In agreement with this proposal, Briskin and Reynolds [30] showed that the molecular size of the red beet plasma membrane ATPase suffers dramatic changes following solubilization and reconstitution. This is supported by experiments of radiation inactivation analysis of the red beet plasma membrane H⁺-ATPase, which determined a native molecular size about 228 KDa [30,45].

Although, in previous work the native plasma membranes of embryos of 0 and 5 h of imbibition have different forms of the ATPase, in this work we detect small differences in the kinetic parameters of this enzyme in the native and solubilized preparations. We propose that at each time the differences in the amphipathic environment at 0 and 5 hours could also explain the differences in these kinetic parameters and the sensitivity of the enzyme to vanadate, LPC, pH dependence and temperature stability, because we were not able to detect differences in the kinetic parameters when the amphipathic medium that was surrounding the enzyme was similar.

We propose that the enzyme at each time of imbibition acquires a dimeric conformation, generating two binding sites with different affinities for ATP, although the enzyme could also exist as a monomer (see Figure 4). It is possible that the high affinity site has a physiological role at the beginning of germination, since in wheat seed the ATP content increases from 0.1 nmol ATP per dry embryo to 0.8 nmol per embryo after 24 h of imbibition and to 6 nmol after 6 days [46]. At longer times of imbibition, both catalytic sites could be operating. However, according to our earlier report [15], even at high ATP concentrations, it is possible to distinguish the 0 h and 5 h enzymes, on the basis of vanadate and LPC sensitivities, temperature stability and pH dependence. These facts suggest that the association of the monomers to a dimeric form in the native membrane induces the existence of 2 sites with different affinities, but this arrangement can also be expressed in response to different factors, including some that can be of physiological importance.

In conclusion, the different elution profiles reported earlier [15] for the ATPases preparations derived from the 0 and 5 h imbibed embryos could be interpreted in terms of covalent modifications of the enzyme molecule, since no differences could be detected between kinetic parameters of the 0 and 5h imbibed embryos. Nevertheless, the kinetics parameters found in the plasma membrane H^+ -ATPase and the amazing variety of kinetic responses induced in the enzyme preparations by alterations in the enzyme environment suggest a remarkable plasticity in the state of monomer association of the enzyme in the membrane.

Acknowledgments. Authors are indebted to Drs. Armando Gómez-Puyou and Diego González-Halphen for the review of the manuscript and Irma Bernal-Lugo for helpful discussions about this work. We thank Consuelo Enríquez-Arredondo for technical assistance. This work was supported by grants 4836-N9406 from CONACyT and IN206691 from DGAPA, UNAM, Mexico. SSN has a fellowship by DGAPA, UNAM.

5. References

- [1] D.M. Frambought, M.V. Lemas, K. Takeyasu, K.J. Renaud, E.M. Inman, Structural requirements for subunit assembly of Na⁺, K⁺-ATPase, *Curr. Top. Mem.* 41(1994) 45-69.
- [2] J.D. Watson, J. Tooze, D.T. Kurtz, *Recombinant DNA. A short course*, Scientific American Books, New York, 1983, pp. 1-10
- [3] R. Serrano, Plasma membrane ATPase, in: *The plant plasma membrane*, C. Larsson, I.M. Møller (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 1990, pp. 127-153.
- [4] D.P. Briskin, The plasma membrane H⁺-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function, *Biochim. Biophys. Acta* 1019 (1990) 95-109.
- [5] M.G. Palmgren, Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity, *Physiol. Plant* 83 (1991) 314-323.
- [6] M.G. Palmgren, M. Sommarin, R. Serrano, C. Larsson, Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20470-20475.
- [7] E. Gomès, K. Venema, F. Simon-Plas, M.L. Milat, M.G. Palmgren, J.P. Blein, Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS Lett.* 398 (1996) 48-52.
- [8] B. DeBoer, Fusicoccin- a key to multiple 14-3-3 locks?, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 60-66.
- [9] J.F. Harper, L. Manney, M.R. Sussman, The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds, *Mol. Gen. Genet.* 244 (1994) 572-587
- [10] G. Houlné, M. Boutry, Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase whose expression is restricted to anther tissues, *Plant J.* 5 (1994) 311-317
- [11] B. Michelet, M. Lukaszewicz, V. Dupriez, M. Boutry, A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of translational regulation, *Plant Cell* 6 (1994) 1375-1389.
- [12] L. Moriau, J. Bogaerts, L. Jonniaux, M. Boutry, Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Nicotiana plumbaginifolia*, *Plant Mol. Biol.* 21(1993) 955-963.

- [13]C. Pérez, B. Michelet, V. Ferrant, P. Bogaerts, M. Boutry, Differential expression within a three-gene family encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana glumbaginifolia*, J Biol. Chem. 267 (1992) 1204-1211.
- [14]A.M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber, The germination of seeds, Pergamon Press, Oxford, 1989, pp. 111-173.
- [15]S. Sánchez-Nieto, M. Tuena de Gómez-Poyou, R. Rodríguez-Sotres, A. Carballo, M. Gavilanes Ruíz, Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos, Biochim. Biophys. Acta 77475 (1998).
- [16]H.J. Phillips, Dye exclusion test for cell viability, in : P.F. Kruse, M.K. Patterson (Eds.), Tissue culture: Methods and applications, Academic Press, New York, 1973, pp. 406-407.
- [17]S. Sánchez-Nieto, O. García-Rubio, F. Pacheco-Moisés, A. Carballo, R. Rodríguez-Sotres, M. Gavilanes-Ruíz, Purification of plasma membranes from dry maize embryos, Physiol. Plant. 101 (1997) 157-164.
- [18]C. Larsson, M. Sommarin, S. Widell, Aqueous two-phase system, in: H. Walter, G. Johansson (Eds), Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA, 1994, vol 288 pp. 451-469.
- [19]F. Johansson, M. Sommarin, C. Larsson, Rapid purification of the plasma membrane H⁺-ATPase in its non-activated form using FPLC, Physiol. Plant. 92 (1994) 389-396.
- [20]P. González-Romo, S. Sánchez-Nieto, M. Gavilanes-Ruíz, A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration, Anal. Biochem. 200 (1992) 235-238
- [21]R Rodríguez-Sotres, R.A. Muñoz-Clares, Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase, Arch. Biochim. Biophys. 276 (1990) 180-190
- [22]W.J. O'Sullivan, G.W. Smithers, Stability constants for biologically important metal-ligand complexes, Methods Enzymol. 63 (1979) 294-336
- [23]G.L. Peterson. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable, Anal. Biochem. 83 (1977) 346-356.
- [24]E. Cadenas, S. Helmut, Low level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems, Methods Enzymol. 105 (1984) 221-231.

- [25] R.O. Recknagel, E.A. Glende, Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in Enzymol.* 105 (1984) 331-337.
- [26] J.A. García-Sainz, J.N. Fain, Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat cells, *Biochem. J.* (1980) 781-789.
- [27] I.H. Segel, *Enzyme kinetics, Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*, John Wiley & Sons, New York, 1993, pp. 346-464.
- [28] R.S. Ramos, M.T. Caldeira, P. Arruda, L. deMeis, The two K_m 's for ATP of corn-root H^+ -ATPase and the use of glucose-6-phosphate and hexokinase as an ATP-regenerating system, *Plant Physiol.* 105 (1994) 853-859.
- [29] G. Roberts, G. Berberían, L. Beaugé, Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H^+ -ATPase from higher plants, *Plant Physiol.* 108 (1995) 813-819.
- [30] D.P. Briskin, I. Niesman-Reynolds, Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution, *Plant Physiol.* 90 (1989) 394-397.
- [31] A.P. Bidwai, J.Y. Takemoto, Bacterial phytotoxin, syringomycin, induces a protein kinase-mediate phosphorylation of red beet plasma membrane polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7849-7851.
- [32] A.P. Bidwai, L. Zhang, R.C. Bachmann, J.Y. Takemoto, Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin syringomycin. Stimulation of red beet plasma-membrane ATPase activity. *Plant Physiol.* 83 (1988) 39-43.
- [33] G.E. Schaller, M.R. Sussman, Phosphorylation of plasma membrane H^+ -ATPase of oat roots by calcium-stimulated protein kinase, *Planta* 173 (1988) 509-518.
- [34] M.G. Palmgren, G. Christensen, Functional comparison between plant plasma membrane H^+ -ATPase isoforms expressed in yeast, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3027-3033.
- [35] P. James, M. Maeda, R. Fischer, A.K. Verma, J. Krebs, J.T. Penniston, E. Carafoli, Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} pump of human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2905-2910.
- [36] A. Olsson, F. Johansson, M. Sommarin, C. Larsson, Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H^+ -ATPase, *Plant J.* 8 (1995) 959-962.

- [37]B. Regenberg, J.M. Villalba, F.C. Lanfermeijer, M.G. Palmgren, C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁺-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane, *Plant Cell* 7 (1995) 1655-1666.
- [38]R. Serrano, Structure and function of plasma membrane ATPase, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 61-94
- [39]A. Wach, A. Schlessler, A. Goffeau, An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi and ciliate H⁺-ATPase genes, *J. Bioenerg. Biomem.* 24 (1992) 309-317.
- [40]D.T. Cooke, R.S. Burden, Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases, *Physiol. Plant* 78 (1990) 153-159
- [41]K. Kasamo, M. Wada, Phospholipid-specific activation of plasma membrane H⁺-ATPase, in: N. Murata, C.R. Somerville (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of membrane and storage lipids of plants. Current topics in plant physiology, an American Society of Plant Physiologists series*, 1993, Vol 9 pp. 247-255.
- [42]K. Kasamo, Y. Sakibara, The plasma membrane reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci.* 111 (1995) 117-131.
- [43]J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.* 54 (1992) 579-599.
- [44]J.A. Sandoval, Z.H. Huang, D.C. Garrett, D.A. Gage, K.D. Chapman, N-Acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cotton seeds. Amounts, molecular species, and enzymatic synthesis, *Plant Physiol.* 109 (1995) 543-549.
- [45]D.P. Briskin, W.R. Thomely, J.L. Rotti-Rotti, Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase, *Plant Physiol.* 78 (1985) 642-644.
- [46]T.M. Ching, Adenosine triphosphate and seed vigor, in: A.A. Khan (Ed.), *The physiology and biochemistry of seeds*, Elsevier Biomedical Press, Netherlands 1982 pp. 487-505.

Table 1. Kinetic parameters of the ATPase activity from plasma membrane vesicles of dry and 5 h imbibed embryos. The ATP hydrolysis was assayed at various ATP/Mg concentrations keeping constant the free Mg^{2+} at 35 μ M, 2mM NaN_3 , 100 μ M lysophosphatidylcholine, 250mM sucrose, 20 mM Mops/Btp pH 7.0. The reaction was initiated with addition of 3.3 μ g of membrane protein and was incubated for 3h at 30°C. Experimental values were adjusted to the velocity equation that describes the mixture of the enzymatic components (see Equation 2 under Material and Methods).

Component 1		
Imbibition time	V_{M1}	Km1
0 h	1595 \pm 202.85	775 \pm 127
5 h	1560 \pm 98.16	560 \pm 49
Component 2		
Imbibition time	V_{M2}	Km2
0 h	1189 \pm 267.17	5.7 \pm 1.5
5 h	691 \pm 142.32	1.2 \pm 1.1

V_M (1 and 2) and Km values are expressed in η mol Pi $mg^{-1} h^{-1}$ and μ M respectively.

Table 2. Kinetic parameters of the solubilized and restored plasma membrane H⁺-ATPase from 0 and 5 hours imbibed embryos. Membrane protein (4 mg) was solubilized with C₁₄E₈. After centrifugation, the resulting pellet was solubilized with dodecyl-β-D-maltoside and part of this material was used to measure ATP hydrolysis (see solubilized enzyme). The other portion of the solubilized protein was supplemented with soybean phospholipids and was used to measure ATP hydrolysis (see restored enzyme). For experimental details see Material and Methods. The best fit for the solubilized enzyme was obtained with Equation 3 (model of two enzymatic components, one of them with a Michaelis kinetics and the other with cooperativity, see Material and Methods). For the restored enzyme the best fit of the experimental values was obtained with the Hill model (Equation 1 under Material and Methods).

PARAMETER		IMBIBITION TIME (hours)	
		0 h	5 h
Solubilized enzyme			
Component 1	V _{M1}	718 ± 17.0	2940 ± 8.5
	K _m	1870 ± 300	461 ± 170
Component 2	V _{M2}	975 ± 15	1320 ± 33
	S _{0.5}	10	10
	n	11.3 ± 8.4	1.58 ± 0.45
Restored enzyme			
Component 1	V _M	4108.8 ± 57.18	4924.4 ± 121.9
	S _{0.5}	208 ± 10	300 ± 22
	n	1.43 ± 0.14	1.52 ± 0.10

V_M are expressed in nmolPimg⁻¹h⁻¹, K_m and S_{0.5} are expressed in μM.

Table 3. Levels of free radicals and conjugated dienes in the plasma membrane vesicles from 0 and 5 hours imbibed embryos.

TIME	Chemiluminescence (cpm/ μ g protein)	Conjugated dienes (ΔA_{233})
0H	4682 \pm 168.8	0.288 \pm 0.012
5H	8790 \pm 174.9	0.277 \pm 0.034

Table 4. Content of four phospholipids in plasma membrane vesicles from dry and 5 hours imbibed maize embryos.

Imbibition time (hours)	Phospholipid content (nmolPi mg ⁻¹)					
	PS	PI	PE	PC	PC/PE	TOTAL
0	189.2	134.2	31.0	34.4	1.11	389
5	31.0	41.3	58.5	68.8	1.18	200

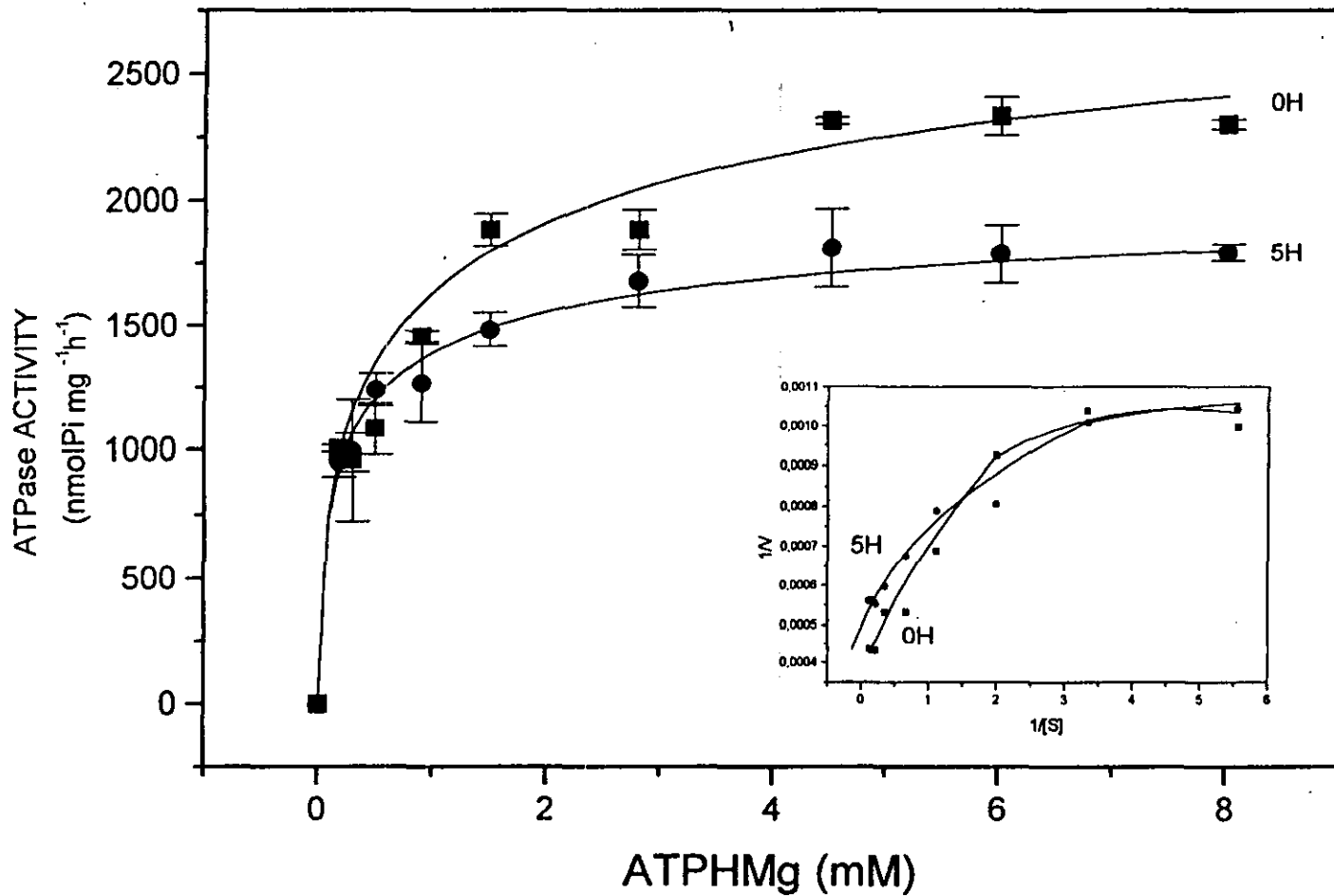
Legends

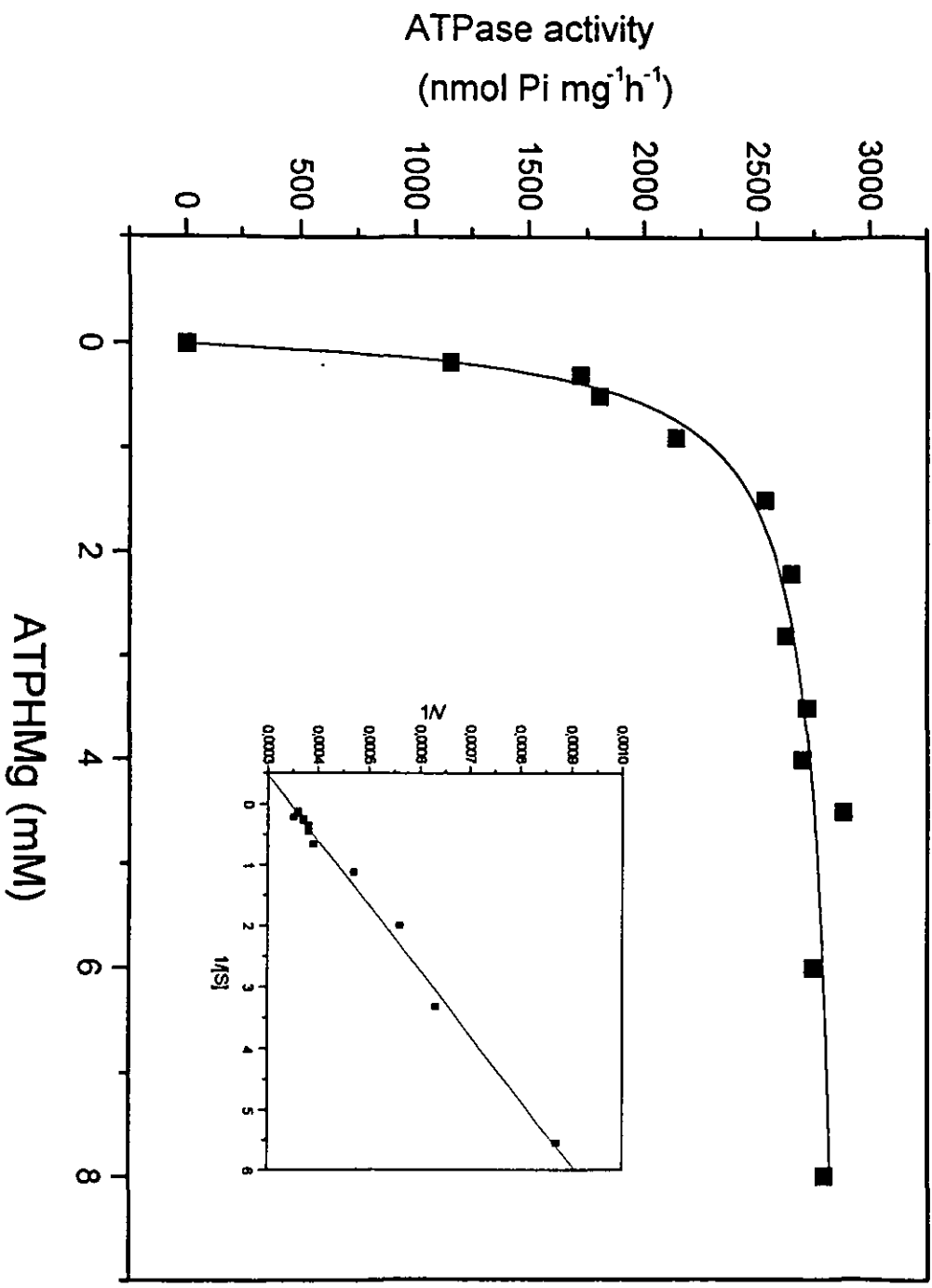
Figure 1. Effect of substrate concentration on the ATPase activity from plasma membrane vesicles from 0 and 5 h imbibed embryos and from the microsomal fraction of maize roots. The ATPase assay contained 250 mM sucrose , 20 mM Mops/Btp pH 7.0, 2mM NaN_3 , 100 $\mu\text{g/ml}$ lysophosphatidylcholine and the indicated concentrations of ATPMg, keeping constant at 35 μM the free Mg^{2+} concentration. The reaction was started with the addition of 3.3 μg of membrane protein, then incubated at 30°C and arrested with SDS. A) The ATPase activity of plasma membrane vesicles from 0 and 5 hours imbibed embryos do not exhibit a Michaelis-Menten behavior. The double reciprocal plot (inset) for the ATPase activity from both imbibition times shows the probable cooperativity of the curves. The experimental values were fitted to the Hill model (Equation 1 on Material and Methods) and the kinetic constants for the plasma membrane fraction of 0h were $s_{0.5} = 1000 \pm 270 \mu\text{M}$, $V_M = 3275.3 \pm 193 \text{ nmol Pi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$, $n = 0.45 \pm 0.2$ and for 5h imbibed embryos were $s_{0.5} = 280 \pm 130 \mu\text{M}$, $V_M = 2108.2 \pm 255 \text{ nmol Pi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$, $n = 0.5 \pm 0.2$. B) The ATPase activity of the microsomal fraction of maize embryos show Michaelis-Menten kinetics, as observed in the double reciprocal plot (inset) of the ATPase activity. The kinetic parameters for the microsomal fraction obtained with the Hill equation were $K_m = 390 \pm 16 \mu\text{M}$, $V_M = 2812.0 \pm 86.1 \text{ nmol Pi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$, $n = 0.998 \pm 0.2$.

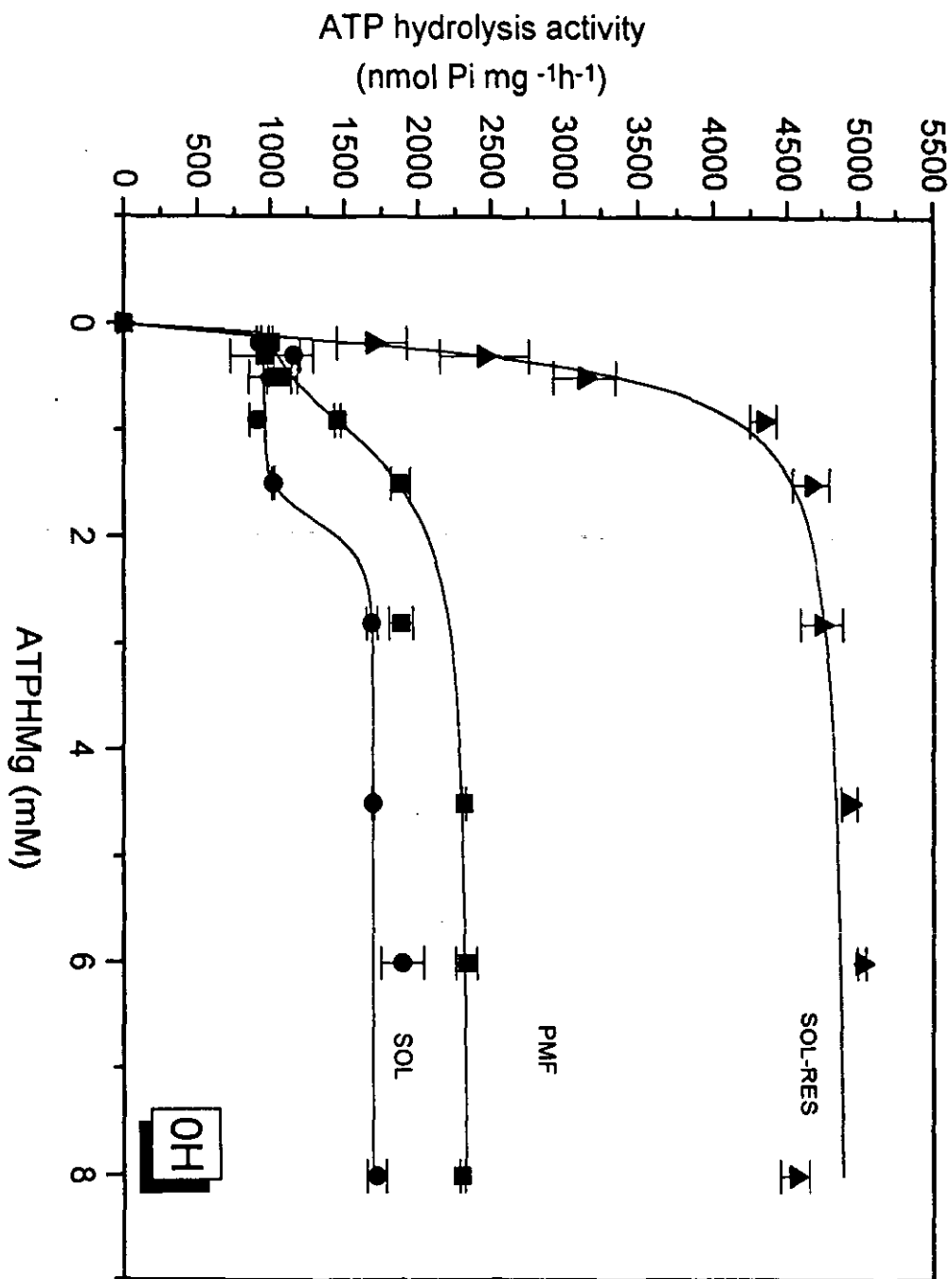
Figure 2. Effect of the substrate concentrations on the solubilized and restored fractions of ATPase activity from plasma membranes obtained from 0 and 5 h imbibed embryos. Plasma membrane fraction (PMF; 4 mg of protein) were solubilized with C_{14}E_9 . After centrifugation, the resulting pellet was solubilized with dodecyl- β -D-maltoside and part of this material containing the solubilized ATPase was used to measure ATP hydrolysis (SOL). The other portion of the solubilized protein was supplemented with azolectin phospholipids and was used to measure ATP hydrolysis (SOL-RES). The kinetics of ATPase hydrolysis for the 0 (A) and 5h imbibed embryos (B) was assayed as described in the legend of the Figure 1. The curves were calculated from the appropriate equations to obtain the best fit (Equation 1 for data from PMF and SOL-RES ATPase activity, and Equation 3 for SOL ATPase activity data).

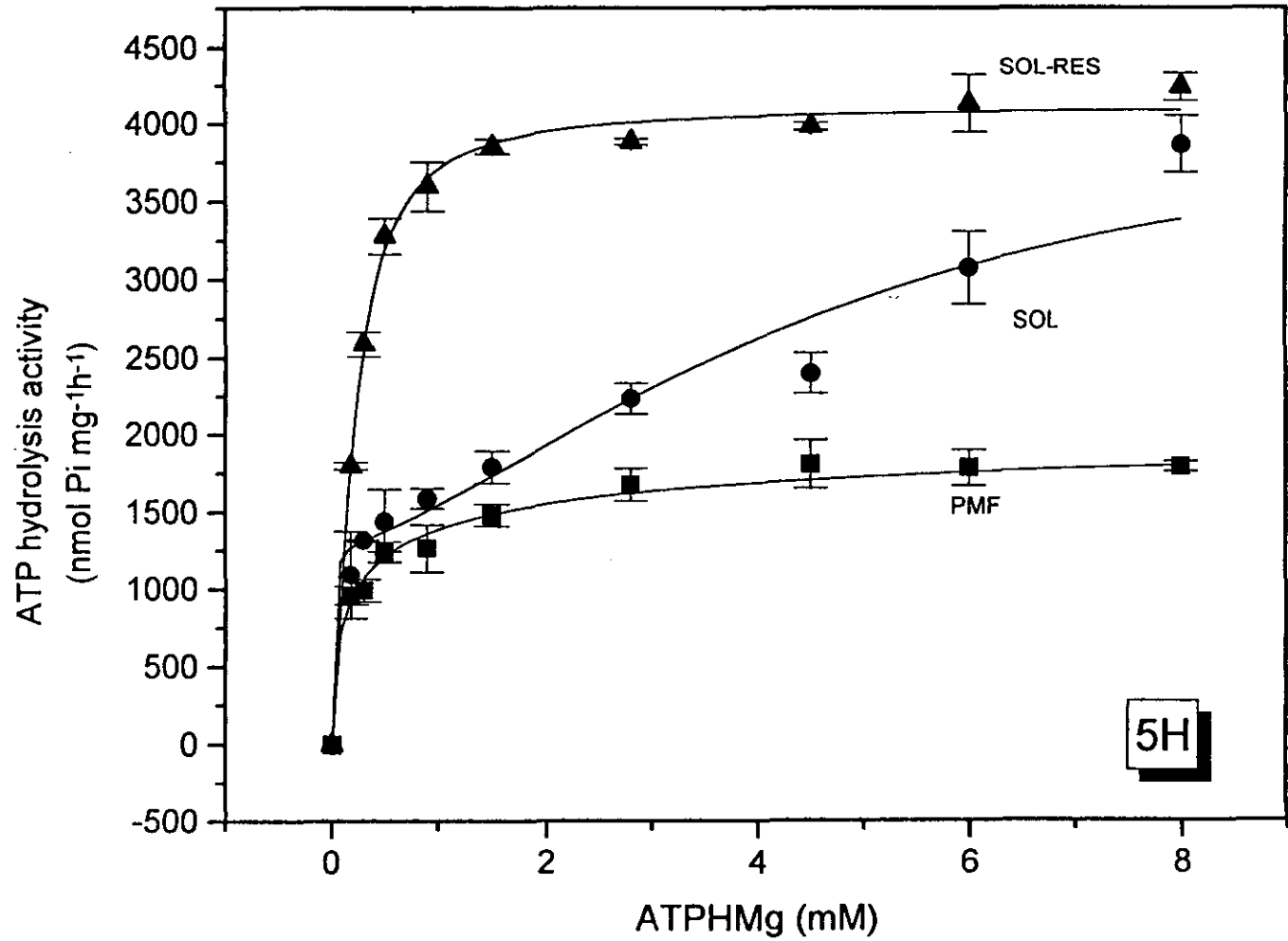
Figure 3. Scheme showing the possible states of aggregation of the H^+ -ATPase based on the data obtained from the FPLC purification (earlier work) and the kinetic models. *A, B,








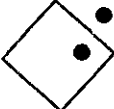


C are the different preparations in which the enzyme activity was studied, A corresponds to the native membranes, B to the solubilized membranes in dodecyl- β -D-maltoside and C the preparation solubilized and then supplemented with soybean phospholipids. The circle and diamond represent the two possible forms of the monomeric enzyme. The symbols o, ■, Δ represent the catalytic sites according to their characteristics of affinity for ATP or cooperativity.









	A) native	B) solubilized	C) restored
 dry embryos	<ul style="list-style-type: none"> ● low affinity site ▲ high affinity site  <p>dimer</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● low affinity site  <p>monomer</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ high affinity site  <p>dimer</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ high affinity site highly cooperative 	<ul style="list-style-type: none"> ■ low affinity site slightly cooperative  <p>dimer</p>
 5h imbibed embryos	<ul style="list-style-type: none"> ● low affinity site ▲ high affinity site  <p>dimer</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● low affinity site  <p>monomer</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ high affinity site slightly cooperative  <p>dimer</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ low affinity site slightly cooperative  <p>dimer</p>

Sección V.3 Resultados complementarios.

V.3.1 Efecto de la desfosforilación en la actividad de la enzima.

Otra forma en que la ATPasa de protones puede regular su actividad es la de presentar diferente estado de fosforilación en el carboxilo terminal. Se ha sugerido que al experimentar la desfosforilación, la enzima aumenta su actividad (DeBoer 1997; Xing *et al.* 1996). Por ello, para investigar la posible contribución de la fosforilación en la actividad de la enzima de 0 y 5 horas, se realizó un ensayo en el que se mezclaron las cantidades apropiadas de las vesículas de membrana plasmática en un medio de incubación que contenía fosfatasa alcalina unida a Agarosa, para producir la defosforilación de la ATPasa. Se encontró que en ambas preparaciones membranales, conforme se iba aumentando el tiempo de exposición de las VMP a la fosfatasa alcalina, la actividad de ATPasa iba aumentando (Figura 7). Sin embargo, la actividad de la enzima proveniente de los embriones embebidos 5 h es 1.4 veces mayor a la de la enzima de 0 h a tiempos de incubación mayores a 10 minutos. Lo anterior podría indicar que la enzima o las enzimas que se encuentran en las 5 horas presentan mayor grado de fosforilación que las enzimas de la preparación membranal de 0 h.

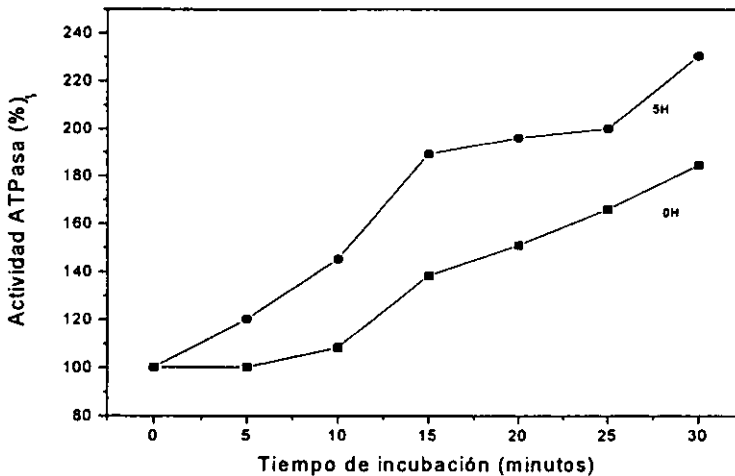


Figura 7. Efecto del tiempo de incubación con fosfatasa alcalina sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de embriones embebidos 0 y 5 horas. 100 μ g de proteína de VMP se añadieron a 400 μ l de medio de ensayo que contenía 40 Unidades de fosfatasa alcalina unida agarosa, 20 mM de Tris/HCl pH 7 y 2 mM de $MgCl_2$, incubándose a 25°C. A cada uno de los tiempos indicados se tomó una alícuota de 40 μ l y se filtró en una membrana con un poro de 0.2 μ m. Al filtrado se le midió la actividad de hidrólisis de ATP según se describe en el artículo de la sección 1 de resultados.

V.3.2 Detección de los niveles de ATPasa a los diferentes tiempos de imbibición con un anticuerpo específico.

El incremento observado en la actividad de la ATPasa de protones a las 2h de imbibición de los embriones, podría ser explicado también por un aumento en la cantidad de ATPasa en las VMP a ese tiempo. Para explorar esta posibilidad se separaron las proteínas de las VMP de embriones embebidos diferentes tiempos en un gel de poliacrilamida-SDS, después se realizó la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa y se detectó a la ATPasa con los anticuerpos que reconocen la región amino terminal de la enzima (Sánchez-Nieto *et al.* 1994). La única banda que se detectó con el anticuerpo, presentó un peso molecular de alrededor de 107 kDa, peso que corresponde al reportado para la ATPasa de H⁺ de plantas y que además se presentó en las preparaciones membranales de todos los tiempos de imbibición analizados (Figura 8A).

Los resultados mostraron un incremento en la cantidad de enzima desde la primera hora de imbibición de los embriones, detectándose la mayor cantidad de proteína a las 2 horas (Figura 8B). Es probable que este incremento en proteína en las primeras 2 horas de imbibición se deba a la síntesis *de novo* de la enzima o a una reducción en la degradación. Después de las 2 h se observó una disminución en la cantidad de proteína detectada con el anticuerpo, lo que podría indicar la disminución en la síntesis *de novo*, la degradación de la enzima o la combinación de ambas actividades.

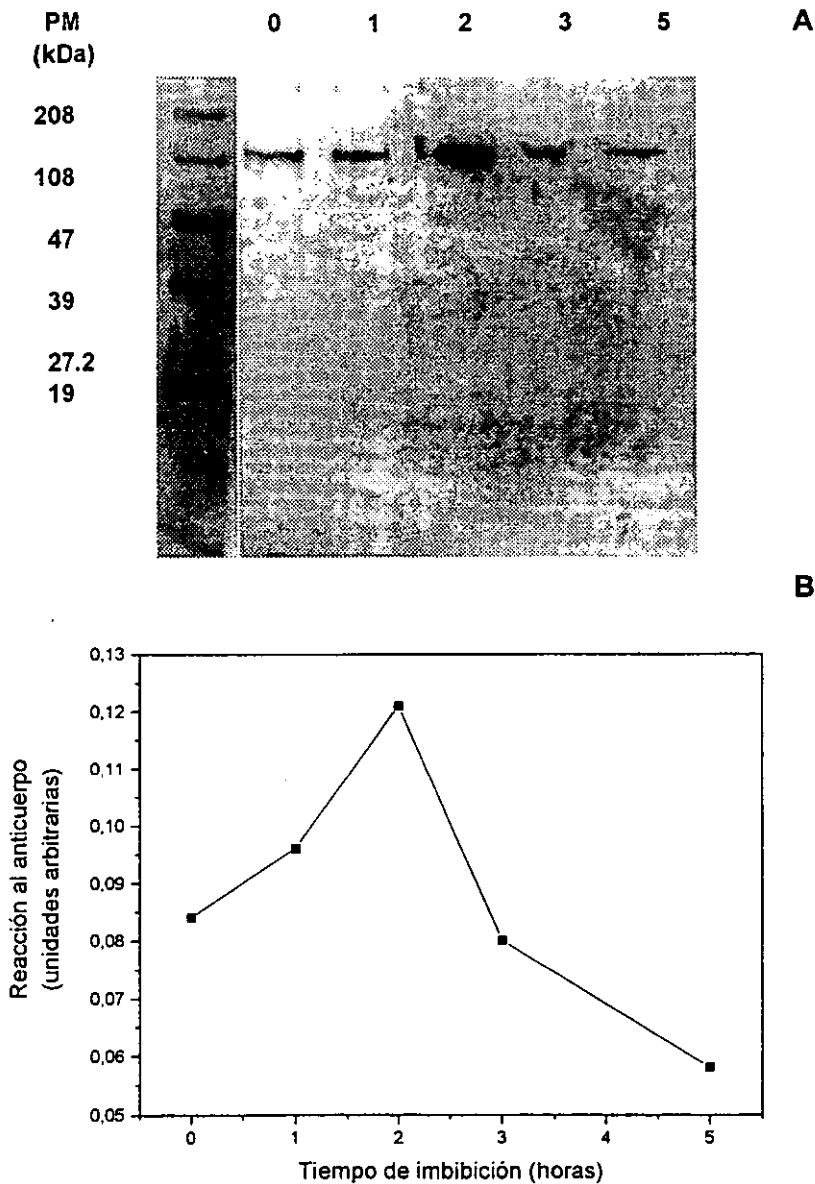


Figura 8. Inmunodetección de la ATPasa de H^+ en las vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos diferentes tiempos. A. Inmunoréplica tipo Western de las VMP de embriones embebidos 0, 1, 2, 3 y 5 horas. Se obtuvieron las VMP de los embriones embebidos los tiempos indicados y se corrieron 60 μ g de proteína /carril en un gel de poliacrilamida-SDS, posteriormente se transfirieron las proteínas a papel de nitrocelulosa y se detectó a la ATPasa usando un anticuerpo que reacciona contra un segmento de 14 aminoácidos localizado en la región amino terminal de la enzima. B. Perfil de detección de la ATPasa obtenido de la densitometría de la inmunoréplica del panel A.

V.3.3 Incorporación de Metionina-³⁵S a las proteínas totales, a la fracción membranal y a la banda de ATPasa de los embriones embebidos diferentes tiempos.

Para determinar el tiempo en el cual ocurría la síntesis *de novo* de la enzima, se realizó la incubación de los embriones en presencia de Metionina-³⁵S. Se midió la incorporación de la marca radiactiva en las proteínas de los embriones embebidos diferentes tiempos en un extracto crudo o total de proteínas (fracción H-N), en la fracción microsomal y en la banda de proteína que reaccionaba con los anticuerpos contra la ATPasa de la membrana plasmática. Se encontró que la incorporación de marca radiactiva a las proteínas totales es muy baja en la primera hora de imbibición y a partir de la primera hora aumento 23 veces. Después de este tiempo la síntesis de proteínas continua pero más lentamente. En cuanto a la síntesis de proteínas de membrana se encontró un aumento de 6 veces de la 0.5 h a la primera hora de imbibición, representando así el 43% de la proteína total sintetizada. A las 5 horas la incorporación de marca radiactiva de la fracción membranal constituyó el 50% de la proteína total sintetizada.

Sin embargo, aún cuando se observó el incremento en la síntesis de las proteínas membranales, no se logró detectar una incorporación significativa de marca radiactiva en la banda de 100kDa que reaccionó con el anticuerpo específico contra la ATPasa (Tabla 2). Lo anterior contradice los resultados de la detección de la enzima con anticuerpos, los cuales en vista de estos resultados podrían explicarse si toda la población de enzima existente a cualquiera de los tiempos determinados no estuviera insertada en la membrana plasmática, sino que se encontraría en otra membrana celular como por ejemplo en la membrana del retículo endoplásmico, por lo que las diferencias en el nivel de proteína en las VMP a los diferentes tiempos de imbibición se deberían a esta inserción diferencial de proteína y no a la síntesis *de novo*.

Tabla 2. Incorporación de Metionina-³⁵S a las proteínas de las fracciones H-N y microsomal y a la banda de ATPasa de los embriones embebidos diferentes tiempos. Se obtuvieron las fracciones H-N y microsomal de embriones embebidos por diferentes tiempos en Metionina-³⁵S según se describió en la sección de materiales y métodos complementarios y se realizó la inmunoréplica tipo Western de la fracción microsomal de embriones embebidos diferentes tiempos y se cortó la banda que se detectó con el anticuerpo que reacciona con la ATPasa de proteínas de la membrana plasmática.

Tiempo de imbibición (horas)	Fracción H-N (cpm / mg proteína)	Fracción Microsomal (cpm / mg proteína)	cpm / banda de 100kDa
0.5	1334.0	1572.0	74
1	30,486.0	12,628.0	58
2	36,686.0	16,228.0	55
3	37,880.0	21,532.0	70
5	44,546.0	22,412.0	165.33

V.3.4 Efecto de inhibidores de la traducción y transcripción en la actividad de la ATPasa.

Para determinar si la actividad catalítica que se determinó en las membranas plasmáticas durante la hidratación del embrión, se debía a ATPasa recién sintetizada, se expusieron a los embriones embebidos por diferentes tiempos a dos inhibidores que afectan a diferente nivel la síntesis de proteínas, estos inhibidores fueron la cicloheximida y la α -amanitina. El primero de los inhibidores es un antibiótico que bloquea la síntesis de proteínas al inhibir a la peptidil transferasa, mientras que la α -amanitina inhibe a la RNA polimerasa II eucariota, por lo que no permite la síntesis de proteínas a partir de RNAm nuevos o recién sintetizados.

En la primera hora de imbibición con α -amanitina no se observó un cambio significativo en la actividad de la enzima comparada con el control, lo anterior podría deberse a que en la primera hora de imbibición la maquinaria de síntesis de proteínas no fuera todavía activa o que la síntesis de proteínas estuviera ocurriendo a expensas de los RNAm "viejos" o que el inhibidor aún no hubiera llegado a su sitio blanco de acción. Sin embargo, los datos concuerdan con la cantidad de enzima que se detecta con los anticuerpos contra la enzima, ya que a 0 y 1 horas de imbibición se tienen cantidades similares de proteína, por lo que aún cuando se sabe que la maquinaria de síntesis de proteínas si esta activa minutos después de la imbibición, es probable que esta enzima en particular se sintetice después de la hora.

La incubación de los embriones con α -amanitina en el intervalo de la primera y tercera hora de la germinación sí disminuye la actividad de la enzima, esta disminución puede ser explicada por la disminución en la cantidad de la enzima, debida a la inhibición que causa α -amanitina en la síntesis de la enzima a partir de los RNAm recién sintetizados. Estos resultados son consistentes con el aumento en ATPasa a las 2h de imbibición, según lo resultados obtenidos con el anticuerpo (Figura 8).

La incubación de los embriones con α -amanitina en el intervalo de 3 a 5 horas no modifica la actividad de la enzima a las 5 horas, es posible que la enzima recién sintetizada sea la responsable de la actividad que medimos a las 5 horas y que la enzima que se encontraba en la semilla seca ya haya disminuido a ese tiempo y por lo tanto no contribuya de manera significativa a la actividad a las 5 horas de imbibición, lo anterior concuerda con el nivel de enzima, ya que a las 5 horas hay menos proteína que el encontrado a las 0 horas.

La cicloheximida produjo efectos similares al de la α -amanitina en la actividad de la enzima, aunque la incubación con cicloheximida por 3-5 horas si produce una disminución ligera en la actividad (Tabla 3). Estos resultados podrían interpretarse como que en las primeras tres horas ocurre la síntesis *de novo* del RNAm y que a partir de este RNAm se sintetiza la enzima.

Tabla 3. Efecto de los inhibidores de la síntesis de proteínas en la actividad de hidrólisis de ATP de las VMP de embriones embebidos diferentes tiempos.

Tratamiento	Tiempo de imbibición total (horas)	Tiempo total con el inhibidor (horas)	Periodo en el que estuvieron en contacto con el inhibidor (horas)	Actividad de hidrólisis de ATP (nmolPimg ⁻¹ h ⁻¹)
Control	0	0	-	1364.25
	1	0	-	1117.5
	2	0	-	2352.6
	3	0	-	1062.5
	5	0	-	1328.4
α -amanitina	1	1	0-1	1280.5
	3	3	0-3	570.5
	3	2	1-3	283.0
	3	1	2-3	250.2
	5	2	3-5	1300.3
Cicloheximida	1	1	0-1	1272.96
	3	3	0-3	585.5
	3	2	1-3	256.5
	3	1	2-3	304.3
	5	2	3-5	949.73

V.3.5 Efecto de la concentración de Mg^{2+} libre en la actividad de la enzima y en su inhibición por vanadato.

V.3.5.1 Efecto del magnesio en los parámetros cinéticos de la enzima.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas es una enzima que es altamente específica para ATP y que necesita al catión Mg^{2+} para llevar a cabo la catálisis (Leonard y Hodges 1973). Se sabe que el sustrato real de la enzima es el complejo de ATP con Mg^{2+} , en una relación de $1Mg^{2+}:1ATP$ (Leonard y Hodges 1973; Balke y Hodges 1975).

Para conocer cuál es el sustrato real de la enzima se pueden seguir varias estrategias, una de ellas ha sido la de colocar en el medio de incubación cantidades equimolares de ATP y de $MgCl_2$ o $MgSO_4$ (Perlin y Spanswick 1981; Dupont *et al.* 1981; Dupont y Leonard 1980; Gildensoph y Briskin 1990; Cocucci y Marré 1991); otra de las estrategias también ampliamente utilizada es la de adicionar proporciones diferentes de las dos especies, tratando por lo general de tener mayor concentración de $MgCl_2$ que de ATP (Gibrat *et al.* 1989; Palmgren y Christensen 1994; Wach *et al.* 1990); para asegurar la formación del complejo $MgATP$. Aún cuando ambas estrategias conducen a la formación del sustrato real de la enzima, también podrían producir cantidades variables de Mg^{2+} y ATP libre y se conoce que ambas especies en concentraciones altas pueden producir inhibición de la actividad de la ATPasa (Balke y Hodges 1975).

En nuestro laboratorio hemos realizado la determinación de la actividad de ATPasa adicionando a la mezcla de reacción cantidades equimolares de ATP/Tris pH 7.0 y de $MgCl_2$, calculando la concentración de los complejos y especies libres que se formaban en el medio de reacción, dependiendo de la concentraciones adicionada de las dos especies, para realizar el cálculo se toman en cuenta las constantes de disociación de cada uno de los componentes y los posibles complejos que se podrían formar al pH en el que se llevaba a cabo la reacción (O'Sullivan y Smitters 1979; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares 1990; Sánchez-Nieto *et al.* 1992).

En el presente trabajo, con el objeto de obtener y comparar los parámetros cinéticos de la ATPasa de H^+ obtenida de vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos por diferentes tiempos, se midió la actividad de la enzima en presencia de diferentes concentraciones de su sustrato ($MgHATP^+$), concentraciones que se determinaron como describió en el párrafo anterior.

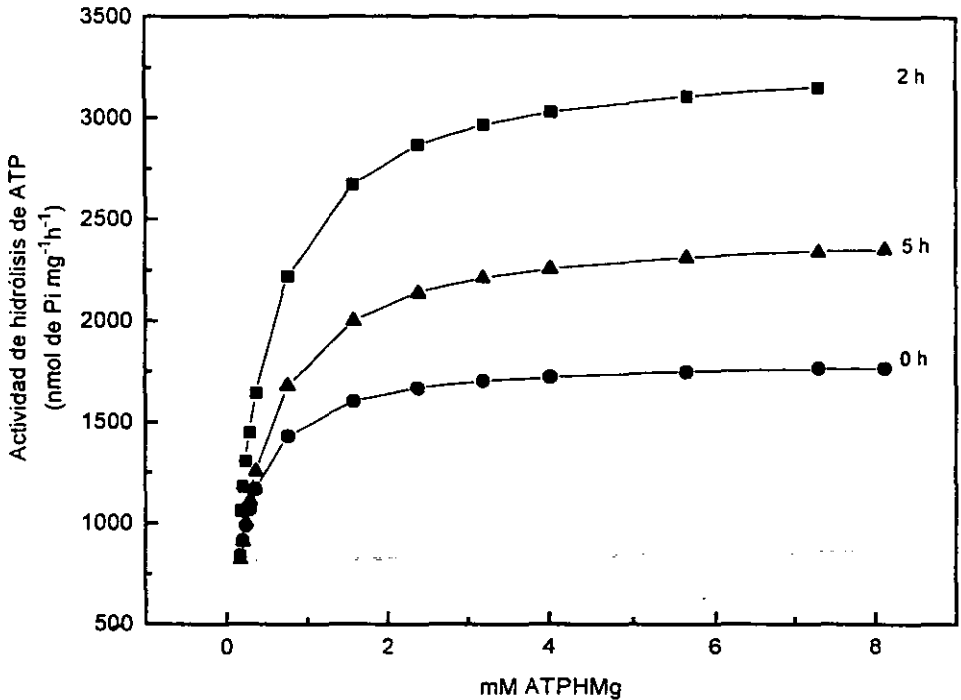


Figura 9. Curva de actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato de las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos. Se midió la actividad de hidrólisis de ATP en un medio de reacción que contuvo 250 mM Sacarosa, 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 2mM NaN₃, 54 µg/ml lisofosfatidilcolina, 7 µM CCCP y cantidades equimolares de MOPS/Btp pH 7.0 y MgCl₂. Se inició la reacción con la adición de 3.3 µg de proteína membranar (VMP), dejándose proceder por 3h a 30°C. Se detuvo la reacción con la adición de 24% SDS y por último se cuantificó el Pi liberado por un método colorimétrico (González et al. 1992).

Los datos cinéticos de la actividad de ATPasa de las vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos 0, 2 y 5 horas delinearon curvas que presentaban un comportamiento Michaeliano (Figura 9), lo cual se corroboró al procesar los datos con la ecuación de Hill, ya que los valores del número de Hill fueron cercanos a uno para las tres preparaciones membranales (Tabla 4). La actividad de ATPasa de las VMP de 0h presentó una Km 1.8 veces menor que la Km para la actividad de ATPasa de las preparaciones membranales de 2 y 5 horas. El valor de la Vmax es similar al que se detectó en el perfil de actividad de la enzima a los diferentes tiempos de imbibición (Sánchez Nieto 1994), en el que las VMP de 2h de imbibición presentaron el valor más alto de actividad de ATPasa, mientras que las otras dos preparaciones membranales mostraban una velocidad similar (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la ATPasa de la membrana plasmática. La actividad de ATPasa se determinó según se describe en el pie de la Figura 9. Los valores que se muestran se obtuvieron al ajustar los datos experimentales a la ecuación de Hill.

Tiempo de imbibición (horas)	Km (mM)	Vmax (nmol Pi mg ⁻¹ h ⁻¹)	n
0	0.207 ± 0.02	1336.9 ± 32.51	1.0149 ± 0.088
2	0.382 ± 0.07	2024.1 ± 37.5	1.0037 ± 0.003
5	0.359 ± 0.02	1433.2 ± 85.5	0.9213 ± 0.119

A pesar de que estos resultados eran semejantes a los reportados, en cuanto al comportamiento Michaeliano de la enzima y a los valores de Km obtenidos por otros autores (Dupont *et al.* 1981; Perlin y Spanswick 1981; Briskin y Poole 1984), se realizaron otros experimentos debido a que observamos que las concentraciones de Mg²⁺ libre presentes en el medio de ensayo variaban desde 30 hasta 230 μM. Puesto que la adición de cantidades equimolares de MgCl₂ y ATP no sólo nos producen las concentraciones que deseábamos del MgHATP⁻ sino también concentraciones diferentes de las especies libres (ATP y Mg²⁺), que se sabe tienen efecto inhibitorios en la actividad de la enzima (Balke y Hodges 1975; Briskin y Poole 1983) y dado que se ha sugerido que la ATPasa de *Neurospora crassa* podría tener al menos un sitio adicional para la unión de magnesio (Brooker y Slayman 1983).

Para descartar la posible inhibición de la enzima por Mg²⁺, se midió el efecto del Mg²⁺ libre sobre la actividad de la ATPasa de las tres diferentes preparaciones membranales (0, 2 y 5 horas) y a dos diferentes concentraciones de MgHATP⁻: una alrededor de la Km (200 μM) y otra 4 veces por debajo de la Km (50 μM).

La actividad de hidrólisis de ATP de la preparación membranal de 0 horas a 200 μM de MgHATP⁻ fue aumentando conforme se incrementó la concentración de Mg²⁺ libre en el ensayo desde 20 hasta 60 μM y concentraciones mayores ya no aumentaron la actividad de la enzima (Figura 10). Mientras que a 50 μM de MgHATP⁻ la actividad de la ATPasa disminuyó al aumentar la concentración de Mg²⁺ libre en el medio de ensayo. En tanto que, la preparación membranal de 2h a 200 μM de MgHATP⁻ aumentó su actividad a concentraciones de Mg²⁺ libre de 20 y 40 μM y concentraciones mayores inhibieron la actividad de la ATPasa. A 50 μM de MgHATP⁻ la actividad enzimática de las VMP de 2h se inhibió a todas las concentraciones Mg²⁺ libre probadas. Mientras que, la actividad de ATPasa de la preparación membranal de 5h a 200μM de MgHATP⁻ aumentó conforme se incrementó la concentración de Mg²⁺ libre de 10 a 35 μM, concentraciones mayores inhibieron ligeramente a la enzima. A 50 μM de MgHATP⁻ se observó que la actividad de las VMP de 5h fue similar en todas las concentraciones de Mg²⁺ libre probadas (Figura 10).

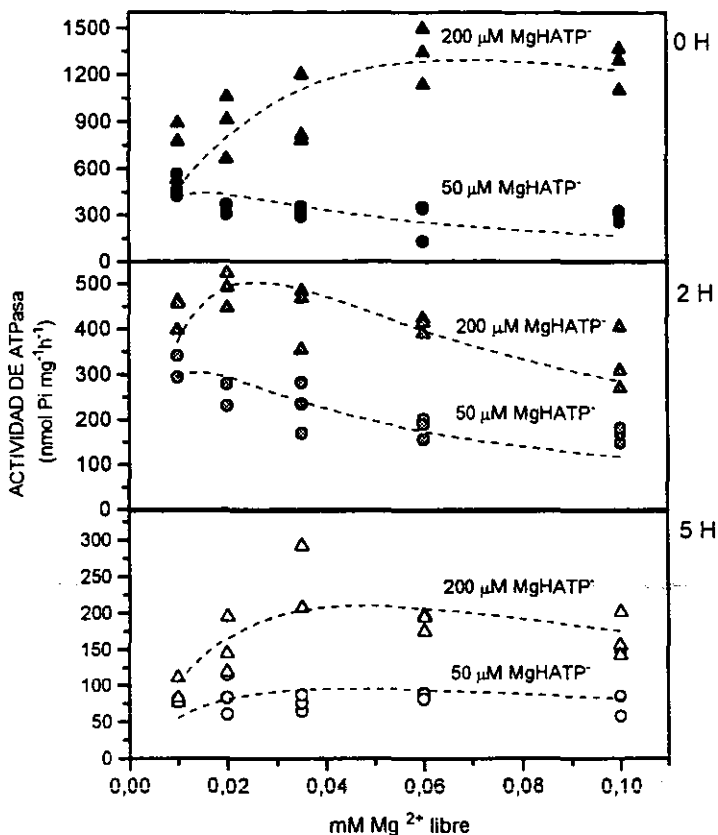


Figura 10. Efecto del Mg²⁺ libre en la actividad de la ATPasa de las VMP de embriones embebidos diferentes tiempos. El ensayo de actividad de ATPasa fue similar al descrito en la leyenda de la Figura 9, pero en este caso se variaron las concentraciones de Mg²⁺ libre y se mantuvo fija la concentración del complejo MgHATP⁻ a 50 y 200 μM.

La inhibición que causa el magnesio libre sobre la actividad de la enzima a concentraciones no saturantes de sustrato podría explicarse si el magnesio libre compite por el sustrato por el sitio activo de la enzima, ya que estos resultados son compatibles con la cinética de de adición de sustratos a una enzima totalmente al azar (Segel, 1993).

Este último hallazgo nos sugería que el Mg²⁺ libre podría afectar en proporción diferente la actividad de la enzima de las tres fracciones membranales (0, 2 y 5h) y que la inhibición podría ocurrir en casi todas las concentraciones de MgHATP⁻ probadas, ya que sabíamos por el experimento que se mostró en la Figura 9, que el Mg²⁺ libre

fluctuaba entre 30 a 45 μM a concentraciones altas de MgHATP^- , mientras que a concentraciones menores de sustrato, se llegaba alrededor de 200 μM del magnesio libre.

Por lo anteriormente expuesto, decidimos medir la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de sustrato manteniendo constante la concentración de magnesio libre a 35 y 200 μM (Figura 11). Los resultados confirmaron nuestra sospecha: altas concentraciones de magnesio libre inhiben significativamente la actividad de la enzima, por ello se decidió utilizar 35 μM de esta especie libre para medir la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

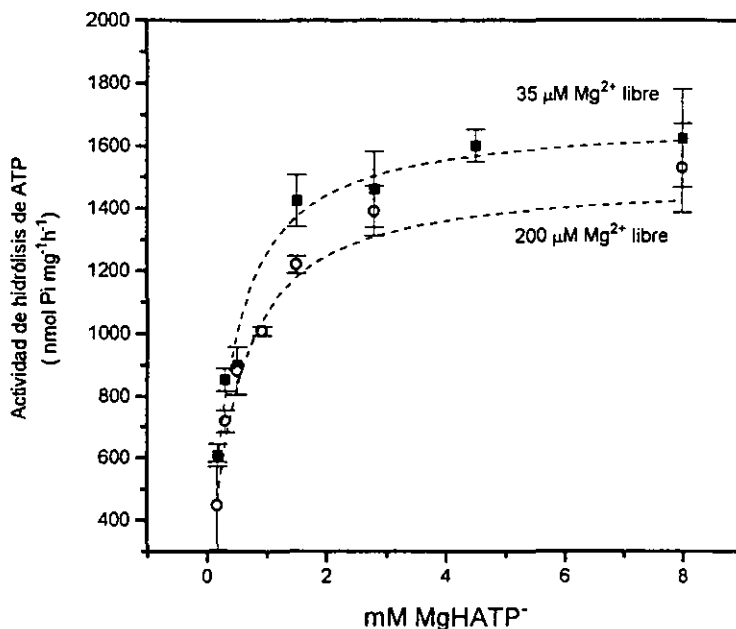


Figura 11. Efecto del magnesio libre en la cinética de actividad de la ATPasa de las VMP de embriones sin embeber, a diferentes concentraciones de sustrato. El ensayo se realizó según se describió en la leyenda de la Figura 9, pero manteniéndose fija la concentración de Mg^{2+} libre en la solución a 35 (-■-) o 200 μM (-○-).

V.3.5.2 Efecto del magnesio en la inhibición por vanadato.

De manera paralela a los experimentos descritos, se exploró el efecto de vanadato sobre la actividad de la ATPasa. Con el fin de obtener y comparar el efecto de este inhibidor en la actividad de la ATPasa de los embriones embebidos por diferentes tiempos, se procedió a medir la actividad de la enzima a tres diferentes concentraciones de sustrato y variando las concentraciones de vanadato. Los valores de I_{50} obtenidos del ajuste de las curvas a diferentes concentraciones del inhibidor, indicaron que la enzima de los embriones con 5 horas de imbibición es menos sensible al inhibidor, comparada con la actividad de ATPasa de los embriones con 0 y 1 horas de imbibición, a todas las concentraciones de sustrato probadas.

Tabla 5. Constantes de inhibición de Na_3VO_4 (I_{50}) sobre la actividad de la ATPasa de protones a diferentes concentraciones de sustrato (MgHATP^+). La enzima proviene de las vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos por diferentes tiempos obtenidas según se describe en Sánchez-Nieto *et al.* (1997). El ensayo de hidrólisis de ATP se llevó a cabo de manera similar a el descrito en el experimento de la Figura 9, en donde se mezclaron cantidades equimolares de ATP y MgCl_2 .

Tiempo de imbibición (h)	I_{50}		
	0.24 mM MgHATP^+ (230 μM Mg^{2+} libre)	0.77 mM MgHATP^+ (70 μM Mg^{2+} libre)	8.11 mM MgHATP^+ (40 μM Mg^{2+} libre)
0	232.44 ± 55.57	311.93 ± 135.4	26.11 ± 10.13
1	102.38 ± 42.66	80.73 ± 76.32	22.58 ± 10.89
5	13415 ± 1570	362.68 ± 315.0	131.67 ± 30.57

Los valores de I_{50} están expresados en μM de Na_3VO_4

Adicionalmente, observamos que la actividad de la ATPasa de las tres fracciones membranales presentó valores de I_{50} menores conforme aumentaba la concentración del sustrato, sugiriendo que el vanadato produce una inhibición de tipo acompetitivo, es decir, que el inhibidor se une muy eficientemente al complejo ES (complejo que aumenta con la concentración de sustrato), inhibiendo así la reacción. Sin embargo, sólo hay un reporte de este tipo de inhibición sobre la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática de plantas (O'Neill *et al* 1984). Aún cuando la información que nos proporcionaban los I_{50} era suficiente para conocer el efecto del inhibidor sobre las diferentes preparaciones membranales (0, 2 y 5 h), era interesante investigar porqué encontrábamos este tipo de inhibición en las tres preparaciones de VMP, por lo que procedimos a investigar cual era la causa.

El tipo de inhibición que producía el VO_4^{3-} sobre la enzima en nuestras condiciones de ensayo, podría atribuirse a que hubiera diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre en el medio de reacción, cuando se mezclaban equimolarmente ATP y MgCl_2 , lo cual se pudo comprobar en la Tabla 5.

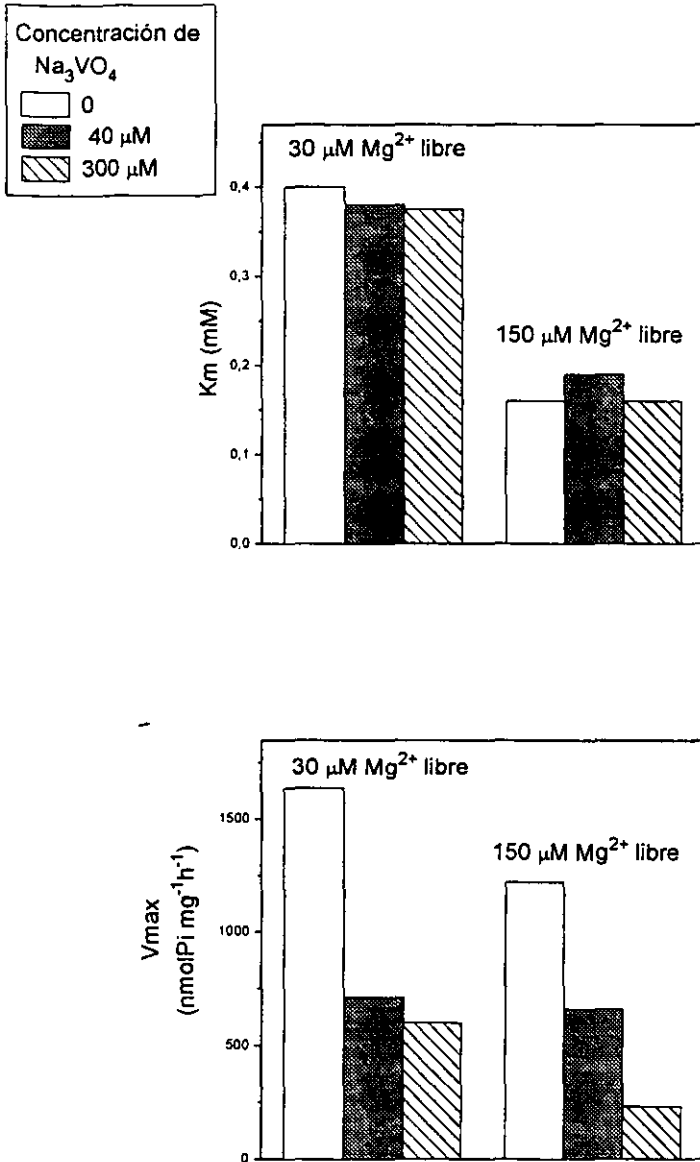


Figura 12. Efecto del vanadato y el magnesio libre en los parámetros cinéticos de la ATPasa de las VMP de embriones sin embeber. El experimento se realizó en un medio de ensayo que contuvo 250 mM Sacarosa, 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 2mM NaN_3 , 54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lisofosfatidilcolina, 7 μM CCCP, ATP/Tris pH 7.0 y MgCl_2 . Se inició la reacción con la adición de 3.3 μg de proteína membranal (VMP), dejándose proceder por 3h a 30°C. Se detuvo la reacción con la adición de 24% SDS y por último se cuantificó el Pi liberado por un método colorimétrico (González *et al.* 1992).

Para aclarar el papel del Mg^{2+} libre en la inhibición de la actividad de la ATPasa por vanadato, se obtuvieron las V_{max} y las K_m de la ATPasa en una preparación de VMP de embriones sin embeber, a dos diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre (30 y 150 μM) y en presencia de diferentes concentraciones de Na_3VO_4 (0, 40 y 300 μM). Los valores de K_m y V_{max} obtenidos al ajustar los datos experimentales con la ecuación de Michaelis-Menten presentaron una desviación estándar alta, signo de que no era el mejor ajuste de los datos experimentales (comportamiento que describimos con más detalle en el manuscrito de la sección 3 del Capítulo de Resultados). Los valores de K_m obtenidos con el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten al mantener el magnesio libre a 30 μM fueron similares en presencia o ausencia de Na_3VO_4 . Un comportamiento similar se observó con las K_m obtenidas a 150 μM de Mg^{2+} libre a 0, 40 y 300 μM de Na_3VO_4 (Figura 12). Mientras que las V_{max} obtenidas del ensayo de actividad en presencia de 30 μM de Mg^{2+} libre sí se modificaron en presencia de vanadato, resultados similares se obtuvieron cuando se mantuvo a 150 μM el Mg^{2+} libre, disminuyendo la V_{max} de la enzima conforme aumentaba la concentración del inhibidor (Figura 12).

Este efecto del inhibidor sobre los parámetros cinéticos de la enzima al mantener constante en el medio de ensayo la concentración de Mg^{2+} libre, podría sugerir que el mecanismo de inhibición es del tipo no competitivo, es decir que el VO_4^{3-} se une a la enzima independientemente de si el sustrato está o no unido a la enzima. Este patrón de inhibición del vanadato por la ATPasa es el que se ha reportado con mayor frecuencia (Gallager y Leonard 1982 ; Briskin 1993; Gibrat *et al.* 1988).

Por otra parte también observamos que la K_m de la ATPasa medida a 150 μM de Mg^{2+} libre, es aproximadamente 2.5 veces menor a la K_m determinada a 30 μM de Mg^{2+} libre. Al respecto, en la literatura se ha sugerido que el papel del magnesio podría ser la de estabilizar al intermediario enzima-ATP de manera que el magnesio se requeriría para optimizar la transferencia del fosfato y del ATP a la enzima (Briskin y Poole 1983). Sin embargo, aún cuando la K_m disminuyó a concentraciones altas de magnesio libre, la velocidad de la enzima fue menor en esta condición que a 30 μM de magnesio libre.

En estos experimentos no fue posible obtener los valores de K_i de vanadato debido a que con los datos anteriores no se podía asegurar con certeza cual era el mecanismo de inhibición del vanadato sobre la enzima y cual era la participación del magnesio libre en la inhibición. Sin embargo, como el objetivo de este trabajo era el de comparar el efecto del inhibidor sobre las VMP de embriones embebidos diferentes tiempos, se procedió a determinar los valores de I_{50} para vanadato a concentración saturante de sustrato, manteniendo constante la concentración de Mg^{2+} libre a 35 μM (ver Figura 1 en el artículo de la sección 1 del capítulo de resultados).

Para poder determinar de manera clara y confiable cual es el efecto del vanadato y del magnesio en la actividad de la enzima, sería deseable contar con una preparación pura de enzima, para entonces poder realizar los ensayos necesarios que definan el papel de del VO_4^{3-} y el Mg^{2+} sobre la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de plantas.

VI. Discusión general

Considerando que los datos presentados en los artículos contenidos en esta tesis se discuten de manera independiente, esta Discusión general está enfocada a hacer una integración de los aspectos más generales y relevantes del trabajo de tesis.

Al inicio de la germinación debe ocurrir la reanudación del metabolismo en general y la re-organización de los componentes membranales con la reactivación de los mecanismos de transporte (Bewley y Black 1994). La caracterización de una enzima membranal en este proceso fisiológico resulta importante por varias razones: una es el conocimiento del progreso de la actividad enzimática membranal durante la transición del estado seco al hidratado. Este es un aspecto que aún en enzimas solubles está muy poco estudiado. Otra razón importante es el conocimiento de la dinámica de una enzima fundamental en el metabolismo celular y cuya mayor demanda fisiológica se establece alrededor de las 12 horas de imbibición en nuestro cultivar. En este trabajo se ha diseccionado la actividad enzimática, las propiedades cinéticas y la influencia membranal en la ATPasa de H^+ a través de las primeras 5 horas de germinación. Estos datos ilustran las diversas estrategias celulares que se despliegan para modular la actividad enzimática membranal en un periodo particularmente interesante, crítico y decisivo en el ciclo de vida de una planta.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática puede ser importante en la germinación, ya que es una enzima que genera un gradiente electroquímico de protones a expensas de la hidrólisis del ATP. Este gradiente electroquímico puede facilitar el transporte de iones o moléculas tanto al interior como al exterior de la célula, transporte que sería importante para el crecimiento de las células embrionarias. Además se ha planteado que la alcalinización del pH intracelular podría inducir la activación de la maquinaria de síntesis de proteínas, mientras que la acidificación que la enzima podría promover en el apoplasto permitiría la relajación de la pared celular, ambos procesos son de vital importancia para el crecimiento y la elongación celular de los tejidos embrionarios.

Inicialmente en el laboratorio encontramos que la ATPasa de H^+ estaba presente en la semilla seca, éste era un indicio de que la enzima podría ser activa al iniciarse la germinación (García-Rubio *et al.* 1997; Sánchez-Nieto 1994; Artículo en apéndice). Un seguimiento temporal de la actividad reveló que durante las primeras horas de hidratación la actividad de la enzima fluctuaba. Se encontraron actividades semejantes a las 0 y 5 horas de imbibición y un máximo de actividad de ATPasa a las dos horas de imbibición (Figura 13; Sánchez-Nieto 1994). Estos cambios en la actividad podrían involucrar la síntesis *de novo* de la enzima, modificaciones post-traduccionales (fosforilación-defosforilación y proteólisis) o la alteración en el microambiente de la enzima. Se ha propuesto

que todos estos mecanismos pueden alterar la actividad de la ATPasa, por lo que consideramos que no sería difícil que alguno o varios de ellos se expresaran en la fase inicial de la germinación. A continuación se presenta una panorámica en la que se ubican todos los factores estudiados y cuya participación modula la actividad de la enzima.

VI.1 Detección de niveles de enzima.

VI.1.1 Reactividad al anticuerpo específico contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas.

El incremento que se detectó en la actividad de la enzima a las dos horas podría explicarse de varias maneras. Una forma de explicar ese aumento es por un aumento en la cantidad de enzima. Los resultados de la detección de la enzima con anticuerpos específicos revelaron que efectivamente, a las 2 h había mayor cantidad de la ATPasa, lo cual podría explicarse si hubiera ocurrido su síntesis *de novo*.

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática no es la única enzima que presenta un máximo de actividad en las primeras 5 horas, sino también siguen este patrón la ATPasa mitocondrial (Ehrenshaft y Brambl 1990), la peroxidasa y la superóxido dismutasa (Puntarulo y Boveris 1990; Stewart y Bewley 1980). Es probable que aquellas enzimas que son muy importantes para el desarrollo de la nueva planta preserven una actividad significativa después de pasar por el periodo de la desecación y es posible que la actividad máxima encontrada sea el balance entre su síntesis y degradación.

VI.1.2 Síntesis *de novo* de la enzima.

Analizando la incorporación de Metionina-³⁵S a las proteínas, se observó que en la primera hora había una alta síntesis de proteína tanto membranaral como citosólica y que continuaba sintetizándose proteína después de este tiempo, pero más lentamente. Por otra parte, en un trabajo anterior se había encontrado un enriquecimiento en la cantidad de proteínas de la membrana plasmática a las 2 horas (García-Rubio *et al.* 1997). Es probable que este aumento en proteínas sea exclusivo de esta fracción subcelular y que tenga alguna significancia funcional al inicio de la germinación, ya que la recuperación de la estructura y función de la membrana plasmática al comenzar la hidratación debe ser primordial. Hubiera sido muy útil obtener el patrón de síntesis de la ATPasa de la membrana plasmática por la incorporación de Metionina-³⁵S, sin embargo, como se anotó en la sección de resultados complementarios, ésto no fue posible.

De una manera indirecta se investigó si la enzima sintetizada *de novo* participaba activamente en la hidrólisis del ATP a las 2 horas. Se midió el efecto de la incubación de los embriones con cicloheximida sobre la actividad de la

enzima. Se encontró que la actividad de la enzima disminuía cuando se incubaban los embriones entre la primera y tercera hora de la germinación en presencia de cicloheximida, posiblemente por la disminución en la cantidad de enzima a estos tiempos. Lo anterior apoya los datos de que en el periodo de 1 a 3 horas de imbibición se está llevando a cabo la síntesis de la enzima.

VI.1.3 Niveles de transcritos de la ATPasa

En relación con los niveles de enzima, resultados en el laboratorio (María Consuelo Enríquez, comunicación personal), muestran que a las dos horas de la germinación hay un aumento en los RNAm que codifican para la ATPasa (Figura 13). Estos datos concuerdan con los obtenidos con los anticuerpos sobre la posible ocurrencia de la síntesis *de novo* de la enzima. Sin embargo, aún cuando se detectó una mayor cantidad de los RNAm a las 2h, no es posible asegurar inequívocamente que los RNAm estén siendo traducidos a proteína, lo que redunde en una mayor actividad enzimática. Para confirmar lo anterior tendría que realizarse la traducción *in vitro* de los RNAm y la inmunoprecipitación subsecuente de la enzima.

Por otra parte, la incubación de los embriones con α -amanitina, un inhibidor que bloquea la síntesis de RNAm, produce un decremento en la actividad enzimática cuando los embriones se incuban con el inhibidor entre la primera y tercera hora de incubación. Estos resultados sugieren que en condiciones normales, los embriones sintetizan RNAm durante el periodo comprendido entre la primera y tercera hora de imbibición y que estos transcritos pueden estarse traduciendo a proteína activa. Estos datos son consistentes con la determinación directa de RNAm para la ATPasa como se mencionó anteriormente.

Se ha reportado que la semilla es capaz de reanudar la síntesis del 90% de sus proteínas a partir de los RNAm remanentes y que se encuentran en la semilla seca en un periodo 30 a 90 minutos, aún cuando haya una síntesis activa de nuevos RNAm (Bewley y Black 1994). En el caso de la ATPasa, estos datos podrían apoyar la síntesis tanto de la proteína como de sus transcritos durante las primeras 5 horas de imbibición. La síntesis de proteínas dependiente de los mensajeros "viejos" en semillas de rábano disminuye al 60 % a las 2 horas de imbibición y es cercana al 20% a las 4 horas de imbibición, por lo que la síntesis de nueva proteína en estos tiempos es sustentada principalmente por los RNAm de reciente síntesis (Delseny *et al.* 1977). Nuestros resultados estarían de acuerdo con estos reportes, ya que la proteína sintetizada entre la primera y tercera hora de imbibición provendría preponderantemente de la traducción de mensajeros recién sintetizados.

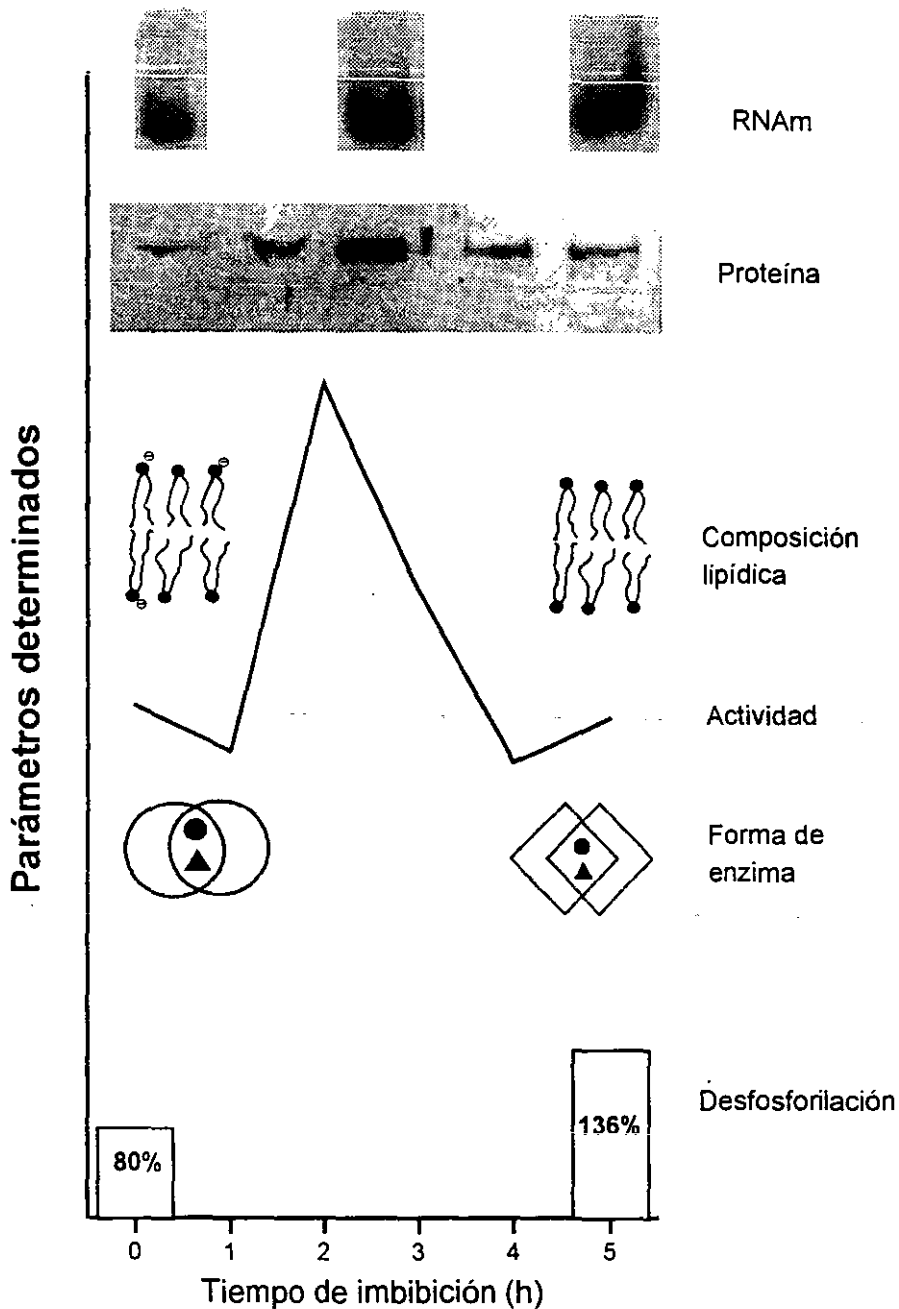


Figura 13. Cambios en los RNAm, proteína, porcentaje de desfosforilación y forma de ATPasa de H^+ que se encuentra en las membranas plasmáticas en la fase inicial de la germinación.

VI.2 Caracterización de la actividad de hidrólisis de ATP

VI.2.1 Características bioquímicas de la enzima

A pesar de que la actividad de ATPasa a las 0 y 5 horas de imbibición es similar en magnitud, ambas actividades enzimáticas pueden ser distinguidas por su diferente sensibilidad a: vanadato, lisofosfatidilcolina, pH y temperaturas altas de preincubación. Se encontró que la enzima de los embriones sin embeber es más sensible al vanadato, a la tripsina y a la lisofosfatidilcolina y más resistente al pH y las temperaturas de desnaturalización, que la enzima de las 5 horas de imbibición. Es probable que esta enzima, que permaneció después del periodo de desecación de la semilla, presente este tipo de características que favorezcan su estabilidad y permanencia en la membrana, para ser capaz de presentar actividad catalítica cuando comience la hidratación de la semilla, mientras ocurre la síntesis de una enzima nueva que la sustituya.

Usando la sensibilidad a vanadato como parámetro que ayudaba a detectar diferencias estructurales en la enzima, podríamos afirmar que el cambio entre una forma y otra se da entre las 3 y 5 horas de imbibición, lo que sugiere que antes de las tres horas de imbibición hay una expresión transcripcional y traduccional de la enzima propia de la semilla en formación y que prevalece después de su desecación, tanto en forma de enzima remanente, como traducida a partir de los transcritos almacenados correspondientes. Es muy probable que una forma enzimática no suceda a la otra de manera abrupta, sino que haya un periodo en el que coexistan, quizás una con predominancia sobre la otra. Desafortunadamente no fue posible evidenciar esto en nuestros experimentos, ya que las formas de detección de mensajeros y proteína no permitieron diferenciar las dos formas enzimáticas y el seguimiento de actividad diferenciada por su sensibilidad a algunos de los factores, que si podría haberlas detectado, no fue hecho tomando varios tiempos entre 3 y 5 horas de imbibición.

Las diferencias en sensibilidad al vanadato podrían explicarse si hubiera ocurrido algún cambio en uno o varios residuos de aminoácidos cercanos al sitio donde se encuentra el aspártico que se fosforila durante la catálisis de la enzima, ya que en la ATPasa de levadura se han realizado mutaciones en varios de estos residuos y se ha encontrado que la Ki por el inhibidor se incrementa y además se obtiene un desplazamiento del pH óptimo (ácido) de la enzima a pHs neutros (Portillo *et al.* 1989; Portillo *et al.* 1991). Asimismo, el efecto diferente del pH y de la temperatura en la actividad de las enzimas de 0 y 5 horas hizo suponer que existen diferencias a nivel estructural en estas dos enzimas.

VI.2.2 Purificación

Para comprobar que las diferencias en las propiedades bioquímicas de la enzima de 0 y 5 horas correspondían a una modificación estructural, se realizó la

purificación de la ATPasa sensible a vanadato de las membranas plasmáticas de los embriones secos y embebidos 5 horas, mediante una columna de intercambio aniónico. Los resultados revelaron que la enzima proveniente de los embriones embebidos 5 horas tenía una menor afinidad por la columna que la enzima de las 0 horas. Con estos resultados y los datos de las propiedades bioquímicas, se concluyó que la enzima que se encontraba en la semilla sin embeber era diferente a la enzima proveniente de los embriones embebidos 5 horas. De manera que la enzima que se encuentra a las 5 horas es una forma diferente a la enzima que se encontraba en la semilla seca, posiblemente por ser el producto de un gene diferente o bien porque la enzima hubiera sido modificada de manera covalente, posiblemente por fosforilación.

Se sabe que la expresión de los genes para la enzima ocurre de manera específica en ciertos tejidos y estadios del desarrollo (Ewing y Bennet 1994; Michelet *et al.* 1994; Moriau *et al.* 1993), de hecho hay evidencias de una forma diferente y exclusiva de ATPasa en semillas en formación de *Arabidopsis thaliana* (AHA10; Harper *et al.* 1994), por lo que la presencia de una isoforma predominante en la embriogénesis y otra en la germinación podría ocurrir. Por otra parte, tanto las diferencias encontradas en el patrón de elución de la columna de intercambio aniónico, como las diferencias en los parámetros bioquímicos, se pueden explicar también por niveles diferentes de fosforilación, de tal manera que si la enzima de las 5 horas estuviera menos fosforilada, tendría menor número de cargas negativas y por ello, tendría un menor tiempo de retención en la columna de MonoQ.

VI.2.3 Modificación covalente de la ATPasa

Se ha descrito que las fosfatasa deben ser activas en la germinación para llevar a cabo la hidrólisis de los fosfatos de varios compuestos como el ácido fítico y los fosfolípidos. Asimismo, las proteasas y las peptidasas son un numeroso grupo de enzimas que aumentan considerablemente durante la germinación y cuya expresión temporal está cuidadosamente regulada en tiempos progresivos de la hidratación. En la germinación temprana se conoce que la mayoría de las proteasas pertenecen al grupo de las metaloendopeptidasas (Bewley y Black 1994). La actividad de fosfatasa o proteasas produciría un aumento en la actividad de la ATPasa, ya que se ha demostrado que la enzima aumenta su actividad cuando se defosforila o pierde el carboxilo terminal (Gómez *et al.* 1996; Lino *et al.* 1998; Olsson *et al.* 1995).

Descartamos la posibilidad de que la proteólisis de la región del carboxilo terminal contribuyera a las diferencias encontradas en los parámetros cinéticos de la enzima de 0 y 5 h, ya que ambas enzimas se activaron por la proteólisis del carboxilo y por el tratamiento con lisofosfatidilcolina. Sin embargo, la diferente respuesta a la LPC sugería que las enzimas podrían ser diferentes en las regiones diferentes a la del carboxilo terminal, ya que se ha postulado que la

interacción LPC-ATPasa involucra varios dominios de la proteína, además del carboxilo terminal (Gómez *et al.* 1996; Olsson *et al.* 1995).

Tanto la enzima de 0 horas como la de 5 horas experimentaron defosforilación y un aumento en la actividad enzimática cuando fueron sometidas al tratamiento con fosfatasa alcalina, sin embargo la enzima de las 0 horas experimentó un aumento menor en la actividad enzimática que la de 5 horas (Figura 13). Estos resultados sugieren que la enzima de las 5 horas podría presentar menos sitios fosforilados, por lo que aún cuando se expusieron el mismo tiempo a la fosfatasa alcalina ambas enzimas (0 y 5 horas), no alcanzan la misma activación. Como se mencionó anteriormente, estos diferentes niveles de fosforilación serían consistentes con el comportamiento de las dos enzimas en la columna de intercambio aniónico.

VI.2.4 Caracterización cinética

Para determinar si las diferencias entre las dos enzimas también se expresaban en sus propiedades cinéticas se realizó la caracterización cinética en las VMP de los embriones secos y embebidos 5 horas. Ambas preparaciones membranales presentaron un comportamiento de cooperatividad negativa frente al sustrato. Dicho comportamiento lo explicamos con la ecuación que propone a la velocidad total observada, como la suma de las actividades de dos componentes (enzimas.o sitios), con comportamiento Michaeliano cada uno.

Con la ecuación anterior se determinaron los parámetros cinéticos de la ATPasa, encontrándose que uno de los componentes presentaba alta afinidad por el sustrato y el otro componente exhibía una baja afinidad por ATPMg; ambos componentes se encontraron en las dos preparaciones de VMP (0 y 5 horas). Sin embargo, ya que en la ATPasa solo existe un sitio de unión a ATP, el comportamiento de cooperatividad negativa se podría explicar si la enzima formara un dímero, en el que cada monómero tendría un sitio para la unión de ATP, pero con distintas afinidades. Además, considerando que a cada tiempo hay una forma diferente de enzima, se tendría que en la semilla seca habría una holoenzima diferente a la de las 5 horas.

Pese a que la enzima de las 0h difería en sus parámetros bioquímicos con la enzima de las 5 horas, no se encontraron diferencias importantes en las constantes cinéticas de las dos enzimas, ya que solo la V_{max} del componente 2 era distinto. Lo anterior nos llevó a plantear que además de los cambios estructurales que estaban ocurriendo en la enzima, había otro factor que también podría estar influenciando su actividad y que probablemente era el medio anfipático que rodea a la enzima.

Con el fin de investigar el posible papel del medio anfipático en la regulación de la actividad de la ATPasa, se midió la actividad en diferentes

medios anfipáticos: en el detergente dodecilmaltósido y en este detergente más fosfolípidos de soya. Se encontró que la enzima presentaba diferencias dramáticas en el comportamiento cinético, dependiendo del medio anfipático que la rodeaba.

El arreglo dimérico que hemos planteado para explicar los datos cinéticos de la enzima, se apoya también en las determinaciones del peso molecular de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de betabel (Briskin *et al.* 1985; Briskin y Niesman-Reynolds 1989) y en los datos cinéticos obtenidos por otros autores (Ramos *et al.* 1994; Roberts *et al.* 1995). Sin embargo, la especie monomérica es capaz de presentar actividad de hidrólisis de ATP y de bombeo de protones, por lo que aún faltarían experimentos que corroboren que en la membrana nativa la enzima es una holoenzima y que este arreglo tuviera alguna función en la modulación de la actividad enzimática.

VI.2.5 Influencia de la composición lipídica en la actividad de la enzima

Es posible que la entrada de agua a la semilla ocasione una modificación transitoria en la actividad de la enzima por la reorganización de la membrana, ya que se tienen evidencias de que el arreglo de los fosfolípidos de la membrana en el estado seco es diferente al del estado hidratado (Crowe *et al.* 1992) y la ATPasa es una enzima muy sensible a los cambios en el medio anfipático que la rodea (Kasamo y Wada 1993; Kasamo y Sakibara 1995).

Resultados anteriores en el laboratorio sugerían que la composición de las vesículas de las membranas plasmáticas de los embriones embebidos 5 horas era diferente a la de los embriones sin embeber, ya que para poder obtener estas membranas se necesitaban utilizar concentraciones diferentes de los polímeros acuosos (ver artículo en el Apéndice), por lo que la carga de superficie de las membranas plasmáticas podría ser diferente. La carga de superficie de las membranas está determinada por su composición de lípidos y de proteínas. Debido a que se ha detectado la actividad de lipooxigenasas en los embriones secos y la modificación de ciertos fosfolípidos al inicio de la germinación (Hung y Kao 1997; Sandoval *et al.* 1995), era probable que la síntesis y degradación de los componentes membranales estuviera ocurriendo y por ello a las 5 horas podría existir una composición membranal diferente que ocasionara algunos de los cambios detectados indirectamente en la carga de superficie.

La composición de fosfolípidos encontrada en las VMP de 5 horas fue similar a la reportada en tejidos de tallos y raíces (Grandmougin-Ferjani 1997; Olsson *et al.* 1994), es decir la FC y la FE estuvieron en proporciones altas en comparación con el porcentaje de FS y FI, mientras que las VMP de los embriones sin embeber presentaron mayoritariamente a la FS y al FI. Este hallazgo confirma que las membranas de las 0h presentan una carga de superficie diferente a las de las membranas hidratadas, ya que la FS y el FI

presentan a pH 7.0 una carga neta de -1. Es interesante encontrar la abundancia de la FS y FI en las membranas de los embriones sin embeber, debido a que las cabezas polares de estos lípidos podrían fácilmente interaccionar por ejemplo con las proteínas LEA y otras moléculas hidrofílicas como la estaquiosa y la rafinosa, que se han propuesto como estabilizadores de macromoléculas y membranas (Williams y Leopold 1989; Bewley y Black 1994).

Por otra parte, ya que hay evidencias en la literatura de que durante la germinación de la semilla se produce un estrés oxidativo, era probable que algunos de los componentes membranales se modificaran por la acción de las especies reactivas de oxígeno. Primero comprobamos que en las membranas provenientes de los embriones embebidos 5 horas había producción de especies reactivas de oxígeno, encontrándose 2 veces más radicales libres en estas membranas que en las VMP de los embriones secos, sin embargo no se encontraron diferencias en los dienos conjugados, que son uno de los productos de la lipoperoxidación. Estos resultados se podrían explicar por la existencia de un sistema antioxidante diferente o más eficiente en la semilla hidratada, para poder contender con las especies reactivas que se generan por la entrada de agua y entonces continuar con el proceso germinativo. Al respecto se tienen evidencias de que la actividad de la superóxido dismutasa aumenta al inicio de la germinación (Puntarulo y Boveris 1990; Stewart y Bewley 1980). Estos resultados y los nuestros sugieren que el proceso de apagamiento de radicales libres y la protección de los componentes membranales deben estarse llevando a cabo activamente al inicio de la germinación.

Las diferencias encontradas en los lípidos membranales pueden influenciar la actividad de la ATPasa, lo cual se confirmó al obtener los parámetros cinéticos de la enzima en diferentes medios anfipáticos. Ya que las constantes cinéticas de la enzima de las 0 y 5 horas de imbibición no presentaron diferencias significativas cuando se encuentran en un ambiente anfipático similar, los resultados nos llevan a proponer que, aún cuando la enzima de las 0 y 5 horas presentan características bioquímicas distintas, ya sea por cambios en la secuencia de aminoácidos, en el grado de fosforilación o en ambos, el ambiente anfipático es también determinante en la expresión de la actividad de la enzima.

VII. Conclusiones

1. Al caracterizar la actividad de hidrólisis de ATP por su sensibilidad a vanadato, lisofosfatidilcolina, temperatura de desnaturalización y pH, se pudo detectar la existencia de dos formas enzimáticas a las 0 y 5 horas de imbibición. Los datos de purificación de la enzima mediante cromatografía de intercambio aniónico, sustentan la existencia de dos diferentes formas de la enzima a las 0 y 5 horas de imbibición. Estas dos formas podrían ser el producto de 2 genes diferentes o corresponder a enzimas con diferente grado de fosforilación o de modificaciones post-traduccionales.
2. Una de las diferencias es el grado de fosforilación, ya que de acuerdo al patrón de defosforilación encontrado es posible plantear que cuando menos la enzima de 5 horas puede presentar menos fosforilación. Los sitios de fosforilación tendrían que estar en regiones diferentes a la del carboxilo terminal, ya que éste se encuentra en ambas enzimas. Este hecho no excluye que las enzima de 0 y 5 horas puedan presentar diferente estructura primaria.
3. De acuerdo a los parámetros cinéticos obtenidos se propone la existencia de dos sitios de unión a ATP: uno de alta y otro de baja afinidad. La cooperatividad que presenta la enzima en membranas nativas y el hecho de que solo puede haber un sitio catalítico en la enzima, lleva a postular la existencia de un arreglo dimérico de la enzima en las membranas nativas tanto en 0 como en 5 h de imbibición.
4. Por los cambios de las constantes cinéticas en los diferentes medios anfipáticos y las diferentes composiciones lipídicas, resulta muy clara la influencia determinante de la membrana en el comportamiento cinético de la enzima. La composición endógena de lípidos en las membranas nativas propicia el arreglo dimérico de la enzima y al mismo tiempo puede estar participando en las respuestas diferentes de las enzimas de 0 y 5 horas a vanadato, LPC, pH y temperatura.

En resumen, en este trabajo se demuestra que en el inicio de la germinación la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática puede estar influenciada por un gran número de factores, dentro de los que encontramos están el cambio de una forma enzimática en los embriones secos por una de los embriones embebidos 5 horas. Es probable que esta última sea diferente a la de la semilla seca en estructura primaria o en el estado de fosforilación y que el ambiente lipídico cambiante en la fase inicial de la germinación influya en las características bioquímicas de la enzima.

Perspectivas

Con el fin de complementar la información que se obtuvo en este trabajo de tesis y reforzar o descartar las posibilidades planteadas sobre los mecanismos que pueden estar involucrados en la regulación de la ATPasa de H⁺ al inicio de la germinación se podrían realizar varios experimentos.

1. Para dilucidar si las diferencias en las constantes bioquímicas y en el patrón de unión de la enzima a la columna de intercambio iónico, se deben a la presencia de formas diferentes de la enzima, ya sea por un diferente grado de fosforilación o porque son proteínas diferentes, se podría realizar lo siguiente:

- Medir la fosforilación *in vitro* de la ATPasa en las vesículas de membrana plasmática provenientes de los embriones embebidos diferentes tiempos.
- Obtener el patrón de expresión de los genes de la ATPasa al inicio de la germinación. Utilizando sondas específicas para los genes que codifican para la enzima, pero que reconozcan secuencias fuera de región codificante, debido a que las diferencias entre las diferentes isoformas de la ATPasa se encuentran localizadas a lo largo de la secuencia y no en regiones específicas, por lo que de preferencia se deben usar sondas que reconozcan las regiones arriba o abajo del gene, ya que se ha planteado que estas podrían estar implicadas en la regulación de la expresión temporal o espacial en el desarrollo de la planta, por lo que habría que diseñar las sondas y detectar a los RNAm en los embriones a los diferentes tiempos de germinación.

2. Para aportar evidencias o comprobar que el arreglo nativo de la enzima es un dímero:

- Medir la actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de proteína o de diferentes efectores (por ejemplo con fusicocina), con el fin de investigar si el comportamiento cinético de la enzima en estas condiciones sugiere la existencia de la holoenzima en las membranas nativas. Se plantea el uso de fusicocina ya que recientemente se ha sugerido que fusicocina podría modular la unión entre la proteína 14-3-3 y la ATPasa y que la proteína 14-3-3 podría interaccionar no solo con la forma monomérica de la enzima, sino más bien con un arreglo dímérico, por lo que sería interesante medir la actividad de la enzima en las membranas nativas y después de su purificación, a diferentes concentraciones de fusicocina y hacer lo mismo pero habiendo tratado a la enzima previamente con tripsina, ya que se ha planteado que la 14-3-3 se une al carboxilo terminal de la enzima. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta estrategia podrían no ser claros y definitivos, por lo que habría que realizar otras determinaciones.
- Medir el peso molecular de la enzima después del tratamiento con agentes entrecruzantes o en la enzima obtenida de un gradiente de glicerol.

3. En vista de que encontramos que la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática de los embriones secos es diferente a la de las membranas plasmáticas de los embriones embebidos 5 horas, sería interesante investigar si la composición de fosfolípidos encontrada puede afectar las propiedades de la membrana a estos tiempos y por lo tanto modificar la actividad de la ATPasa, por lo que se podrían realizar las siguientes determinaciones:

- Medición de la fluidez de la membrana en el periodo de las 0 a las 5 horas. Es factible que haya cambios en la fluidez de la membrana ya que no sólo hay diferente composición de fosfolípidos, sino también de proteína.
- Medir por calorimetría las transiciones de fase de las membranas plasmáticas de los embriones secos y los hidratados 5 horas. En vista de que es posible encontrar diferente temperatura de transición de los lípidos membranales a estos tiempos, ya que se ha planteado que las membranas de los embriones secos presentan una fase de gel mientras que las membranas hidratadas presentan un arreglo líquido-cristalino.
- Detectar arreglos de fosfolípidos que no favorezcan la estructura de líquido-cristalino de la bicapa lipídica, utilizando para ello anticuerpos específicos que reconozcan este tipo de estructuras y comparar la frecuencia de aparición de estos arreglos en las membranas de los embriones secos con respecto a las membranas de los embriones hidratados. La detección tendría que realizarse *in situ* y no en las membranas plasmáticas obtenidas por el reparto en dos fases, debido a que es posible que durante el procedimiento de obtención de las membranas plasmáticas los fosfolípidos se reacomoden y no sea posible observar este tipo de arreglos.

X. Apéndice

En este capítulo se encuentra el artículo sobre la metodología para la preparación de una fracción enriquecida en vesículas de membrana plasmática.

X.1 Purificación de membranas plasmáticas de embriones de maíz secos.
Physiol Plant 101: 157-164, 1997.

Purification of plasma membranes from dry maize embryos

Sobeida Sánchez-Nieto, Oscar García-Rubio, Fermín Pacheco-Moisés, Aquiles Carballo, Rogelio Rodríguez-Sotres and Marina Gavilanes-Ruiz

Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, F., Carballo, A., Rodríguez-Sotres, R. and Gavilanes-Ruiz, M. 1997. Purification of plasma membranes from dry maize embryos. – *Physiol. Plant.* 101: 157–164.

Isolation of subcellular fractions from dry structures such as seeds or their tissues is difficult. In the present work, plasma membranes were isolated from dry maize (*Zea mays* L.) embryos with an enrichment of 11-fold as estimated by glucan synthase II (GSII, EC 2.4.1.34) activity and a purity of 78 to 90% as judged by the sensitivity of ATP hydrolysis to vanadate, a specific inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase (EC 3.6.1.35). The procedure involved a double homogenization of the dry embryos and the addition of a 1 500-g supernatant to an aqueous polyethyleneglycol-dextran two-phase partitioning system; the optimal ratio of polyethyleneglycol-dextran for purification of plasma membranes from dry seeds was 6.8/6.8% (w/w). In the isolated membranes a trace of a tonoplast enzyme marker (tonoplast H⁺-ATPase, EC 3.6.1.3) could be detected, but there were negligible amounts of mitochondrial and rough endoplasmic reticulum markers, H⁺-ATPase (EC 3.6.1.34) and diacylglycerol acyltransferase (EC 2.3.1.20), respectively. The technique could also be used in hydrated embryos. The entire procedure can be carried out in 5 to 6 h. The resulting preparation is stable for at least 2 months at –70°C. The membranes of dry and hydrated embryos exhibited a high level of vanadate-sensitive ATPase activity that was increased by lysophosphatidylcholine.

Key words – Dry seeds, H⁺-ATPase, H⁺-pumps, maize, maize embryos, maize germination, plasma membrane H⁺-ATPase, plasma membrane purification, plasma membrane vesicles, polyethyleneglycol-dextran two-phase partitioning, seed germination, *Zea mays*.

S. Sánchez-Nieto, O. García-Rubio, F. Pacheco-Moisés, R. Rodríguez-Sotres and M. Gavilanes-Ruiz (corresponding author, e-mail gavilan@servidor.unam.mx), Departamento de Bioquímica DEPG, Facultad de Química, Conj. E, UNAM, Cd. Universitaria, 04510, México, D. F. Mexico; A. Carballo, Centro de Botánica, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México, México.

Introduction

Plant seeds are structures that remain quiescent until germination. Their capacity to remain alive through the natural dry period makes them interesting specimens of study. However, some intrinsic characteristics of the dry seeds such as hardness, low water content, high starch amount, and the small size of their living structures make the isolation and characterization of their cellular components difficult (Leopold and Vertucci 1986, Mayer and Poljakoff-Mayber 1989).

Chemical compounds such as oligosaccharides (Amuti and Pollard 1977, Bernal Lugo and Leopold 1992), starch (Mc Cready et al. 1950), amino acids (Marshall et al. 1989), DNA and RNA (Croy et al. 1993), abscisic acid (Walker-Simmons 1987, Wang et al. 1995), ATP, ADP and AMP (Ching 1973, Perl 1980, Thévenot et al. 1989, Siegenthaler and Douet-Orhant 1994) have been extracted from pulverized dry seeds or their dry parts, i.e. endosperms, embryos or embryo axes. In these extracts some enzyme activities have been measured, for example, lipases (Lin et al. 1982), ami-

Received 7 October, 1996; revised 26 March, 1997

noacyl-tRNA synthetases (Anderson and Fowden 1970), phospholipid transfer protein (Grosbois et al. 1989), lipoygenase (Andrianarison and Beneytout 1992) and enzymatic activities involved in oxidative phosphorylation (Pradet 1982, Ehrenshaft and Brambl 1990).

However, relatively few studies have been made in organelles and membranous systems from dry seeds. In fact, only protein bodies (Mikus et al. 1992, Monma et al. 1992, Maeshima et al. 1994), oil bodies (Tzen et al. 1993) and mitochondrial fractions (Wilson and Bonner 1971, Burguillo and Nicolás 1977, Pradet 1982, Ehrenshaft and Brambl 1990, Attucci et al. 1991) have been separated from dry seeds. In the present work, we report the isolation of a highly pure fraction of plasma membrane vesicles from dry maize embryos in which transport and energy coupling may be studied.

Abbreviations - CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazide; DAG-AT, diacylglycerol acyltransferase; H-N, homogenate devoided of the nuclear fraction, i.e. supernatant of the 1 500 g centrifugation; LPC, lysophosphatidylcholine; MF, microsomal fraction; TLCK, *Na-p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; TPCK, *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; U₁, U₂, upper phases after a first and second two-phase partitioning.

Materials and methods

Plant material

Mature dry seeds from the maize (*Zea mays* L.) hybrid A6 62-Montecillo (Colegio de Posgraduados, Edo. de

México), stored at 4°C over silica gel in dark jars, and with 96% of viability were used in the present study. Embryos (approximately 200) were carefully excised from the dry seeds with a scalpel; the endosperm was removed as far as possible. Dry, 1 or 7 h imbibed embryos were used. Imbibition was carried out by plating the embryos in wet filter paper in Petri dishes under sterile conditions at 29°C for 1 or 7 h.

Preparation of plasma membrane vesicles

Plasma membrane vesicles were isolated by the aqueous polymer two-phase partitioning system described by Larsson et al. (1987). The procedure is illustrated in the flow chart of Fig. 1. At the end of each imbibition time (0, 1, or 7 h), batches of 200 embryos (about 5.0 g dry weight) were frozen in liquid N₂. In this state, the embryos were ground with a mortar and pestle to a fine powder. The fine particles were further homogenized with a Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Racine, WI, USA) at 12 000 rpm for 4 min in buffer that contained 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 1 mM ATP, 70 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM β-mercaptoethanol, 4 mM dithiothreitol (DTT), 100 µg ml⁻¹ *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 50 µg ml⁻¹ *Na-p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) and 7 µg ml⁻¹ Chymostatin, at a ratio of 1 ml buffer per gram of fresh weight embryos. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at 1 500 g for

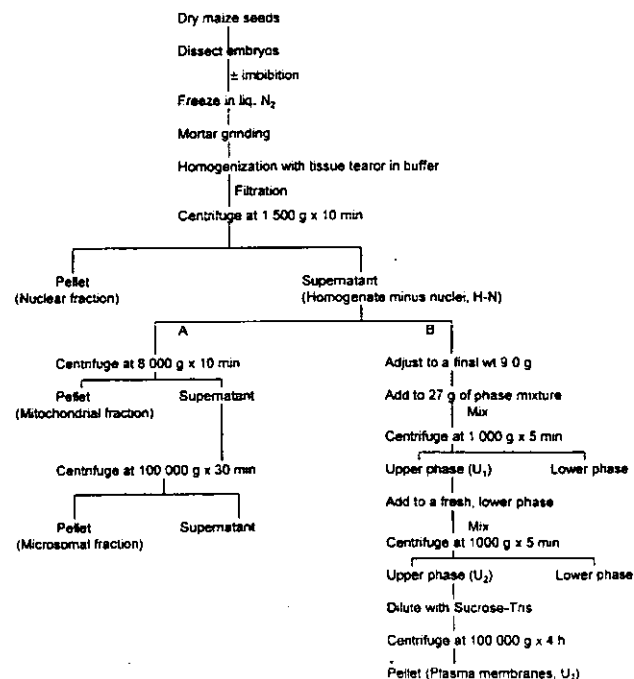


Fig. 1. Obtention of microsomal and purified plasma membranes from dry maize embryos using two-phase partitioning procedure. A and B indicate the independent paths to obtain microsomal fraction (MF) or plasma membrane fraction (U₂).

10 min. The supernatant was added to a polyethylene-glycol (PEG)/dextran two-phase partitioning system (Larsson et al. 1987, 1994) modified as follows. An aliquot of the 1 500-g supernatant (homogenate without the nuclear fraction H-N) with 80–120 mg of total protein (from 4.7 to 5.8 ml starting with 5 g embryos), was adjusted to a final weight of 9.0 g with 0.33 M sucrose, 5 mM KCl and 5 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. This was added to a 27-g phase mixture that contained 6.8% (w/w) dextran T-500, 6.8% (w/w) PEG 3500, 330 mM sucrose, 5 mM potassium phosphate, pH 7.8 and 5 mM KCl. These were the final concentrations in the 36-g mixture. In a range of 1–10 mM of added KCl, 5 mM proved to be the optimal concentration for membrane purification. However, since the H-N fraction that was added to the two-phase partitioning mixture contained Tris-Cl, we measured the amounts of Cl⁻ present in the volumes added, as described by Schales and Schales (1941). The contribution of Cl⁻ from this source was in a range of 0.22 to 0.34 mM, which did not correlate to the extent of purification achieved.

To obtain plasma membrane vesicles from imbedded embryos, the phase mixture contained: 6.7% (w/w) dextran, 6.7% (w/w) PEG, 330 mM sucrose, 5 mM potassium phosphate, pH 7.8 and 5 mM KCl. The contents of the centrifuge tubes were thoroughly mixed by inversion 25 times and centrifuged at 1 000 g for 5 min. The upper phase (U₁, about 20 ml) was transferred to a second tube containing a lower phase (about 16 ml) obtained from the centrifuged phase system (36 g). The procedure of mixing and centrifugation was repeated to obtain U₂, the upper phase of the second partition. U₂ was diluted with 250 mM sucrose and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and centrifuged at 100 000 g for 4 h in order to remove remaining polymers. The final pellet was resuspended in 250 mM sucrose, 10% glycerol, 1 mM DTT, 100 µg ml⁻¹ TPCK, 50 µg ml⁻¹ TLCK, 7 µg ml⁻¹ Chymostatin and 5 mM Tris-HCl, pH 7.0. All steps were performed at 4°C. The suspension was aliquoted and stored at -70°C.

Separating the microsomal fraction

The supernatant of the 1 500-g centrifugation obtained as above was spun down at 8 000 g for 10 min to discard the mitochondrial pellet and the supernatant from this centrifugation was centrifuged at 100 000 g for 30 min to obtain the microsomes, which were resuspended in the same buffer as that of the plasma membrane vesicles.

Enzyme assays

Enzyme markers for tonoplast, mitochondria, plasma membranes (Ray 1979, Briskin et al. 1987, Faraday and Spanswick 1992, Larsson et al. 1994, Toll et al. 1995), and endoplasmic reticulum (Hosaka et al. 1977, Cao and Huang 1986) were measured.

ATP hydrolysis by H⁺-ATPases from tonoplast (EC 3.6.1.3) (nitrate sensitive), mitochondria (EC 3.6.1.34)

(azide sensitive), and plasma membrane (EC 3.6.1.35) (vanadate sensitive) as the respective membrane markers was measured as orthophosphate release from ATP as described by González-Romo et al. (1992). The 150 µl of reaction mixture for ATP hydrolysis contained: 250 mM sucrose, 7 µM carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazide (CCCP), 10 µM ATP/Tris, pH 7.0, and 10 mM MgCl₂. Since a plasma membrane H⁺-ATPase isoform with a K_m for ATP of 1.5 mM has been recently reported (Palmgren and Christensen 1994), a high concentration of ATP was used and the concentration of Mg-ATP was calculated: it was 8.11 mM ATPMg (Sánchez-Nieto et al. 1992). Lysophosphatidylcholine (LPC) at 100 µM was included in the assay mixture, unless it is specified. NaN₃ (2 mM) and 100 mM KNO₃ were included in the ATPase assay and 150 µM sodium orthovanadate was supplemented when indicated. The reaction was initiated by the addition of 3.3 or 10 µg of membrane protein (determined by the amount available) for H-N and microsomal fractions or U₂ fraction, respectively; after 1 or 3 h of incubation (for 10 or 3.3 µg of membrane protein, respectively) at 30°C, the reaction was stopped by adding sodium dodecyl sulphate (SDS) to a final concentration of 12%. P_i release was determined by the colorimetric method of González-Romo et al. (1992).

Glucan synthase II (GSII, EC 2.4.1.34) activity was measured by the incorporation of glucose from UDPG-glucose into 1,3-β-polyglucan according to Ray (1979) and Larsson et al. (1994) with some modifications. One hundred µg of protein was added to a reaction medium containing 330 mM sucrose, 50 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 20 mM cellobiose, 16% glycerol, 0.2 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 2 mM spermine and 0.006% (w/v) digitonin (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) in a final volume of 100 µl. The reaction was started by the addition of 2 mM UDP[³H] glucose (20 GBq mol⁻¹, DuPont NEN Research Products, Boston, MA, USA; this reagent was a kind gift from Dr Irma Bernal-Lugo) and after 1 h at 25°C, cold ethanol at a final concentration of 70% was added to stop the reaction. Then, heated membranes (100 µg of protein) were added as carriers to this mixture, thereafter centrifuged at 13 000 g for 10 min in an Eppendorf microfuge Mod. 5415C. The pellet was resuspended in 300 µl of 70% ethanol and 2 mM UDPG was added to wash the non-incorporated label. This wash was repeated one more time, centrifuged and the final pellet was resuspended in 300 µl of water and thoroughly dispersed. The suspension was transferred to 5.0 ml of scintillation liquid and the radioactivity counted.

Diacylglycerol acyl transferase (DAG-AT, EC 2.3.1.20), a rough endoplasmic reticulum marker, was measured by incorporation of oleic acid from [¹⁴C]-oleoyl CoA to triacylglycerol by the method of Hosaka et al. (1977) with the following modifications: 150 µl of a reaction mixture consisting of 84 mM sucrose, 100 mM Tris/HCl, pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 400 µM diacylglycerol, 300 µM CoA, 30 µM Coenzyme A [oleoyl-1-¹⁴C]-oleoyl

(74 kBq per assay, 1.628 TBq mol⁻¹, DuPont NEN Research Products) and 0.2% (v/v) Tween 20 was incubated with 15 µg of membrane protein for 25 min at 30°C. The reaction was stopped with 500 µl of a chloroform-methanol mixture (1/1, v/v) followed by the addition of 250 µl of 1% (w/v) NaCl. After phase separation, the organic phase was collected and dried and the residue was suspended in benzene and applied to 60F254 silica gel plates 20 cm long (Aldrich Chem. Co.). The chromatography was run with a mixture of hexane:diethylether:acetic acid, 80:20:1, at room temperature. The spots were visualized after exposition in a chamber with I₂, recovered and counted in a scintillation counter. Every experimental point was made in triplicate and all experiments were repeated at least twice with three to nine different membrane preparations. Data shown are representative or the mean of at least three experiments.

Protein determination

This was done according to the Lowry procedure modified by Peterson (1977).

Electron microscopy

A sample of 50 µl from the purified plasma membranes was fixed in 200 µl of 3% (v/v) glutaraldehyde, the mixture was centrifuged at 6000 g for 5 min in a Beckman E microcentrifuge and without discarding the glutaraldehyde, the tubes were incubated for 2 h at 4°C to complete fixation and then recentrifuged. The pellet was suspended in 100 mM potassium phosphate pH 7.2. The buffer was eliminated by centrifugation and replaced by a 2% (w/v) osmium tetroxide solution and kept at 4°C for 2 h. After centrifugation, the supernatant was discarded and replaced by phosphate buffer. The sample was stepwise dehydrated starting with a 30% ethanol solution and ending with an absolute ethanol solution. The dehydrated sample was infiltrated in propylene oxide and Epon 812 (1:1 ratio) for 48 h. The sections were contrasted with 2% (w/v) uranyl acetate for 30 min and lead acetate for 30 min. Sections were examined in a JEOL 1200EX-II electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

Solvents were purchased from J. T. Baker or Merck, Mexico. The chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (except when indicated).

Results

The initial steps for purification of plasma membrane vesicles by the aqueous polymer two-phase partitioning method differed from those used for normally hydrated tissues, such as mesocotyls, hypocotyls and roots from non-photosynthetic seedlings or from green leaves or stems (Larsson et al. 1984, Palmgren et al. 1990, Cowan et al. 1993). One modification was a thorough double homogenization of the tissue, which increased the yield

Tab. 1. Recovery of purified plasma membrane vesicles from dry and hydrated embryos. Five grams of dry or 7 h-imbibed embryos (ca 200) were homogenized and centrifuged at 1500 g. The supernatant of the nuclear fraction (homogenate without the nuclear fraction, H-N), was applied to a two-phase partitioning system to obtain the U₂ fraction (purified plasma membrane vesicles), as described under Materials and methods.

Starting material	Total protein (mg)		Yield (%)
	H-N	U ₂	
Dry embryos	306 ± 6	1.2 ± 0.15	0.40
Hydrated embryos	288 ± 22	0.78 ± 0.22	0.27

of plasma membranes. This probably resulted in a higher yield of broken cells and further fragmentation of relatively large plasma membrane sections, thereby increasing the recovery of small vesicles after the centrifugation at 100 000 g for 4 h. A second modification was to load the homogenate (without the nuclear fraction), instead of the microsomal fraction, directly to the aqueous two-phase partitioning mixture; this further improved the yield of purified plasma membranes, as compared to the low yield obtained when microsomal fraction was loaded (results not shown). This step also decreased the centrifugation time (see Tab. 1), since in this procedure it is not necessary to sediment the mitochondrial and microsomal fractions. For example, when 300 mg of total protein from the homogenate devoided of the nuclear fraction (H-N) was directly loaded to the partitioning system, 1.201 mg of protein (a yield of 0.4%) in the U₂ fraction was recovered. In the case of the microsomal fraction added to the partitioning system instead of the whole homogenate (see Fig. 1), the recovery of the plasma membrane vesicles was of 0.052 mg of protein (a yield of 0.17), which is 23-fold less protein, and the time required for preparing the membranes in the latter case was about 2 h longer. In our procedure the yield of membrane protein from dry embryos was 1.48-fold higher than when hydrated embryos were the starting material (Tab. 1), on the basis of similar extent of purification (see Tab. 6).

Tab. 2. Effect of polymer concentrations on the purification of plasma membrane vesicles from dry embryos. An amount of 110 mg of protein in the supernatant of the nuclear fraction was loaded to a phase system containing the indicated polymer concentrations. The U₂ fraction was obtained and the vanadate-sensitive ATP hydrolysis was measured as described under Materials and methods; it is expressed as nmol P_i mg⁻¹ h⁻¹ and as percent of total ATP hydrolysis, which was measured in the absence of vanadate.

Concentration of PEG (%)/dextran (%)	ATPase activity		
	Total	Vanadate-sensitive	(%)
6.5/6.5	403±68	230±11	58.5±4.5
6.7/6.7	830±43	320±12	39.1±3.8
6.8/6.8	1560±101	1370±58	88.0±4.2

It has been documented that in the two-phase partitioning procedure the polymer concentrations (PEG and dextran) have to be adjusted for each particular case (Briskin et al. 1987, Larsson et al. 1987). To this purpose, various concentrations of dextran and PEG were explored. As inferred from the enrichment of the vanadate-sensitive ATPase activity, Tab. 2 shows that among the concentrations assayed, 6.8% of each polymer gave the best results.

Under the electron microscope (Fig. 2), the vanadate-sensitive ATPase-enriched fraction exhibited an homogeneous population of membrane vesicles similar to that of other plasma membrane preparations that have been previously described from other sources (Du Pont and Leonard 1980, Yoshida et al. 1983, Canut et al. 1988, Johansson et al. 1995, Toll et al. 1995).

For producing plasma membrane vesicles with almost identical vanadate-sensitive ATPase activity, it was necessary to apply a defined amount of protein to the partitioning mixture. Table 3 shows that the amount of the homogenate protein loaded to the phase system affected the extent of purification of the plasma membranes. The highest enrichment in plasma membrane vesicles was obtained when 107 mg of protein (H-N fraction) was loaded to the partitioning system. No correlation between the volume of H-N fraction added to the phase system and the purification achieved was found (see Tab. 3 heading). The vanadate-sensitive ATPase activity of the vesicles obtained when 107 mg of protein was loaded, was stimulated 4.3-fold by LPC. Taken together, the results indicate that the amount of protein loaded to the phase mixture may influence the amount, purity and polarity of the vesicles obtained.

The purity of the plasma membrane fraction was assessed by measuring the enzymatic activity of markers for endoplasmic reticulum, tonoplast, mitochondria and plasma membranes (Tabs 4 and 5). The enzymatic activities were determined in fractions devoided of nuclei (H-N), in the microsomal fraction (MF) and in the purified membranes (U₂ fraction) (see Fig. 1). Table 4 shows that in going from the H-N to the microsomal and U₂ fractions, there was a marked decrease of all the measured activities. However, it must be noted that the decreases of the tonoplast and mitochondrial markers (nitrate- and azide-sensitive ATPases, respectively) were much higher than those of the two plasma membrane markers. For instance, the recovery of the glucan synthase II in the U₂ fraction was 6%, whereas that of the mitochondrial marker was 0.05%. The endoplasmic reticulum marker also showed a significant decrease in specific activity from the H-N to the U₂ fraction as compared to the glucan synthase II activity in the same fractions.

The specific activities of the several membrane markers are shown in Tab. 5. The plasma membrane ATPase (vanadate-sensitive), contributed to 85% of the total ATPase activity of the U₂ fraction; the rest was due to the mitochondrial (11%) and the tonoplast (2%)



Fig. 2. Electron micrographs of microsomal fraction (MF), and isolated plasma membranes (U₂ fraction) stained with the uranyl-lead technique. A, microsomal fractions were obtained and stained as described under Materials and methods. B, after purification with the two-phase partitioning procedure, 50 μ l of the isolated membranes was fixed, dehydrated, infiltrated and the sections contrasted as described under Materials and methods. Bar length, 200 nm.

ATPases. The specific activity of the rough endoplasmic reticulum marker, DAG-AT was also reduced in the

Tab. 3. Effect of the protein amount applied to a phase partitioning system on the recovery of plasma membrane vesicles. The indicated protein amounts of the supernatant from the nuclear fraction (H-N) were loaded to a phase partitioning system as described under Materials and methods. The volumes containing 80, 107 and 120 mg of total protein added were 5.8 ± 0.7 , 4.7 ± 0.4 and 5.0 ± 0.2 ml, respectively. The U_2 fractions were recovered and 3 μ g of membrane protein was added to a reaction medium to measure ATP hydrolysis in the absence (total activity) or in the presence of orthovanadate (vanadate-sensitive activity) in the reaction mixture. Lysophosphatidylcholine (LPC) was absent when indicated. ATP hydrolysis is expressed in $\text{nmol P, mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Values in parenthesis indicate the percentage of vanadate-sensitive ATPase with respect to total ATP hydrolysis.

Protein (mg)	ATPase activity			
	- LPC		+LPC	
	Total	Vanadate-sensitive	Total	Vanadate-sensitive
80	704 \pm 37	513 \pm 24 (72.9)	2126 \pm 109	1467 \pm 22 (69.0)
107	730 \pm 43	445 \pm 19 (61.0)	1902 \pm 54	1960 \pm 137 (103)
120	917 \pm 52	261 \pm 5 (28.5)	1930 \pm 151	396 \pm 8 (20.5)

plasma membrane fraction relative to the H-N fraction. A comparison of the U_2 /H-N ratio as purification index (Tab. 5), shows that although the higher ratios were for the conventional plasma membrane markers, vanadate-sensitive ATPase and glucan synthase II, the ratios were significantly different, 0.75 and 11.0, respectively. This difference suggests that inactivation of the ATPase took place during the experimental procedure, and illustrates the necessity of using more than one marker for a given membrane or organelle. Nonetheless, the enrichment of the glucan synthase II activity and the high level of the vanadate-sensitive ATPase in the U_2 fraction, indicate that important purification of the plasma membranes was achieved. These data are in consonance with the electron micrographs of this fraction (Fig. 2).

The described procedure was also used to obtain the plasma membrane of hydrated embryos. The results were compared to those obtained with dry embryos. The level of purification was similar in both preparations (Tab. 6); however, it is noteworthy that different polymer concentrations had to be used. For example in dry tissues, 6.8% of polymer turned out to be optimal for pu-

rification of the plasma membranes, whereas 6.7% worked better for the hydrated ones (Tabs 2 and 6).

Discussion

The lack of techniques that allow a good purification of membranes from dry seeds has hindered the study of their biochemical properties. During the last years, aqueous two-phase partitioning systems have been used to purify plasma membrane vesicles from plant cells (Larsson et al. 1987, 1994). Recently, some modifications to the methodology were described; these are based on the special characteristics of the membrane i.e. agglutinability (aleurone layers, Walker et al. 1993) and ageing (etiolated hypocotyls, Stallaert et al. 1994). Here, we describe a procedure that allows the isolation of plasma membranes from dry maize embryos. The extent of purification was high, considering the activity of one plasma membrane marker (GSII) and the electron microscopy appearance obtained from the U_2 fraction; similar purification has been previously achieved in other preparations, but the reported methodology involved two additional partitionings (Faraday and Spanswick 1992, Stallaert et al. 1994). Also it is relevant to point out that the described procedure works equally well with hydrated

Tab. 4. Total protein and marker enzyme activities in subcellular fractions from dry embryos. Twenty grams of dry embryos were processed as described in Fig. 1 (note that MF, microsomal fraction and U_2 , plasma membrane fraction, were independently obtained from H-N fraction). Enzymatic assays were carried out as described under Materials and methods. All activities are given in $\mu\text{mol h}^{-1}$, except for DAG-AT (nmol h^{-1}); yield is indicated (in brackets) as % of H-N, which is 100%. ^a ATPase activity measured in the presence of Mg^{2+} and in the absence of any inhibitor; ^b ATPase activity measured in the presence of Mg^{2+} and sensitive to the indicated inhibitor.

Parameter	H-N	MF	U_2
Volume (ml)	58.0	13.05	3.11
Total protein (mg)	894.4	114.2	3.79 (0.42)
Mg-ATPase ^a	4351	251.8	6.09 (0.14)
Mg-ATPase azide ^b	1301	35.38	0.70 (0.05)
Mg-ATPase nitrate ^b	1327	96.81	0.14 (0.01)
Mg-ATPase vanadate ^b	1632	119.44	5.16 (0.32)
Glucan synthase II	13.42	7.08	0.83 (6.16)
DAG-AT	366.7	46.81	0.27 (0.07)

Tab. 5. Specific activities of subcellular fractions from dry embryos. Twenty grams of dry embryos were processed as described in Fig. 1 (note that microsomal and U_2 fractions were independently obtained from H-N fraction). Enzymatic assays were done as described under Materials and methods. Activities are expressed in $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, except for DAG-AT ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). ^a ATPase activity sensitive to the indicated inhibitor.

Enzyme	Activity			
	H-N	MF	U_2	U_2 /H-N
Mg-ATPase	4.87	2.20	1.61	
Mg-ATPase azide ^a	1.46	0.31	0.18	0.13
Mg-ATPase nitrate ^a	1.48	0.85	0.04	0.03
Mg-ATPase vanadate ^a	1.82	1.05	1.36	0.75
Glucan synthase II	0.02	0.06	0.22	11.0
DAG-AT	0.41	0.41	0.07	0.17

Tab. 6. ATPase activity of purified plasma membranes from dry and hydrated maize embryos. Plasma membranes were purified and the two-phase partitioning system used contained the indicated PEG/dextran concentrations. Vanadate-sensitive ATP hydrolysis was measured with 3.3 mg of membrane protein at 8.11 mM ATPMg and the released P_i was quantitated as described under Materials and methods. Absolute values for vanadate-sensitive plasma membrane activity were 723.7±51.8, 970.2±9.7 and 367.3±6.9 nmol P_i mg⁻¹ h⁻¹ for 0, 1 and 7 h, respectively.

Imbibition time h	PEG (%) / dextran (%)	Vanadate sensitivity (%)
0	6.8/6.8	76.7
1	6.7/6.7	78.1
7	6.7/6.7	75.8

embryos, although different concentrations of polymers must be used. This may reflect a change in membrane lipid and protein composition during early hydration of the embryo or differences in membrane organization, since it has been proposed that membranes from orthodox seeds undergo gel to liquid-crystalline phospholipid transitions upon water imbibition, with a concomitant effect in membrane properties (Seewaldt et al. 1981, Pradet 1982, Crowe and Crowe 1986, Crowe et al. 1992).

One characteristic of our membrane preparation is that LPC stimulates ATPase activity when conditions for optimal protein loading are used. These findings agree with studies in other tissues such as oat roots (Sandström et al. 1987), soybean seedlings (Canut et al. 1988), maize roots (Galtier et al. 1988), and sugar beet leaves (Palmgren et al. 1990), where a latency of the plasma membrane H⁺-ATPase and other enzyme activities has been described. The studies in which the two-phase partitioning technique has been used show that a population of plasma membrane vesicles with a right-side-out orientation predominates (Larsson et al. 1984, Johansson et al. 1995). Inside-out orientations higher than 80% have been obtained by methodologies that involve free flow electrophoresis (Canut et al. 1988, Palmgren et al. 1990), treatment of membranes with freeze-thaw cycles, or incubation in the presence of the detergent Brij 58 (Palmgren et al. 1990, Johansson et al. 1995).

With the technique described, the amount of plasma membrane vesicles obtained is large enough to carry out enzymatic and other biochemical assays. The procedure is relatively fast, considering that it can be completed in 6 h, and that the ATPase activity of the preparation is stable for at least 1 month at -70°C.

Acknowledgments - The authors are indebted to Drs Marietta Tuena de Gómez-Puyou and Irma Bernal-Lugo for helpful discussions along this work, and to Drs Armando Gómez-Puyou, Marietta Tuena de Gómez-Puyou and Diego González-Halphen for critical reading of the manuscript. The help of Chem. Vanessa Maya-Ampudia to measure the GS-II activity and the excellent technical assistance of Jorge Sepúlveda-Sánchez, Rod-

olfo Paredes-Díaz and Consuelo Enríquez-Arredondo are gratefully acknowledged. We thank Dr Georges Dreyfus for the use of the electron microscopy facilities at the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. This work was financially supported by Grants IN2066-91 from DGAPA, 5327 from PADEP, UNAM and 4836-N 9406 from CONACyT, México. SSN was supported by a DGAPA-UNAM fellowship.

References

- Amuti, K. S. & Pollard, C. J. 1977. Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. - *Phytochemistry* 16: 529-532.
- Anderson, J. W. & Fowden, L. 1970. Properties and substrate specificities of the phenylalanyl-transfer-ribonucleic acid synthetases of *Aesculus* species. - *Biochem. J.* 119: 677-690.
- Andrianarison, R. H. & Beneytout, J. L. 1992. Appearance of new lipoxygenase isozymes during seedling germination of *Vicia sativa*. - *Plant Sci.* 87: 143-150.
- Attucci, S., Carde, J. P., Raymond, P., Saint-Gès, V., Spiteri, A. & Pradet, A. 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. - *Plant Physiol.* 95: 390-398.
- Bernal-Lugo, I. & Leopold, C. A. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. - *Plant Physiol.* 98: 1207-1210.
- Briskin, D. P., Leonard, R. T. & Hodges, T. K. 1987. Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. - *In Methods in Enzymology* (L. Packer and R. Douce, eds), Vol. 148, pp. 542-558. Academic Press, San Diego, CA. ISBN 0-12-182048-3.
- Burguillo, P. F. & Nicolás, G. 1977. Appearance of an alternate pathway cyanide-resistant during germination of seeds of *Cicer arietinum*. - *Plant Physiol.* 60: 524-527.
- Canut, H., Brightman, A., Boudet, A. M. & Morré, D. J. 1988. Plasma membrane vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by preparative free-flow electrophoresis. - *Plant Physiol.* 86: 631-637.
- Cao, Y. Z. & Huang, H. C. 1986. Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and other species. - *Plant Physiol.* 82: 813-820.
- Ching, M. T. 1973. Adenosine triphosphate content and seed vigor. - *Plant Physiol.* 51: 400-402.
- Cowan, D. S. C., Clark, D. T. & Hall, J. L. 1993. A comparison between the ATPase and proton pumping activities of plasma membranes isolated from the stiele and cortex of *Zea mays* roots. - *J. Exp. Bot.* 44: 983-989.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. & Crowe, L. M. 1992. Anhydrobiosis. - *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- Crowe, M. & Crowe, L. J. 1986. Hydration dependent phase transitions and permeability properties of biological membranes. - *In Membranes, Metabolism and Dry Organisms* (C. Leopold, ed.), pp. 211-230. Cornell University Press, Ithaca, NY. ISBN 0-8014-1979-4.
- Croy, E. J., Ikemura, T., Shirsat, A. & Croy, R. R. D. 1993. Plant nucleic acids. - *In Plant Molecular Biology LabFax* (R. R. D. Croy, ed.), pp. 21-48. Bios Scientific Publishers/Academic Press, Oxford. ISBN 0-12-198370-6.
- Du Pont, F. M. & Leonard, R. T. 1980. Solubilization and partial purification of the adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. - *Plant Physiol.* 65: 931-938.
- Ehrenshaft, E. & Brambl, R. 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. - *Plant Physiol.* 93: 295-304.
- Faraday, C. D. & Spanswick, R. M. 1992. Maize root plasma membranes isolated by aqueous polymer two-phase partitioning: Assessment of residual tonoplast ATPase and pyrophosphatase activities. - *J. Exp. Bot.* 43: 1583-1590.
- Galtier, N., Belver, A., Gibrat, R., Grouzis, J. P., Rigaud, J. & Grignon, C. 1988. Preparation of corn root plasmalemma with low Mg-ATPase latency and high electrogenic H⁺ pumping activity after phase partitioning. - *Plant Physiol.* 87: 491-497.

- González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. & Gavilanes-Ruiz, M. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. - *Anal. Biochem.* 200: 235-238.
- Grosbois, M., Guerbette, F. & Kader, J. C. 1989. Changes in level and activity of phospholipid transfer protein during maturation and germination of maize seeds. - *Plant Physiol.* 90: 1560-1564.
- Hosaka, K., Schiele, U. & Numa, S. 1977. Diacylglycerol acyl-transferase from rat liver microsomes. Separation and acyl-donor specificity. - *Exp. J. Biochem.* 76: 113-118.
- Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M. & Larsson, C. 1995. Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. - *Plant J.* 7: 165-173.
- Larsson, C., Kjellbom, P., Widell, S. & Lundborg, T. 1984. Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems. - *FEBS Lett.* 171: 271-276.
- , Widell, S. & Kjellbom, P. 1987. Preparation of high purity plasma membranes. - *In Methods in Enzymology* (L. Packer and R. Douce, eds), Vol. 148, pp. 558-568. Academic Press, San Diego, CA. ISBN 0-12-182048-3.
- , Sommarin, M. & Widell, S. 1994. Aqueous two-phase systems. - *In Methods in Enzymology* (H. Walter and G. Johansson, eds), Vol. 228, pp. 451-469. Academic Press, San Diego, CA. ISBN 0-12-182129-3.
- Leopold, A. C. & Vertucci, C. W. 1986. Physical attributes of desiccated seeds. - *In Membranes Metabolism and Dry Organisms* (A. C. Leopold, ed.), pp. 23-34. Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY. ISBN 0-8014-1979-4.
- Lin, Y. H., Moreau, R. A. & Huang, A. H. C. 1982. Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings. - *Plant Physiol.* 70: 108-112.
- Maeshima, M., Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y. & Nishimura, M. 1994. Accumulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and H⁺-ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds. - *Plant Physiol.* 106: 61-69.
- Marshall, H. F., Shaffer, G. P. & Conkerton, E. J. 1989. Free amino acid determination in whole peanut seeds. - *Anal. Biochem.* 180: 264-268.
- Mayer, A. M. & Poljakoff-Mayber, A. 1989. *The Germination of Seeds*. - Pergamon Press, New York, NY, pp. 3-21. ISBN 0-08-035722-9.
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silveira, V. & Owens, H. S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. - *Anal. Chem.* 22: 1156-1158.
- Mikus, M., Bobák, M. & Lux, A. 1992. Structure of protein bodies and elemental composition of phytin from dry germ of maize (*Zea mays* L.). - *Bot. Acta* 105: 26-33.
- Monma, M., Sugimoto, T., Hashizume, K. & Saito, K. 1992. Biogenesis of protein bodies in embryonic axes of soybean seeds (*Glycine max* cv. Enrei). - *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1036-1040.
- Palmgren, M. G. & Christensen, G. 1994. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. - *J. Biol. Chem.* 269: 3027-3033.
- , Askerlund, P., Fredrikson, K., Widell, S., Sommarin, M. & Larsson, C. 1990. Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. Optimal conditions for formation and separation. - *Plant Physiol.* 92: 871-880.
- Perl, M. 1980. An ATP synthesizing system in seeds. - *Planta* 149: 1-6.
- Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. - *Anal. Biochem.* 83: 346-356.
- Pradet, A. 1982. Oxidative phosphorylation in seeds during the initial phases of germination. - *In The Physiology and Biochemistry of Seeds* (A. A. Khan, ed.), pp. 347-369. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. ISBN 0-444-80423-4.
- Ray, P. M. 1979. Maize coleoptile cellular membranes bearing different types of glucan synthase activity. - *In Plant Organelles* (E. Reid, ed.), pp. 135-146. Ellis Horwood, Chichester, London. ISBN 0-85312-123-0.
- Sandstrom, R. P., DeBoer, A. H., Lomax, T. L. & Cleland, R. E. 1987. Latency of plasma membrane H⁺-ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning. - *Plant Physiol.* 85: 693-698.
- Sánchez-Nieto, S., Rodríguez-Sotres, R., González-Romo, P., Bernal-Lugo, I. & Gavilanes-Ruiz, M. 1992. Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize lines of high or low vigour. - *Seed Sci. Res.* 2: 105-111.
- Schales, B. & Schales, S. S. 1941. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. - *J. Biol. Chem.* 140: 879.
- Seewaldt, V., Priestley, D. A., Leopold, A. C., Feigenson, G. W. & Goodsaid-Zalduendo, F. 1981. Membrane organization in soybean seeds during hydration. - *Planta* 152: 19-23.
- Siegenthaler, P. A. & Douet-Orhant, V. 1994. Relationship between the ATP content measured at three imbibition times and germination of onion seeds during storage at 3, 15 and 30°C. - *J. Exp. Bot.* 45: 1365-1371.
- Stallaert, V. M., Cooke, D. T. & Geuns, J. M. C. 1994. Isolation of plasma membranes from mung bean hypocotyl sections by two-phase partitioning: Suitability of the technique for ageing tissues. - *Physiol. Plant.* 90: 671-678.
- Thévenot, C., Côté, S. E. & Gendraud, M. 1989. Triphosphate nucleoside metabolism in dormant and non-dormant apple embryos. - *J. Plant Physiol.* 135: 138-143.
- Toll, E., Castillo, F. J., Crespi, P., Crevecoeur, M. & Greppin, H. 1995. Purification of plasma membranes from leaves of conifer and deciduous tree species by phase partitioning and free-flow electrophoresis. - *Physiol. Plant.* 95: 399-408.
- Tzen, J. T. C., Cao, Y. Z., Laurent, P., Ratnayake, C. & Huang, A. H. C. 1993. Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from diverse species. - *Plant Physiol.* 101: 267-276.
- Walker, R. P., Waterworth, M. W. & Hooley, R. 1993. Preparation and polypeptide composition of plasma membrane and other subcellular fractions from wild oat (*Avena fatua*). - *Physiol. Plant.* 89: 388-398.
- Walker-Simmons, M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. - *Plant Physiol.* 84: 1-66.
- Wang, M., Heimovaara-Dijkstra, S. & van Duijn, B. 1995. Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. - *Planta* 195: 586-592.
- Wilson, S. B. & Bonner, W. D. 1971. Studies on electron transport in dry and imbibed peanut embryos. - *Plant Physiol.* 48: 340-344.
- Yoshida, S., Vemiera, M., Niki, T., Sakai, A. & Gusta, L. 1983. Partitioning of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. - *Plant Physiol.* 72: 105-114.

X. BIBLIOGRAFIA

- Anthon GE, Spanwick RM (1986) Purification and properties of the H⁺-translocating ATPase from the plasma membrane of tomato roots. *Plant Physiol* 81: 1080-1085
- Attuci S, Carde JP, Raymond P, Saint-Ges V, Spiteri A, Pradet A (1991) Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiol* 95: 390-398
- Baizabal-Aguirre VM, González de la Vara LE (1994) Characterization of the protein kinase activity in beet root plasma membranes. *Physiol Plant* 91: 147-154
- Baizabal-Aguirre VM, González de la Vara LE (1997) Purification and characterization of a calcium-regulated protein kinase from beet root (*Beta vulgaris*) plasma membranes. *Physiol Plant* 99: 135-143
- Balke EN, Hodges TK (1975) Plasma membrane adenosine triphosphatase of oat roots. Activation and inhibition by Mg²⁺ and ATP. *Plant Physiol* 55: 83-86
- Bewley JD (1986) Membrane changes in seed as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: McDonald MB, Nelson CJ (eds) *Physiology of seed deterioration*. CSSA, Madison, pp 27-45
- Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum, New York, pp 147-197
- Bidwai AP, Takemoto JY (1987) Bacterial phytotoxin, syringomycin, induces a protein kinase-mediate phosphorylation of red beet plasma membrane polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7849-7851
- Bidwai AP, Zhang L, Bachmann RC, Takemoto JY (1988) Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin syringomycin. Stimulation of red beet plasma-membrane ATPase activity. *Plant Physiol* 83: 39-43
- Blein JP, Bourdil F, Rossignol M, Scalla R (1988) *Cercospora beticola* toxin inhibits vanadate-sensitive H⁺ transport in corn root membrane vesicles. *Plant Physiol* 88: 429-434
- Boutry M, Michelet B, Goffeau A (1989) Molecular cloning of a family of plant genes encoding a protein homologous to plasma membrane H⁺-translocating ATPases. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 567-574
- Bowman BJ, Berenski CJ, Jung CY (1985) Size of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Neurospora crassa* determined by radiation inactivation and comparison with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase from skeletal muscle. *J Biol Chem* 260: 8726-8730
- Brauer D, Tu S-I (1989) Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol* 89: 867-874
- Briskin DP (1990) The plasma membrane H⁺-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function. *Biochim Biophys Acta* 1019: 95-109.
- Briskin DP, Baus S, Ho I (1992) Studies on the reaction mechanism and transport function of P-type ATPases associated with the plant plasma membrane. In:

- Cooke DT, Clarkson DT (eds), Transport and receptor proteins of plant membranes, Plenum press, New York, pp 13-24
- Briskin DP, Gawienowski MC (1996) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in K⁺ transport. *Plant Physiol* 111: 1199-1207
- Briskin DP, Hanson JB (1992) How does the plant plasma membrane H⁺-ATPase pump protons? *J Exp Bot* 43: 269-289
- Briskin DP, Niesman-Reynolds I (1989) Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol* 90: 394-397
- Briskin DP, Poole RJ (1983) Role of magnesium in the plasma membrane ATPase of reed beet. *Plant Physiol* 71: 969-971
- Briskin DP, Thornely WR, Rotti-Rotti JL (1985) Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol* 78: 642-644
- Brooker RJ, Slayman CW (1983) Effects of Mg²⁺ ions on the plasma membrane [H⁺]-ATPase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 22: 8833-8338
- Campos F, Pérez-Catiñeira JR, Villalba JM, Culiñez-Marcía FA; Sánchez F, Serrano R (1996) Localization of plasma membrane H⁺-ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* 32: 1043-1053
- Cocucci S, Cocucci M (1977) Effect of ABA, GA₃ and FC in germinating radish seeds. *Plant Sci Lett* 10: 85-95
- Cooke DT, Burden RS (1990) Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol Plant* 78: 153-159
- Cosgrove DJ (1997) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041
- Cowan DSC, Cooke DT, Clarkson DT, Hall JL (1993) Lipid and sterol composition of plasma membranes isolated from stele and cortex of maize roots. *J Exp Bot* 44: 991-994
- Crowe LM, Crowe JH (1986) Hydration-dependent phase transitions and permeability properties of biological membranes. In: Leopold AC (ed) *Membranes, metabolism and dry organisms*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, pp 210-229
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54: 579-599.
- Chadwick CC, Goormaghtigh E, Scarborough GA (1987) A hexameric form of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys* 252: 348-356
- DeBoer B (1997) Fusicochin- a key to multiple 14-3-3 locks? *Trends Plant Sci* 2: 60-66
- Delsens M, Aspart L, Guitton Y (1977) *Planta* 135: 125-128
- DeMichelis MI, Plugariello MC, Rasi-Caldogno F (1989) Fusicochin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. I Characteristics and intracellular localization of the fusicochin receptor in microsomes from radish seedlings. *Plant Physiol* 90: 133-139

- DeMichelis MI, Spanswick RM (1986) H⁺-Pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol* 81: 542-547
- DeWitt ND, Harper JF, Sussman MT (1991) Evidence for plasma membrane proton pump in phloem cell of higher plants. *Plant J* 1: 121-128
- Dupont FM, Leonard RT (1980) Solubilization and partial purification of the adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. *Plant Physiol* 65: 931-938
- Dupont FM, Burke LL, Spanswick RM (1981) Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from corn root plasma membrane fraction. *Plant Physiol* 67: 59-63
- Ehrenshaft M, Brambi R (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol* 93: 295-304
- Eraso P, Portillo F (1994) Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J Biol Chem* 269: 10393-10399
- Ewing NN, Bennett AB (1994) Assessment of number and expression of P-type H⁺-ATPase genes in tomato. *Plant Physiol* 106: 547-557
- Ewing NN, Wimmers LE, Meyer DJ, Chelat RT, Bennett AB (1990) Molecular cloning of tomato plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 94: 1874-1881
- Frías I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviño JP, Culiañez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-1544
- Fullone MR, Visconti S, Marra M, Fogliano V, Aducci P (1998) Fusicoccin effect on the in vitro interaction between plant 14-3-3 proteins and plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 273: 7698-7702
- Gabathuler R, Cleland RE (1985) Auxin regulation of a proton translocating ATPase in pea root plasma membranes vesicles. *Plant Physiol* 79:1080-1085
- Gallager SR, Leonard RT (1982) Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol* 60: 1335-1340
- Galli MG, Sparuoli E, Caroi M (1975) Comparative effects of fusicoccin and giberellic acid on the promotion of germination and DNA synthesis initiation in *Haplopappus gracilis*. *Plant Sci Lett* 5: 351-357
- García-Rubio O, Sánchez-Nieto S, Enriquez-Arredondo C, Sepulveda J, Carballo A, Gavilanes-Ruiz M. (1997) Structural and biochemical changes in the plasma membrane from dry and imbibed embryos. In: Ellis RH, Black M, Murdoch AJ, Hong TD (eds) *Current plant science and biotechnology in agriculture. Basic and applied aspects of seed biology*. Vol. 30: 499-505
- Gavilanes-Ruiz M, Sánchez-Nieto S, Enriquez Arredondo MC, García-Rubio O (1995) Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia* 46: 251-262

- Gibrat R, Grouzis JP, Rigaud J, Galtier N, Grignon C (1988) Electrostatic analysis of effects of ion on the inhibition of corn root plasma membrane Mg^{2+} -ATPase by the bivalent orthovanadate *Biochim Biophys Acta* 46:52
- Gildensoph LH, Briskin DP (1990) Modification of the red beet plasma membrane H^+ -ATPase by diethylpyrocarbonate *Plant Physiol* 94: 696-703
- Goldsmith MHM (1993) Cellular signaling. New insights into the action of plant growth hormone auxin. *Proc Natl Acad Sci* 90: 11442-11445
- Gomés E, Venema K, Simon-Plas F, Milat ML, Palmgren MG, Blein JP (1996) Activation of the plasma membrane H^+ -ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS Lett* 398: 48-52
- González de la Vara LE, Medina G (1990) Phosphorylation by inorganic phosphate of the plasma membrane H^+ -ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol* 94: 1522-1527
- Grandmougin-Ferjani A, Schuller-Muller Y, Hartmann MA (1997) Sterol modulation of the plasma membrane H^+ -ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol* 113: 163-174.
- Grouzis JP, Gibrat R, Rigaud J, Ageorges A, Grignon C (1990) Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. I. Hydrolytic activity of native vesicles and purified enzyme. *Plant Physiol* 93: 1173-1182.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H^+ -ATPase. *Planta* 185: 527-537
- Harms K, Wöhner RB, Schulz B, Frommer WB (1994) Isolation and characterization of P-type H^+ -ATPase genes from potato. *Plant Mol Biol* 26: 979-988
- Harmon AC, J-Y Lee, B-Y Yoo, Shao J (1996) Plant membrane-associated protein kinases: proposed great communicators. :137-147.
- Harper J. F., Manney L, DeWitt ND, Yoo MH, Sussman MR (1990) The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H^+ -ATPase multigene family *J Biol Chem* 265: 13601-13608
- Harper JF, Manney L, Sussman MR (1994) The plasma membrane H^+ -ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. *Mol Gen Genet* 244: 572-587
- Harper JF, Surowy TK, Sussman MR (1989) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump H^+ -ATPase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1234-1238
- Hentzen AE, Smart LB, Wimmers LE, Fang HH, Schroeder JI, Bennet AB (1996) Two plasma membrane H^+ -ATPase genes expressed in guard cells of *Vicia faba* are also expressed through the plant. *Plant Cell Physiol* 37 :650-659
- Houlné G, Boutry M (1994) Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H^+ -ATPase whose expression is restricted to anther tissues. *Plant J* 5: 311-317

- Hsu AF, Brauer D, Lu D, Rodenbach S, Tu SI (1991) Purification and immunological properties of vanadate sensitive Mg:ATPase from plasma membrane of maize roots. *Plant Sci* 74: 157-166
- Hung KT, Kao CH (1997) Lipid peroxidation in relation to senescence of maize leaves *J Plant Physiol* 283-286
- James P, Maeda M, Fischer R, Verma AK, Krebs J, Penniston JT, Carafoli E (1988) Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes. *J Biol Chem* 263: 2905-2910
- Jahn T, Fuglsang AT, Osson A, Bruntrup IM, Collinge DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG, Larsson C (1997) The 14-3-3 Protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 9: 1805-1814.
- Jin YK, Bennetzen JL (1994) Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the BS1 retroelement of maize. *Plant Cell* 6: 1177-1186
- Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1993) Fusaric acid activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5: 321-327
- Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1994) Rapid purification of the plasma membrane H⁺-ATPase in its non-activated form using FPLC. *Physiol Plant* 92: 389-396
- Jones AM (1994) Auxin-binding proteins. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 45:393-420.
- Kasamo K (1986) Purification and properties of the plasma membrane H⁺-translocating adenosine triphosphatase of *Phaseolus mungo* L. roots. *Plant Physiol* 80: 818-824
- Kasamo K, Sakibara Y (1995) The plasma membrane reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci* 111:117-131
- Kasamo K, Wada M (1993) Phospholipid-specific activation of plasma membrane H⁺-ATPase. In: Murata N, Somerville CR (eds). *Biochemistry and molecular biology of membrane and storage lipids of plants. Current topics in plant physiology. An American Society of Plant Physiologists series, Vol 9 pp, 247-255*
- Kauss H, Jeblick W, Conrath U (1992) Protein kinase inhibitor k-252a and fusaric acid induce similar initial changes on ion transport of parsley suspension cells. *Physiol Plant* 85:483-488
- Korthout HAAJ, DeBoer AH (1994) A fusaric acid binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *Plant Cell* 6: 1681-1692
- Lado P, Rasi-Caldogno F, Colombo ER (1977) Effect of cycloheximide on IAA- or FC-induced cell enlargement in pea internode segments. *Plant Sci Lett* 9: 93-101
- Lanfermeijer FC, Prins HB (1994) Modulation of H⁺-ATPase activity by fusaric acid in plasma membrane vesicles from Oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant Physiol* 104:1277-1285

- Larsson C, Widell S, Kjellbom P (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. *Meth Enzymol* 148: 558-568
- Leonard RT, Hodges TK (1973) membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots. *Plant Physiol* 51: 749-754
- Lino B, Baizabal-Aguirre VM, González de la Vara LE (1998) The plasma membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Plant Physiol* 204:352-359
- Lindsey K y Topping J (1993) Embryogenesis: a Question of Pattern. *J Exp Bot* 259: 359-374
- Löber M, Klämbt DT (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.) I. Purification by immunological methods and characterization. *J Biol Chem* 260: 9848-9853
- Maathuis FJM, Ichida AM, Sanders D, Schroeder JI (1997) Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant Physiol*. 114: 1141-1149
- Marra M, Fullone MR, Fogliana V, Pen J, Mattei M, Masi S, Aducci P (1994) The 30-kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3 like protein. *Plant Physiol* 106: 1497-1501
- Marré E (1979) Fusicoccin: a tool in plant physiology. *Annu Rev Plant Physiol* 30: 273-288
- Mas A, Navarro-Pedreño J, Cooke DT, James CS (1994) Characterization and lipid composition of the plasma membrane in grape leaves. *Phytochem* 35: 1249-1253
- Michelet B, Boutry M (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 108:1-6
- Michelet B, Lukaszewicz M, Dupriez V, Boutry M (1994) A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of translational regulation. *Plant Cell* 6: 1375-1389
- Mito N, Wimmers LE, Bennett AB (1996) Sugar regulated mRNA abundance of H⁺-ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiol* 112: 1229-1236
- Moriau L, Bogaerts J, Jonniaux L, Boutry M (1993) Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 21: 955-963.
- Morsomme P, de Kerchove d'Exaerde A, de Mester S, Thiñès D, Goffeau A, Boutry M (1996) Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H⁺-pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO J* 15: 5513-5526
- Nakajima N, Sajai H, Aono M, Kondo N (1995) Isolation of cDNA for a plasma membrane H⁺-ATPase from guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* 36: 919-924
- Nagao T, Sasakawa H, Sugiyama T (1987) Purification of H⁺-ATPase from the plasma membrane of maize roots and preparation of its antibody. *Plant Cell Physiol* 28: 1181-1186
- Olsson A, Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1995) Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant J* 8: 959-962

- Olsson M, Nilsson R, Norberg P, von Arnold S, Liljenberg C (1994) Maturation in Norway spruce: Alteration in lipid composition *Plant Physiol Biochem* 32: 225-232
- O'Niell SD, Spanswick RM (1984) Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol* 75: 586-591
- O'Sullivan WJ, Smithers GW (1979) Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol* 63: 294-336
- Ookura T, Wada M, Sakakibara Y, Jeong KH, Maruta I, Kawamura Y, Kasamo K (1994) Identification and characterization of a plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol* 35: 1251-1256
- Palmgren MG (1991) Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Physiol Plant* 83: 314-323
- Palmgren (1997) Plant pumps turned on by yeast. *Trends Plant Sci.* 2: 43-45
- Palmgren MG, Christensen G (1994) Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *J Biol Chem* 269: 3027-3033
- Palmgren MG, Larsson C, Sommarin M (1990) Proteolytic activation of the plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal segment. *J Biol Chem* 265: 13423-13426.
- Palmgren MG, Sommarin M (1989) Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol* 90: 1009-1014
- Palmgren MG, Sommarin M, Uluskov P, Jorgensen PL (1988) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A₂. *Physiol Plant* 74: 11-19
- Palmgren MG, Sommarin M, Uluskov P, Larsson C (1990) Effect of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1021: 133-140
- Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R, Larsson C (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 266: 20470-20475
- Pardo JM, Serrano R (1989) Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 264: 8557-8562
- Peréz C, Michelet B, Ferrant V, Bogaerts P, Boutry M (1992) Differential expression within a three-gene family encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana glauca*. *J Biol Chem* 267: 1204-1211
- Perlin DS, Spanswick RM (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes *Plant Physiol* 68:521-526
- Portillo F, DeLarrinoa IF, Serrano R (1989) Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxy terminus. *FEBS Lett* 247: 381-385
- Portillo F, Eraso P, Serrano R (1991) Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett* 287: 71-74

- Puntarulo S, Sánchez S, Boveris A (1988) Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol* 86: 6-630
- Puntarulo S, Boveris A (1990) Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. *Plant Sci* 68: 27-32
- Ramos RS, Caldeira MT, Arruda P, deMeis L (1994) The two Km's for ATP of corn-root H⁺-ATPase and the use of glucose-6-phosphate and hexokinase as an ATP-regenerating system. *Plant Physiol* 105:853-859
- Rayle DL, Cleland RE (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solution. *Plant Physiol* 46: 250-253
- Rayle DL, Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* 99: 1271-1274
- Regenberg B, Villalba JM, Lanfermeijer FC, Palmgren MG (1995) C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁺-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell* 7: 1655-1666
- Reyes-Castañeda P (1990) El maíz y su cultivo. AGT Editor S.A. pp 460.
- Roberts G, Berberían G, Beaugé L (1995) Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H⁺-ATPase from higher plants. *Plant Physiol* 108: 813-819
- Roberts G, Beaugé L (1997) Complex ATP-activation kinetics of plant H⁺-transporting ATPase may or may not require two substrate sites. *Eur J Biochem* 246: 228-232
- Rodríguez-Rosales MP, Kerkeb L, Ferrol N, Donarie JP (1998) Lipoxygenase activity and lipid composition of cotyledons and oil bodies of two sunflower hybrids. *Plant Physiol Biochem* 36: 285-291
- Rodríguez-Sotres R, Muñoz-Clares R (1990) Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. 180-190
- Sánchez-Nieto S (1994) Caracterización de la aparición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Maestría, pp 115
- Sánchez-Nieto S, Rodríguez-Sotres R, González-Romo P, Bernal-Lugo I, Gavilanes-Ruiz M (1992) Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize line of high or low vigour. *Seed Sci Res* 2: 105-111
- Sánchez-Nieto S, García-Rubio O, Pacheco-Moisés F, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes-Ruiz M (1997) Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiol Plant* 101: 157-164
- Sandoval JA, Huang Z-H, Garrett DC, Gage DA, Chapman KD (1995) N-acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cotton seeds. Amounts, molecular species, and enzymatic synthesis. *Plant Physiol* 109: 269-275
- Sandstrom RP, Cleland RE (1989) Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol* 90:1524-1531
- Sekler I, Weiss M, Pick U (1994) Activation of the *Dunaliella acidophila* plasma membrane H⁺-ATPase by trypsin cleavage of a fragment that contains a phosphorylation site. *Plant Physiol* 105: 1125-1132

- Segel IH (1993) Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. John Wiley & Sons, New York pp.
- Serrano R (1984) Purification of the proton pumping ATPase from plasma membranes. *Biochim Biophys Res Commun* 121: 735-740
- Serrano R (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 61-94
- Serrano R (1990) Plasma membrane ATPase. In: Larsson C, Møller IM (eds). *The plant plasma membrane*. Springer Verlag Berlin, pp 127-153
- Serrano R, Montesinos C, Sánchez J (1988) Lipid requirements of the plasma membrane ATPases from oat roots and yeast. *Plant Sci* 56: 117-122
- Serrano R, Portillo F (1990) Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H⁺-ATPase studied by directed mutagenesis *Biochim Biophys Acta* 1018: 195-199
- Serrano R, Portillo F, Monk BC, Palmgren MG (1992) The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Acta Physiol Scand* 146: 131-136
- Shäger H, Aquila H, Von-Jagow G (1988) Coomassie blue-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 173:201-205
- Schaller GE, Sussman MR (1988a) Isolation and sequence of tryptic peptides from the proton-pumping ATPase of the oat plasma membrane. *Plant physiol* 86: 512-516
- Schaller GE, Sussman MR (1988b) Phosphorylation of the plasma -membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173: 509-518
- Seewaldt V, Priestley DA, Leopold AC, Feigenson GW, Goodsaid-Zalduondo F (1981) Membrane organization in soybean seed during hydration. *Planta* 152: 19-23
- Sheridan WF, Clark J K (1994) Fertilization and embryogeny in maize. In: *The maize handbook*. Freeling M, Walbot V (eds), Springer-Verlag, New York pp 3-10
- Simon-Plas F, Gómez E, Milat ML, Pugin A, Blein P (1996) *Cercospora beticola* toxins. X. Inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase by beticolin-1. *Plant Physiol* 111:773-779
- Stewart RRC, Bewley JD (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol* 65 :245-248
- Stokes DL, Taylor WR, Green NM (1994) Structure, transmembrane topology and helix packing of P-type ion pumps. *FEBS Lett* 346: 32-38
- Sze H (1985) H⁺-translocating ATPases: Advances using membranes vesicles. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 175-208
- Tobwin H, Stachelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Higgins VJ, Blumwald E (1994) Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host-plasma membrane H⁺-

- ATPase by elicitor induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol* 104: 209-215
- Villalba JM, Palmgren MG, Berberían GE, Ferguson C, Serrano R (1992) Functional expression of plant plasma membrane H⁺-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267: 12341-12349
- Wach A, Schlessner A, Goffeau A (1992) An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi and ciliate H⁺-ATPase genes. *J Bioenerg Biomem* 24: 309-317
- Wada M, Makoto T, Kasamo K (1992) Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Physiol* 99: 794-795
- Wevelsiep L, Ruppig E, Knogge W (1993) Stimulation of barley plasmalemma H⁺-ATPase by phytotoxic peptides from fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol* 101: 297-301
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E (1996) Regulation of plant defense response to fungal pathogens: Two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 8: 555-564.