

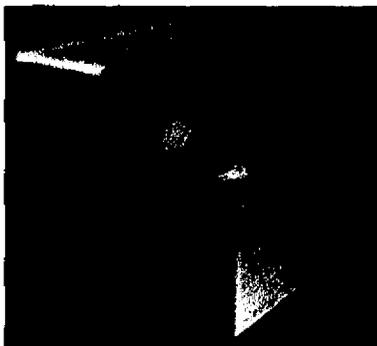
03088  
4  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

***“CARACTERIZACION FUNCIONAL DE DOS PROTEINAS DE PARED CELULAR QUE SE ACUMULAN EN RESPUESTA A DEFICIT HIDRICO EN FRIJOL.”***



**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

276753

PRESENTA

**BLANCA INES GARCIA GOMEZ**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CUERNAVACA, MOR. 2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

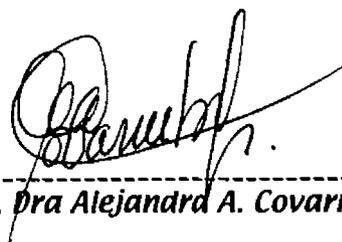
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles y la supervisión del siguiente comité tutorial:*

*Dr. Carlos Federico Arias Ortiz  
Dr. Jorge Nieto Sotelo  
Dr. Mario Rocha Sosa*



-----  
*Vo.Bo. Dra Alejandra A. Covarrubias Robles.*

*Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes instituciones  
CONACYT, registro 81906  
Fundación TELMEX, folio 3170010023  
PADEP, proyecto 030387*



## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

OF/PMDCB/IBT/008/2000

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**P R E S E N T E**

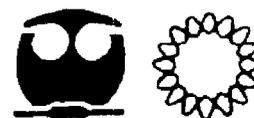
Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del día 5 de julio de 1999 se aprobó el siguiente jurado de Examen de Grado de Doctor en Biotecnología, de la **BIOL. BLANCA INES GARCIA GOMEZ**, con número de cuenta 92810060 y de expediente 30922011 con la tesis titulada **“Caracterización funcional de dos proteínas de pared celular que se acumulan en respuesta a déficit hídrico en frijol”** dirigida por el Dra. Alejandra Covarrubias Robles.

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Federico Sánchez Rodríguez
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Alejandra Covarrubias Robles
<b>VOCAL</b>	Dr. Mario Rocha Sosa
<b>VOCAL</b>	Dra. Susana López Charretón
<b>VOCAL</b>	Dra. Irma Bernal Lugo
<b>SUPLENTE</b>	Dra. Gladys Cassab López
<b>SUPLENTE</b>	Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**  
Cuernavaca, Mor., a 7 de marzo del 2000

**DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ S**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



*A mis padres,  
por la alegría de tenerlos  
siempre juntos apoyándome.*

*A mis hermanos,  
por que cada uno a su modo,  
siempre han sido un ejemplo a seguir.*

*A Edgar,  
compañero de andanzas en la vida, por  
tanta paciencia, tanto amor, y sobre  
todo por su sonrisa.*

## **AGRADECIMIENTOS I**

***El presente trabajo no habria sido posible sin el apoyo técnico de varios compañeros .***

***Agradezco a Magdalena Hernández y Elpidio Garcia Ramírez por su ayuda en la purificación de las proteínas p33 y p36, a Xochitl Alvarado por su apoyo en el análisis de imágenes en el microscopio confocal, a Francisco Campos y Fernando Zamudio por su colaboración en la obtención de la secuencia de p33 y p36, a Patricia Rueda por su ayuda en el manejo del cultivo de células en suspencion y a Xitla por el cuidado y mantenimiento de las plantas en el invernadero.***

***También agradezco por el material biológico proporcionado por varios investigadores. A Fernando Zamudio por proporcionarme el peptido pb18, a Rosario Vera Estrella por su apoyo en la cuantificación de la pureza de las membranas y facilitarme los anticuerpos necesarios para ello y a la Dra. patricia Talamás por donarnos anticuerpos anti-integrinas.***

## **AGRADECIMIENTOS II**

***A Edgar, por nunca dejarme sola y motivarme aún en los momentos más difíciles de mi paso por el doctorado.***

***A Ale Covarrubias, por mi formación, el apoyo y las enseñanzas de tantos años.***

***A Magda, por darme una lección de lo que es la amistad.***

***A Todos los compañeros que han pasado a lo largo de estos años de estancia en el laboratorio.***

***A mi comité tutorial del doctorado, por su atinada asesoría durante el desarrollo de mi proyecto.***

***A los miembros del jurado, por la crítica revisión del presente texto.***

## *INDICE*

	Página
<i>Indice</i>	<i>i</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>ii</i>
<i>Resumen</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Adaptación de las plantas al estrés hídrico.</b>	<b>2</b>
<b>I.1.1. El estatus hídrico, la pared celular y el crecimiento</b>	<b>5</b>
<b>I.2. Características y funciones de la matriz extracelular vegetal</b>	<b>8</b>
<b>I.3. Interacciones matriz extracelular-membrana plasmática</b>	<b>24</b>
<b>I.4. Antecedentes</b>	<b>31</b>
<b>II. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>III. Artículo</b>	<b>35</b>
<b>IV. Resultados anexos</b>	<b>61</b>
<b>IV.1. Material y métodos</b>	<b>62</b>
<b>IV.2. Resultados</b>	<b>65</b>
<b>V. Discusión, Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>73</b>
<b>V.1. Discusión</b>	<b>74</b>
<b>V.2. Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>V.3. Perspectivas</b>	<b>82</b>
 <i>Bibliografía</i>	 <b>85</b>

## *Abreviaturas*

ABA	Acido abscísico
AGP	Arabino-galacto-proteína
DGR	Acido aspártico-glicina-arginina
GRP	Proteína rica en glicina
HRGP	Proteína rica en hidroxiprolinas
ME	Matriz extracelular
MEV	Matriz extracelular vegetal
MP	Membrana plasmática
MPa	Megapascales
PRP	Proteína rica en prolina
SbPRP	Proteína rica en prolina de soya
RAD	Arginina-alanina-aspartato
RGD	Arginina-glicina-aspartato
RGE	Arginina-glicina-glutamato
RYD	Arginina-tirosina-aspartato
$\Psi_w$	Potencial de agua

## *Resumen*

### **Caracterización funcional de dos proteínas de matriz extracelular que se acumulan por déficit hídrico en frijol.**

La sequía es un factor ambiental desfavorable para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas mesófitas, afectando, a diferentes niveles, tanto las funciones generales de la célula, como la integridad de sus organelos. Se han observado cambios importantes en la composición de las paredes celulares, por efecto del estrés hídrico.

En nuestro laboratorio se han caracterizado a dos glicoproteínas de pared celular de células de frijol (*Phaseolus vulgaris*), que cruzan antigénicamente entre sí, y que se acumulan durante la sequía; éstas han sido llamadas p33 y p36 (Covarrubias et al., 1995). Debido a que la acumulación de p33 y p36 se da en la fracción soluble de la pared celular investigamos si estas proteínas tenían algún tipo de interacción con la superficie celular y/o específicamente con la membrana plasmática. En este trabajo demostramos que tanto p33 como p36 son capaces de unirse a vesículas de membrana plasmática de un modo dependiente de calcio, pero en contraste con proteínas adhesivas de la matriz extracelular animal, ni p33 ni p36 son capaces de unirse a sustratos como vidrio y heparina. La secuencia parcial de aminoácidos de estas proteínas muestran la presencia del decapeptido repetido POVKPQVEK, lo que las relaciona con proteínas ricas en prolina (PRP's), particularmente con la PRP2 de soya, la PRP4 de alfalfa y la p42 de frijol. Ensayos de unión mostraron que p33 y p36 se unen específicamente a una proteína de 80 kD de la membrana plasmática de células de frijol. Esta unión puede ser competida con proteínas como la fibronectina y por secuencias que contengan al péptido RGD, de manera análoga a lo que ocurre con algunas proteínas de matriz extracelular animal con sus ligandos en membrana plasmática, lo que sugiere que la proteína de 80 kD de la membrana plasmática es una proteína análoga a integrinas cuyo ligando natural es p33 y p36. Este es el primer caso en que se identifica a un posible ligando en la membrana plasmática para una proteína de matriz extracelular vegetal. Se discute el posible papel de la interacción de p33 y p36 con la proteína de membrana plasmática de 80 kD durante el estrés hídrico.

## *Abstract*

### **Functional characterization of two bean extracellular matrix proteins more abundant during water deficit**

Adverse conditions such as water limitation interfere with normal patterns of plant growth and development. Plants experiencing water deficit present a set of adaptation responses occurring at different levels. The process of growth is sensitive to water shortage and some of the factors may be related to cell-wall metabolism.

Two antigenically related glycoproteins, named p33 and p36, have been shown to accumulate in the cell wall in response to water deficit conditions in *Phaseolus vulgaris* (Covarrubias *et al.*, 1995). Since these proteins were found to be accumulated in the soluble fraction of the cell wall, we investigated the possibility that they could be interacting with the plasma membrane. In this work, we show that p33/p36 are able to adhere leaf protoplasts and that they bind to plasma membrane vesicles in a calcium dependent manner. In contrast with adhesive proteins characterized in animal systems, such as vitronectin and fibronectin, p33/36 do not bind to glass nor to heparin matrix. Data from the partial amino acid sequence of the p33 and p36 proteins indicated that they contain repeats of the decapeptide PP\*VYKPP\*VEK and, therefore, they are related to proline-rich proteins (PRPs), particularly to PRP2 from soybean, PRP4 from alfalfa and p42 from bean. Results obtained from binding assay experiments indicated that these proteins specifically bind to an 80 kDa plasma-membrane protein. This binding is competed with a peptide that contains the RGD motif, as well as with fibronectin which also includes this sequence, suggesting that the 80 kDa plasma-membrane protein is an integrin-like protein whose natural ligands are p33/p36. This is the first case where a plasma membrane ligand for a higher plant extracellular matrix protein has been identified. The role of p33 and p36 proteins during water deficit situations is discussed.

## I.1. ADAPTACIONES DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS HIDRICO

Uno de los factores abióticos que determina el adecuado desarrollo de las plantas, es el agua. Para crecer, desarrollarse y reproducirse adecuadamente, las plantas requieren de agua y de los nutrientes que van disueltos en ella. La vida sobre la tierra ha dependido del contenido de agua en el suelo para el adecuado desarrollo de las plantas (Chrispeels y Sadava, 1994). El estatus hídrico de una planta<sup>1</sup> va a depender de varios factores, tanto internos (estado de desarrollo, tipo de tejido, etc.) como externos (temperatura, irrigación, etc.). Condiciones de potenciales hídricos bajos, son normales para que se efectúen ciertos procesos, como por ejemplo la conducción de agua por el xilema. Así mismo ciertos tipos celulares como los del polen y la semilla, utilizan a la desecación, como mecanismo de supervivencia a largo plazo. Con lo anterior podemos concluir que ciertos niveles de estrés osmótico son condiciones necesarias para el adecuado funcionamiento de las plantas.

Sin embargo, el equilibrio hídrico, puede ser roto debido a cambios drásticos en las condiciones ambientales. Los diversos organismos sobre la tierra usan diferentes estrategias para protegerse de las condiciones ambientales desfavorables. Las plantas superiores, por encontrarse generalmente fijas al suelo, no son capaces de desplazarse y evitar estas condiciones; deben por lo tanto, contender con ellas. Los animales en cambio, se han adaptado a los cambios ambientales mediante mecanismos evolutivos a largo plazo, de modo que las modificaciones normales del clima, raramente provocan grandes cambios en su desarrollo (Fosket, 1994). En contraste, para adaptarse a las nuevas condiciones, las plantas responden inicialmente utilizando los mecanismos de control del estatus hídrico usados normalmente por ellas y posteriormente con cambios drásticos en su anatomía, su morfología, su metabolismo y/o su desarrollo.

---

<sup>1</sup> El estrés se define usualmente como aquel factor externo que ejerce un efecto desventajoso en un sistema (Taiz, 1991), en este caso, hablaremos del estrés hídrico.

Son varios los parámetros que se han usado como indicadores del estatus de agua en las plantas. El **potencial de agua ( $\Psi$ )** es la medida fundamental de este estatus hídrico y se refiere al potencial químico del agua afectado por la presión hidrostática ( $\Psi_p$ ), la presencia de solutos ( $\Psi_s$ ) y por la naturaleza de la matriz que conduce al agua llamado potencial mátrico ( $\Psi_m$ ). El potencial hídrico se define según la ecuación:  $\Psi = \Psi_p - \Psi_s$

La interacción del agua con los solutos disueltos en ésta tiene un efecto negativo sobre el  $\Psi$  ya que disminuye la cantidad de agua libre disponible en el sistema, por lo que se resta en la ecuación. El potencial mátrico ( $\Psi_m$ ), no aparece en la ecuación ya que su contribución al valor del  $\Psi$  es despreciable (Taiz, 1991).

El déficit hídrico puede dividirse en 4 categorías o niveles, dependiendo de su severidad (Hsiao, 1973):

- 1) Poco severo, cuando el potencial de agua baja de 8-10% de los valores normales.
- 2) Moderado, cuando baja entre 10-20%.
- 3) Severo, cuando la disminución es de más del 20%.
- 4) Desecación, cuando se remueve del tejido más de la mitad del agua.

Independientemente de la severidad del estrés hídrico, las plantas presentan tres tipos de respuestas generales a la sequía. Estas respuestas pueden ser (Hanson, 1980):

- 1.- Adaptativas, las que les permiten sobrevivir, crecer y reproducirse aún en presencia del estrés.
- 2.- Deleterias, aquellas que reducen la sobrevivencia y
- 3.- Incidentales, aquellas que acompañan al estrés hídrico pero son neutrales en su efecto.

Los programas de mejoramiento genético de plantas de interés agrícola, intentan identificar respuestas adaptativas deseables para maximizar su expresión, al mismo tiempo que se intenta minimizar las otras dos. Es por lo anterior que nuestro interés se centrará en el análisis de las respuestas adaptativas de las plantas al estrés hídrico.

Las respuestas adaptativas, pueden darse a varios niveles: fenológico, morfológico o metabólico. Como ejemplos de respuestas adaptativas a nivel fenológico se encuentra el maduramiento precoz o tardío de frutos; a nivel morfológico por ejemplo, la presencia de superficies cerosas en tallos y hojas; a nivel fisiológico se presenta el ajuste osmótico y como adaptación a nivel metabólico ocurre la disminución en la difusión del CO<sub>2</sub> y por lo tanto disminución en el índice fotosintético.

La plasticidad de las células vegetales queda de manifiesto al observar las múltiples respuestas adaptativas que presentan las plantas durante situaciones de déficit hídrico. Según Hsiao (1973), las primeras cinco de estas respuestas son las siguientes:

- 1.- Reducción en el potencial químico del agua ( $\Psi$ ), como resultado de la acumulación de moléculas.
- 2.- Abatimiento de la presión de turgencia (turgor).
- 3.- La concentración de macro y pequeñas moléculas aumenta, debido a la reducción en el volumen celular por la pérdida de agua.
- 4.- Alteración de las relaciones espaciales entre membrana plasmática, tonoplasto y membrana de los organelos por el cambio en el volumen celular.

5.- Modificación de la estructura y función de algunas macromoléculas como las proteínas.

Las numerosas respuestas al déficit hídrico están controladas por cambios en la expresión de genes con muy diferentes funciones. Las posibles funciones celulares que se ven afectadas por el estrés hídrico son (Bray, 1993) (Fig.I):

I. Protección de estructuras celulares, que se efectúa mediante el secuestro de iones, la protección de proteínas y/o membranas y la renaturalización de proteínas desnaturalizadas.

II. Ajuste osmótico, que se realiza mediante enzimas que codifican para la síntesis de osmolitos, ATPasas, acarreadores y/o canales.

III. Regulación de la dinámica de la pared celular, promoviendo la síntesis y/o rearrreglos de la pared, así como la división celular.

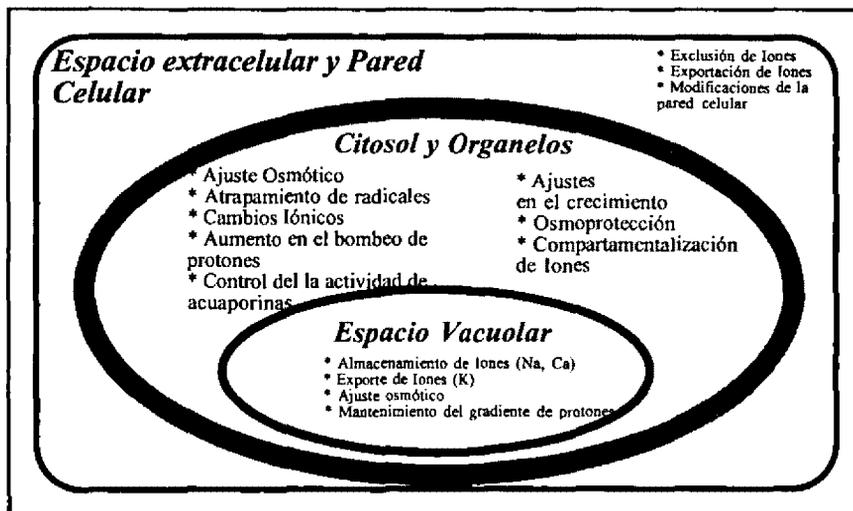


Fig. I Funciones celulares asociadas con la tolerancia al déficit hídrico. (Tomado de Bohnert, 1996).

### 1.1.1 EL ESTATUS HIDRICO, LA PARED CELULAR Y EL CRECIMIENTO DE LA CELULA VEGETAL.

La síntesis y/o los rearrreglos de los componentes de la pared celular es una de las respuestas celulares que se ha observado durante situaciones de déficit hídrico (Bray, 1993). Como se puede observar en la tabla I, uno de los primeros procesos que se ve alterado como consecuencia de estos rearrreglos es la tasa de crecimiento celular ya que en las plantas, tanto la morfogénesis como el desarrollo, dependen directamente de la expansión de sus componentes celulares el cual está directamente regulado por cambios en la pared celular (o matriz extracelular, ME). En condiciones normales, se sabe que el alargamiento sostenido de la pared celular durante el crecimiento se acompaña también de procesos de diferenciación y proliferación de membranas y organelos. A continuación se detallará cómo las propiedades químicas y fisiológicas de la pared celular, así como el estatus hídrico de la célula, juegan un papel muy importante en el control del crecimiento de las células vegetales.

El entramado de los polímeros que constituyen la pared celular rodea al protoplasto y soporta la generación de presión dentro de la célula. Esta presión, llamada 'presión de turgor' se incrementa ya que los contenidos celulares típicamente tienen valores más altos de potencial osmótico que el medio extracelular. La diferencia en potencial osmótico crea una fuerza de entrada de agua a la célula, con un aumento paralelo de la presión de turgor la cual compensa la diferencia de potencial de agua a través de la membrana plasmática. La presión de turgor en una célula vegetal en crecimiento es impresionantemente alta, se encuentra en el orden de  $0.5-1 \text{ MPa}^2$ , y provee la fuerza para la expansión celular (McQueen-Mason, 1977). En una célula que no está en crecimiento algunos componentes de la pared participan proporcionando rigidez a la célula y evitando con esto, la expansión celular. En contraste, en células en crecimiento, la estructura de la pared es capaz de aflojarse en respuesta a esta fuerza de turgor.

---

<sup>2</sup> El potencial hídrico, así como la presión de turgor, se expresan en unidades de presión que pueden ser Pascales o Bares.

Proceso o Parametro afectado	SENSIBILIDAD AL ESTRES		Notas
	Muy Sensible	Relativamente insensible	
	REDUCCION EN EL $\Psi$ QUE SE REQUIERE PARA AFECTAR DICHO PROCESO <sup>b)</sup>		
	0 Bares	10 Bares	20 Bares
Crecimiento celular	██████████		
Síntesis de Pared celular	██████████		Tejido de rápido crecimiento
Síntesis de Proteínas	██████████		Tejido de rápido crecimiento
Formación de Protoclorofila	██████████		Hojas etioladas
Niveles de Nitrato reductasa	██████████		
Acumulación de ABA	██████████		
Nivel de citoquininas		██████████	
Apertura estomatal	██████████	██████████	Depende de la especie
Asimilación de CO <sub>2</sub>	██████████	██████████	Depende de la especie
Respiración		██████████	
Acumulación de prolina		██████████	
Acumulación de azúcar		██████████	

**Tabla 1.** Sensibilidad general de algunos procesos o parámetros al estrés hídrico.

a) La longitud de las líneas horizontales representa el nivel de estrés en que el proceso se ve inicialmente afectado. Las líneas punteadas representan deducciones de datos menos concluyentes. b) Tomando como referencia el  $\Psi$  de plantas bien irrigadas con bajos niveles de evaporación.

Tomado de Hsiao (1973).

Muchos factores internos (hormonas) y externos (luz, disponibilidad de agua, fuerza de gravedad) que afectan la tasa de crecimiento parecen hacerlo mediante cambios en la extensibilidad de las paredes celulares. Los cambios en la tasa de crecimiento pueden ocurrir durante períodos de días o incluso en períodos de segundos. En ambos casos, los cambios en el crecimiento son debidos a alteraciones en la extensibilidad de la pared.

La síntesis de pared celular parece ser muy sensible a caídas en el potencial hídrico de tan solo unos bares (Tabla 1). Sin embargo, no ha sido fácil saber si los cambios detectados en la pared celular, son causa o consecuencia de la reducción en el crecimiento durante el estrés.

Actualmente se sabe que el gradiente de potencial hídrico a lo largo de la planta ejerce un efecto directo sobre la elongación celular. Si este gradiente decrece a lo largo del xilema, la elongación celular es uno de los primeros procesos que se abate (Nonami y

Boyer, 1990). Esta limitación en el crecimiento se ha visto directamente relacionada con una disminución en la extensibilidad de las paredes celulares y de la conductancia de agua por los tejidos (Nonami y Boyer, 1990).

Para comprender mejor la dinámica de la pared celular durante el déficit hídrico, en la siguiente sección, se hará una breve revisión de las características de cada uno de los componentes de la paredes celulares de células vegetales.

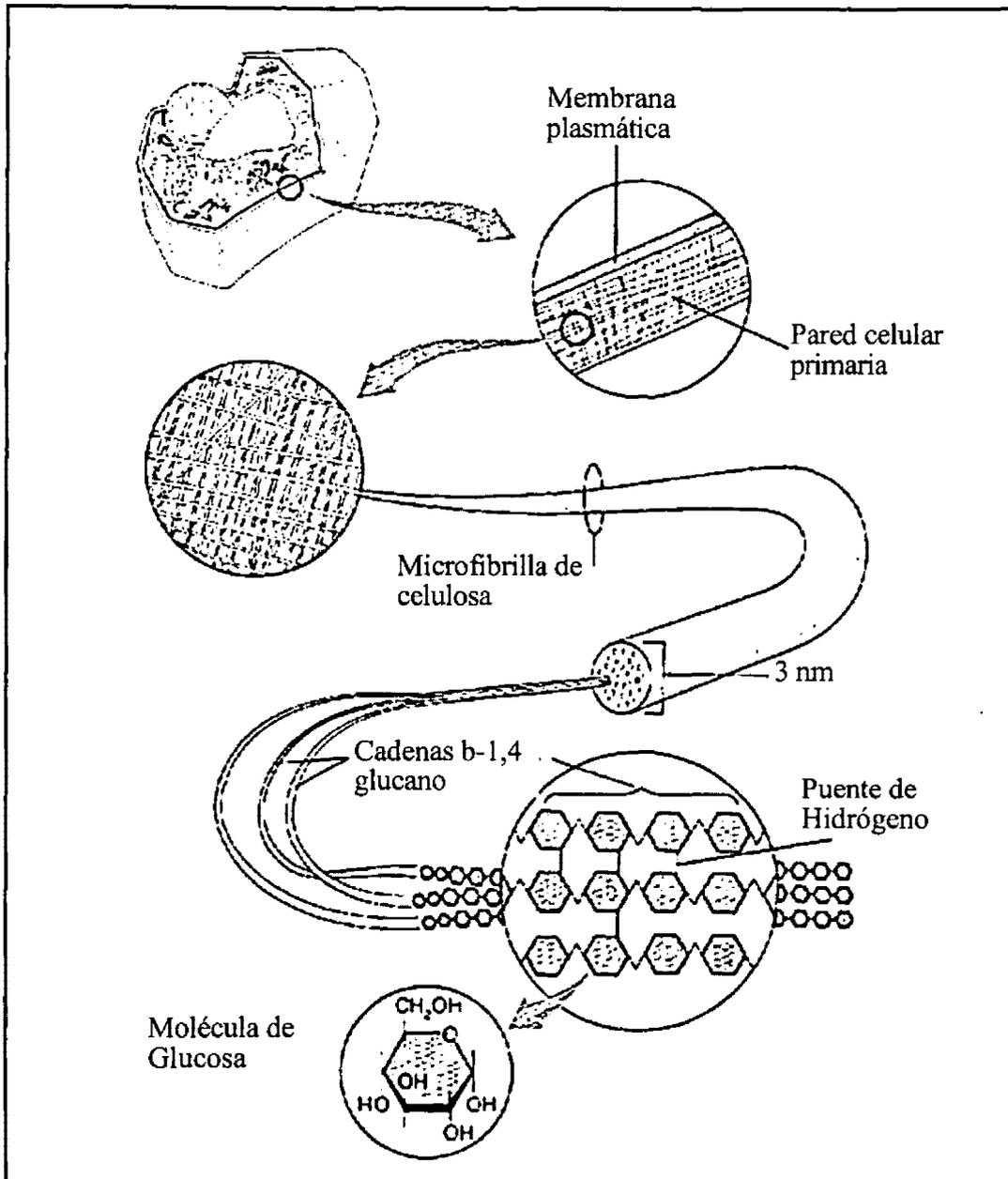
## I.2 CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VEGETAL.

La pared celular vegetal es una compleja matriz extracelular que rodea a cada una de las células de las plantas. Las paredes de células vecinas que se unen entre sí para formar la planta intacta son generalmente más gruesas y rígidas a diferencia de la matriz extracelular producida por las células animales.

Las paredes celulares primarias, son aquellas que se forman inmediatamente después de la placa celular en las células que aún están en crecimiento; son delgadas, semirígidas y tienen una apariencia similar en casi todas las células. Cuando el proceso de crecimiento cesa y las paredes no requieren de expandirse, en la pared primaria se depositan nuevas capas de pared de diferente composición, primordialmente formadas por compuestos fenólicos como la lignina, esta nueva estructura forma lo que se conoce como pared secundaria, más rígida y gruesa que la anterior. Los engrosamientos de la pared secundaria pueden producir patrones morfológicos muy específicos para cada tipo de célula, como los anillos, espirales o retículas de las paredes de las traqueidas.

Aunque las paredes primarias de las plantas superiores varían un poco, tanto en composición como en organización, como otros tipos de matrices extracelulares, éstas se estructuran de acuerdo a un principio común: contienen largas y fuertes fibras de las cuales deriva su gran fuerza tensil, y una matriz de proteínas y polisacáridos en la que están embebidas estas fibras, proporcionándoles resistencia a la compresión. En las paredes celulares de plantas superiores, estas fibras están constituidas por el polisacárido celulosa. El resto de la matriz está compuesto predominantemente de otros dos tipos de polisacáridos: hemicelulosa y pectinas, junto con proteínas estructurales (Fig.II y IIIa). Todos estas moléculas se mantienen unidas por una combinación de uniones covalentes y no-covalentes para formar una estructura altamente compleja cuya composición depende del tipo celular (Alberts *et al.* 1994).

A continuación se describen con detalle a los principales componentes de la pared celular y en la siguiente sección se mencionarán algunas características de la matriz extracelular animal resaltando el alto nivel de paralelismo entre estos compartimentos.



**Fig. II** Las microfibrillas de celulosa en la pared celular, están hechas de cadenas de glucosa en uniones  $\beta$ -1,4 unidas entre si por puentes de hidrógeno. (Tomado de Taiz et al., 1991).

## POLISACARIDOS

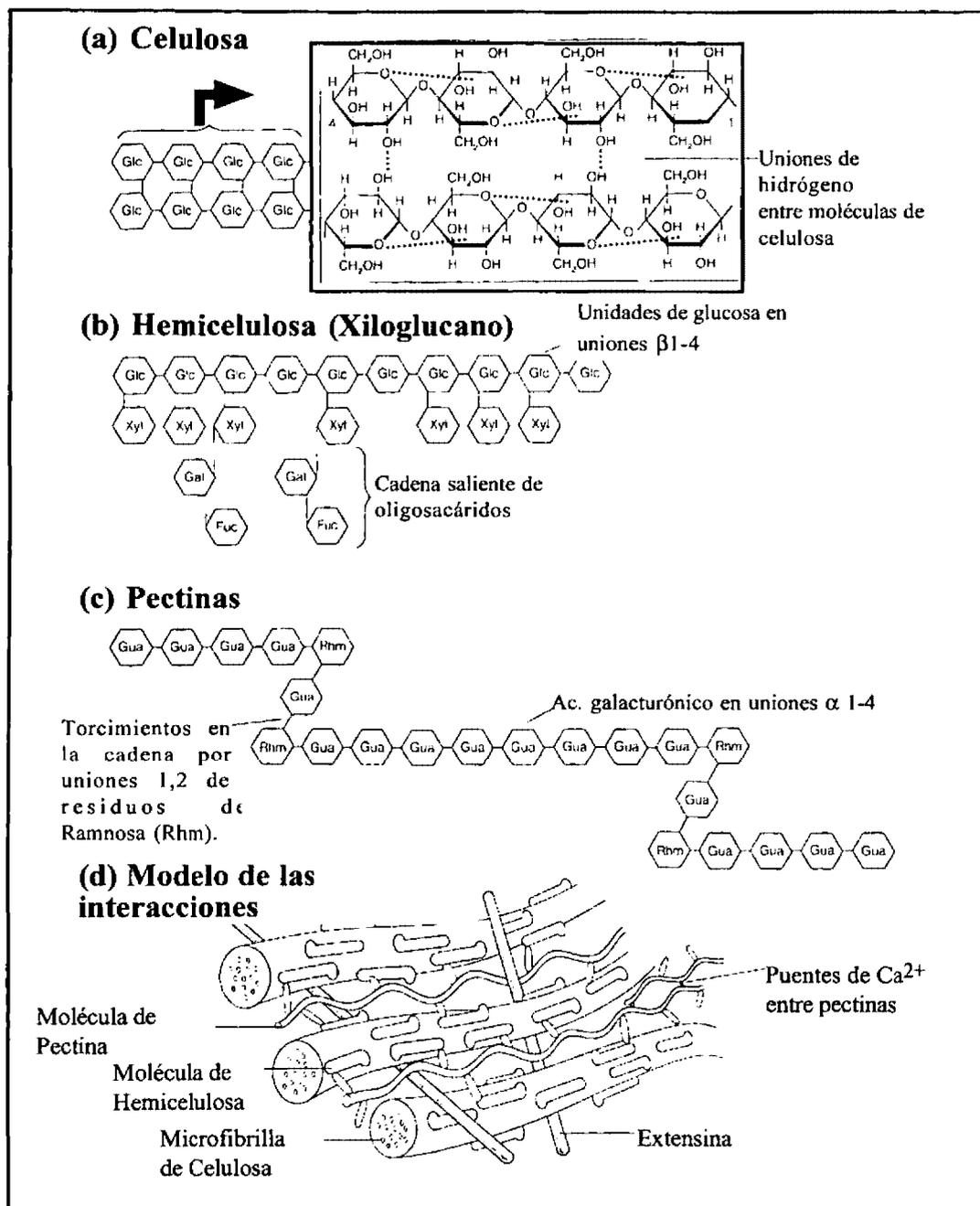
La celulosa es un glucano lineal y no ramificado formado por uniones (1-4)  $\beta$  de D-glucosas. Es el mayor componente de la pared celular primaria. Docenas de cadenas se asocian en microfibrillas en arreglos cristalinos y paracristalinos virtualmente

libres de agua. En un corte transversal tienen un diámetro de 1-15 nm. (McCann y Roberts, 1991). Aunque cada cadena celulosa puede tener cientos de unidades, éstas puede empezar y terminar en diferentes lugares a lo largo de la microfibrilla. Vistas al microscopio electrónico, las microfibrillas de celulosa se observan como grupos ordenados de rosetas en el plasmalema. Las moléculas de celulosa salen de la roseta o de rosetas agregadas para formar las microfibrillas. La orientación y deposición de las microfibrillas está determinada por los microtúbulos y es generalmente transversal al eje de crecimiento. Conforme la célula incrementa en longitud, las microfibrillas de la superficie de la pared son jaladas en orientación casi paralela al eje de elongación (Varner, 1989).

Los xiloglucanos son hemicelulosas que componen cerca del 20% del peso seco de las paredes celulares de las dicotiledóneas y del 2% de las monocotiledóneas. Están formados por un esqueleto de residuos glicosilos en uniones  $\beta$ 1-4, con cadenas laterales (tipo  $\alpha$ ) de residuos de xilosa que se unen a un residuo glicosilo del esqueleto lineal en el oxígeno de la posición 6. Algunas de las cadenas laterales de xilosa, poseen un D-galactosil o un L-fucosil-2- $\alpha$ -D-galactosil en union tipo  $\beta$ . En las paredes celulares, los xiloglucanos se encuentran unidos por puentes de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa. Integrando todas estas propiedades, los xiloglucanos parecen estar formando una capa en la superficie cristalina de las microfibrillas de celulosa que penetra en la región amorfa. Estas moléculas podrían mediar el embebimiento de las microfibrillas en el gel de la matriz extracelular.

Los homogalacturanos, junto con los ramnogalacturanos forman el conjunto de pectinas en las dicotiledóneas. Están compuestos de residuos de ácido galacturónico en uniones  $\alpha$ 1-4. El grado preciso de polimerización de los homogalacturanos así como la frecuencia de interrupción de los residuos de ácido galacturónico con otros azúcares no se conocen.

Los ramnogalacturónidos del tipo I consisten de un esqueleto alternado de L-ramnosil en unión-2 y ácido D-galacturónico en posición 4. Los ramnogalacturónidos del tipo II son moléculas muy diferentes. Consisten de aproximadamente 60 residuos de glicosilo covalentemente unidos a otros componentes de la pared por una serie de ácidos galacturónidos en uniones  $\alpha$ -4 y contienen muchos residuos glicosilo poco comunes (2-O-metilfucosil, 2-O-metilxilosil,etc) (Fig.III)



**Fig. III** Estructura química de (a) celulosa, (b) hemicelulosa, y (c) pectinas.  
 (d) Modelo de las interacciones entre los diferentes moléculas de la pared celular.  
 (Tomado de Taiz et al., 1991).

## PROTEINAS

Las proteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGP's) son las más abundantes en la pared celular y agrupan a por lo menos 4 clases de proteínas: las extensinas, las proteínas ricas en glicina (GRP's), las proteínas arabinogalactanas (AGP's) y las proteínas ricas en prolina (PRP's). Dentro de este grupo también se pueden incluir a las proteínas quiméricas, que poseen en su estructura, algún dominio que las relaciona con HRGP's y otro(s) dominio(s) totalmente diferente y específico para cada proteína. Existen otros 2 grupos como el de las lectinas de solanáceas, y las expansinas de las cuales también se hablará en esta breve revisión.

### Extensinas.

Forman una familia de glicoproteína ricas en hidroxiprolinas (HRGP's) que forman parte de las paredes celulares de plantas superiores. En dicotiledóneas, las extensinas son particularmente abundantes y poseen las siguientes características: son ricas en hidroxiprolinas y serina y algunas combinaciones de los aminoácidos valina, tirosina, lisina e histidina; generalmente contienen repeticiones del pentapéptido Ser-Hyp<sub>4</sub>; muchos de los residuos de hidroxiprolina están glicosilados con 1 a 4 residuos de arabinosa, y algunos residuos de serina están glicosilados con una unidad de galactosa. Son proteínas básicas con punto isoeléctrico de aproximadamente 10 por su alto contenido de lisina. Generalmente, adoptan una estructura de hélice de poliprolina II cuando están en solución y, cuando se observan al microscopio electrónico tienen una apariencia de varilla.

### Funciones de las extensinas.

Se ha propuesto que las extensinas son proteínas estructurales, que funcionan durante el desarrollo, formando una pared celular más impenetrable y proporcionando fuerza tensil a la célula (Shirsat, *et al.*, 1996), como en el caso de las células del xilema y floema, en donde se ha visto que se localizan preferencialmente las extensinas (Ye y Varner, 1991).

Condiciones como el daño mecánico, pueden incrementar la expresión de extensinas. En frijol (*Phaseolus vulgaris*) se ha caracterizado la regulación transcripcional de extensinas en respuesta a daño, infección por hongos, elicitores de hongos y glutatión (Lawton y Lamb, 1987).

Las extensinas pueden estar entrecruzadas por uniones intermoleculares del tipo

difenil-eter, entre tirosinas. Este tipo de uniones en isoditrosinas sólo se han encontrado intramolecularmente y traen como resultado un aumento en la insolubilización de estas proteínas a unos pocos minutos de efectuado el daño o la infección. Este proceso de insolubilización parece estar mediado por la liberación de peróxido de hidrógeno y su catálisis por la peroxidasa de la pared celular. Esta respuesta parece ser muy rápida y se ha propuesto que contribuye a una mayor rigidización de la pared (Bradley, *et al.* 1992). Se ha especulado mucho sobre el papel que juegan las extensinas durante la sequía, sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que demuestren si intervienen directamente en situaciones de estrés hídrico.

### Proteínas ricas en glicina.

Las proteínas ricas en glicina (GRP's) se caracterizan por su estructura primaria repetida que contiene más de 70% de glicinas ordenada en unidades cortas y repetidas de aminoácidos. El primer gen para GRP aislado fué el de petunia (Condit y Meagher, 1986), que contiene un 67% de glicinas, en unidades repetidas de Gly-X, en donde X puede ser con alta frecuencia Gly, pero también puede ser Ala o Ser. Otra característica importante de este gen es que contiene una región que codifica para un péptido señal el cual se ha encontrado en los cDNA's que codifican para GRP's de varias especies de plantas (Showalter, 1993).

Ensayos de inmunolocalización han permitido demostrar la localización de algunas GRP's en la pared celular. Se sabe que una de las GRP's de frijol aparentemente se insolubiliza en la pared y se piensa que lo hace estableciendo uniones tipo isoditrosina ya sea con otras moléculas de GRP's, con otras proteínas como las PRP's o bien con la lignina. Sin embargo, el hecho que algunas GRP's de dicotiledóneas que carecen aparentemente de péptido señal hace pensar que existe un grupo de GRP's que se localizan en el citoplasma y no en la pared celular. El porcentaje de glicina de estas GRP's es variable: por ejemplo, una de las GRP's de arroz posee 25%, no contiene unidades repetidas, y se ha demostrado que se localiza en el citoplasma (Mundy y Chua, 1988). Las GRP's también están presentes en monocotiledóneas como maíz (Didierjean *et al.*, 1992).

### Funciones de las GRP's.

Las GRP's se expresan en respuesta a una gran variedad de condiciones del desarrollo así como condiciones de estrés, de manera similar a lo que sucede con las

extensinas. Se les relaciona con el desarrollo del tejido vascular, nódulos y flores de dicotiledóneas (Ryser *et al.*, 1997; Küster *et al.*, 1995 y Oliveira *et al.*, 1993) particularmente en el xilema, así como en células que van a lignificarse. Las GRP's proveen elasticidad así como fuerza tensora durante el desarrollo vascular. En cuanto a las condiciones de estrés, se sabe que algunas GRP's responden a daño y que en alfalfa, proporcionan tolerancia a frío (Castonguay *et al.*, 1993).

### Proteínas ricas en prolina.

Todas las proteínas ricas en prolina (PRP's) se caracterizan por presentar repeticiones de prolinas contenidas en una variedad de secuencias repetidas. Muchas de las PRP's, tanto las de paredes celulares de tejidos vegetativos como las de células de nódulos se caracterizan por la presencia del pentapéptido Pro-Pro-X-Y-Lis, donde X y Y pueden ser valina, tirosina, histidina y ácido glutámico; carecen de serinas y están medianamente glicosiladas. El análisis de aminoácidos de las PRP's ha demostrado que la segunda o tercera prolina suele estar hidroxilada.

### Funciones de las PRP's

Algunos estudios de la expresión de las PRP's han demostrado que éstas se regulan durante la germinación (Datta *et al.*, 1989), el desarrollo normal y formación de tejido vascular, nódulos, vainas y microsporas (Wyatt *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994; Coupe *et al.*, 1993 y Roberts *et al.*, 1993), así como por factores externos como daño (Suzuki *et al.*, 1993) y elicitores de hongos (Millar *et al.*, 1992). También se ha visto que la luz y el cultivo de células pueden afectar la expresión de las PRP's (Cassab 1998). Los miembros de la familia de genes de PRP's muestran patrones de expresión tejido- y célula-específicos similar al que muestran las GRP's y las extensinas.

Las PRP's como las extensinas y las GRP's son capaces de insolubilizarse en la pared celular. Este proceso de insolubilización puede ocurrir rápidamente en respuesta a estrés y parece estar mediado por la liberación de peróxido de hidrógeno y catalizado por una peroxidasa de la pared. Sin embargo, las interacciones moleculares que provocan tal insolubilización se desconocen (Wojtaszek *et al.*, 1995). El contenido relativo tan alto de tirosina abre la posibilidad de la existencia de entrecruzamiento químico entre moléculas de PRP's y/o GRP's o extensinas mediante uniones de isoditrosina. Tal no es el caso de la PRP's rica en galactosa del tejido transmisor de estilos de tabaco (GaRSGP), ya que tiene un bajo contenido de Tyr, y no se encuentra

insolubilizada en la pared (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996). Adicionalmente el carácter básico que les confiere la abundancia de lisinas hace posible su interacción iónica con otros componentes de la pared celular como pectinas ácidas, o extensinas.

No se sabe exactamente el papel que tienen las PRP's durante el estrés osmótico. Algunos reportes las han relacionado con condiciones de estrés salino, como es el caso de la PRP2 de alfalfa (Winicov y Bastola, 1999) y las proteínas SAP de células en suspensión de frijoles "alados" (*Psophocarpus tetragonolobus*) adaptados a sal. Así mismo, se han observado cambios en la expresión de cDNA's que codifican para PRP's de *Cicer arietinum* durante ciertos estreses abióticos (Muñoz *et al.*, 1998). En frijol, se han encontrado dos clonas que se inducen por sequía y que codifican para PRP's (Colmenero, *et al.*, 1998), también se han observado cambios en la acumulación de PRP's como consecuencia de modificación en la presión osmótica (Mergold *et al.*, 1996). No obstante a esta información, no existen aún evidencias directas de la función de las PRP'S durante la sequía.

#### Proteínas arabinogalactanas.

Las proteínas arabinogalactanas (AGP's) son generalmente muy solubles y altamente glicosiladas. Están ampliamente distribuidas en las plantas y sus pesos son extremadamente heterogéneos seguramente como reflejo de su tipo de glicosilación. La porción proteica de las AGP's es típicamente rica en hidroxiprolina, serina, alanina, treonina y glicina y en su estado nativo, son resistentes a proteólisis. Tienen un punto isoelectrico entre pH 3 y 5. Se ha determinado la secuencia del extremo amino terminal de algunas AGP's y en todas ellas se han detectado repeticiones de alanina-hidroxiprolina. La porción carbohidrato ocupa la mayor parte de estas moléculas y está formada por D-galactosa y L-arabinosa (Showalter 1993).

Las AGP's se han encontrado formando parte del medio extracelular, sin unirse a él covalentemente. En diferentes tipos de células en cultivo se ha observado que las AGP's son secretadas al medio, mientras que en algunas células especializadas como las del canal del estilo, en otras células secretoras se han observado grandes cantidades de AGP's en la pared celular. Adicionalmente, algunas de las AGP's se han localizado asociadas con la membrana plasmática.

Funciones de las proteínas arabinogalactanas.

Con base en su localización extracelular predominante, y a sus propiedades bioquímicas y físicas, se ha propuesto que las AGP's pueden actuar como pegamento, lubricante y humectante, como en el caso de la goma arábica, obtenida de una especie de Acacia cuando se somete a daño. Su abundancia en la lámina media de la pared así como en los estilos de angiospermas y en la médula de los nódulos ha fortalecido la hipótesis de que participan en el proceso de reconocimiento célula-célula, como en el caso de la proteína TTS, del tejido transmisor de estilos de tabaco, la cual se adhiere al tubo polínico y promueve su crecimiento (Wu *et al.*, 1995).

Es posible que algunas AGP's realicen alguna función durante la histogénesis del órgano floral y la diferenciación, ya que existen evidencias de su regulación por desarrollo en flores, embriones y raíces (Kreuger *et al.*, 1996). Dicha función podría involucrar interacciones célula-célula en donde las AGP's podría estar funcionando como moléculas de adhesión capaces de unirse a ligandos en la pared celular y ser marcadores de la posición celular durante la diferenciación (Fincher *et al.*, 1983).

Lectinas de Solanáceas.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen a carbohidratos. Las lectinas de solanáceas, forman un grupo que se distingue por su presencia en este grupo de plantas, así como por su capacidad de aglutinar oligómeros de N-acetil-glucosamina, su localización predominantemente extracelular y su composición inusual de aminoácidos y carbohidratos, siendo la hidroxiprolina y la arabinosa los constituyentes más abundantes.

La lectina de solanáceas mejor caracterizada es la de tubérculo de papa (PTL), el monómero de esta glicoproteína pesa 55 kD y posee 50% en peso de carbohidratos y 50% de proteína. El dominio glicoproteico rico en serina-hidroxiprolina de la PTL y de otras lectinas de solanáceas la relacionan bioquímicamente con las extensinas. Existen otras similitudes entre estos dos tipos de HRGP's como son su localización extracelular, su abundancia en serina, hidroxiprolina y arabinosa y la presencia de uniones idénticas entre carbohidrato-proteína.

Funciones de las lectinas de Solanáceas.

Se ha reportado que la PTL se acumula en respuesta a daño e infección viral. Así mismo, que es capaz de aglutinar *Pseudomonas solanacearum* avirulentas y no así las

virulentas.

Potencialmente, debido a su co-localización, las lectinas de solanáceas podrían estar interactuando con extensinas. Sin embargo, debido que el contenido de tirosinas y lisinas es considerablemente mas bajo que en las extensinas, se especula que el entrecruzamiento mediante isoditirosinas y las interacciones ionicas con moléculas cargadas negativamente es poco probable. Alternativamente los dominios ricos en glicina-cisteina pudieran ser capaces de interactuar con otros componentes de la pared celular.

Se sugiere que una de las posibles funciones de este tipo de lectinas involucra interacciones célula-célula. Otras podrían ser el transporte de azúcares, y el control de la división celular, así como la defensa de las plantas a patógenos, ya que pueden inmovilizarlos a través de la capacidad de unirse a oligómeros de N-acetilglucosamina (Showalter y Varner, 1989).

#### Proteínas quiméricas.

Existe un grupo de proteínas relacionadas con la pared celular, cuya secuencia está dividida en distintos dominios: dominios ubicados en la pared celular, que contienen secuencias repetidas ricas en prolina, y dominios citoplásmicos y/o transmembranales que tienen pocas prolinas, y mas bien contienen cisteínas y motivos relacionados con moléculas de adhesión (Deutch *et al.*, 1995; Marty, I. *et al.* 1996; He *et al.*, 1999) . En la sección que corresponde a funciones de la pared celular, se analizará el papel de este tipo de proteínas como mediadoras en los eventos de comunicación entre el citoplasma, la membrana y la pared celular.

Expansinas.

Las expansinas son proteínas de pared celular de 25-27 kDa que se encontraron por primera vez en hipocotilos de pepino y que tienen un fuerte efecto en la extensión de la pared celular a pH ácidos. La base molecular de su acción durante la expansión de la pared no se conoce con exactitud, sin embargo las evidencias indican que las expansinas causan un deslizamiento de la pared por el aflojamiento de las asociaciones no-covalentes entre los polisacáridos de la pared. Ensayos de unión indican que el sitio de unión y acción de las expansinas, parece ser la interface entre las fibras de celulosa y una o más hemicelulosas (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995).

Se sabe que las dos expansinas de pepino, varían entre sí bioquímicamente en lo que se refiere a su dependencia del pH, en sus efectos en la relajación de las paredes así como su resistencia a hervor con metanol. Es posible que las expansinas también varíen en la especificidad a su sustrato y actúen preferencialmente con algún componente de la pared celular (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995).

Actualmente, se han encontrado cDNA's que codifican para expansinas en otras especies de plantas como como *Arabidopsis*, chícharo, tomate e incluso en gimnospermas como pinos y se discute su posible papel durante procesos del desarrollo en donde la disolución de la pared para la separación es importante, como en la abscisión, la formación de espacios de aire y la dehiscencia de las vainas (Cosgrove, 1997).

Enzimas.

En la ME existen una gran variedad de enzimas que modifican a los diferentes componentes estructurales que ya se han mencionado. Entre las mejor caracterizadas están: peroxidasas, fosfatasas, invertasas,  $\alpha$ -manosidasas,  $\beta$ -manosidasas,  $\beta$ -1-3-glucanasas,  $\beta$ -1-4-glucanasas, poligalacturonasas, pectin metilesterasas, malato deshidrogenasas, arabinosidasas, metilesterasas pectica, malato deshidrogenasa, arabinosidasa,  $\alpha$ -galactosidasas, proteasas y ácido ascorbico-oxidasa (Cosgrove 1997).

## **FUNCIONES DE LA PARED CELULAR**

Las múltiples funciones de la pared celular que se han identificado, pueden clasificarse en cinco grandes grupos:

- 1) Fenómenos de crecimiento
- 2) Estructura y protección.
- 3) Desarrollo y diferenciación (morfogénesis)
- 4a) Respuesta a factores ambientales (estrés por frío y daño mecánico)
- 4b) Respuesta a factores ambientales (estrés hídrico)
- 5) Respuesta a patógenos y elicitores (estrés biótico)

1) Fenómenos de crecimiento. Como ya se mencionó en la primera sección, la pared celular juega un papel sumamente importante durante el proceso de crecimiento celular. Existen algunos modelos para explicar esta participación, siendo la teoría del crecimiento ácido uno de los más aceptados.

Esta teoría propone que las auxinas estimulan el crecimiento vegetal al incrementar la salida de protones del protoplasto a la pared celular. Esto provoca una disminución en el pH de la pared lo que induce un incremento en la extensibilidad de la pared y en consecuencia un incremento en la tasa de crecimiento.

Durante la expansión celular, la pared se convierte en un compartimento metabólicamente activo, por la activación de muchas de las enzimas que participan en su recambio. Las moléculas entrelazadoras se rompen enzimáticamente y la presión osmótica interna empuja a los componentes fibrosos. Nuevas microfibrillas y polímeros asociados se alinean a lo largo de la superficie interna de la pared, formando un complejo altamente estratificado y entrecruzado. El consenso entre los fisiólogos es que las glicanohidrolasas se secretan y/o son activadas en ciertos sitios específicos de la pared celular para liberar la tensión generada por los polisacáridos no-celulósicos que se entrelazan a las microfibrillas de celulosa.

2) Estructura y protección. Esta es quizá una de las primeras funciones que se le atribuyó a la pared celular, y se debe a que la pared provee a la célula vegetal de la rigidez y la protección necesaria sin impedir la difusión de agua y iones del ambiente extracelular hacia la membrana plasmática que es realmente la barrera semipermeable (Taiz, 1991).

También se han descrito algunos procesos más complejos relacionados con el establecimiento de la estructura celular en tejidos muy específicos, tal es el caso de la proteína NaPRP3 de *Nicotiana glauca* que es estructuralmente similar a las extensinas y se expresa exclusivamente en el tejido transmisor del estilo. Se postula una función estructural, ya que la deposición de pared en estas células estructura y refuerza las paredes del tejido conductor y permite la polinización (Chen *et al.*, 1992).

3) Desarrollo y Diferenciación. Entre las proteínas de pared celular mejor caracterizadas en lo que se refiere a su regulación durante el desarrollo se encuentran las PRP's de soya (SbPRP's). Se sabe por ejemplo, que la SbPRP1 se expresa en las células epidérmicas de la región de elongación y de la región madura del hipocotilo, así como en células del xilema, floema, raíz y cubierta inmadura de la semilla, específicamente en la zona lignificada alrededor del hilum. La SbPRP2 se expresa en células corticales y vasculares (floema) de hipocotilos apicales, en cultivos de células en suspensión jóvenes y en integumentos internos de semillas maduras. Por su parte la SbPRP3 se expresa en las partes aéreas como la epidermis de hojas, así como en la capa endodérmica del tejido que rodea al estilo y en la región de elongación de hipocotilos (Hong, J. *et al.*, 1989; Wyatt, R. *et al.*, 1992).

Además de las PRP's de soya, otras PRP's se han visto involucradas en el desarrollo, como es el caso de la PRP4 de *Medicago truncatula* que se expresa en el desarrollo temprano de meristemas de nódulos principalmente en las células meristemáticas de nódulos indeterminados (Wilson, R. *et al.*, 1994).

4a) Respuesta a factores ambientales (frío y daño mecánico). Algunas proteínas de pared celular se han relacionado a la respuesta de las plantas a factores ambientales como el frío y el daño mecánico. La regeneración de pared celular en protoplastos de células de tabaco estabiliza a los microtúbulos corticales contra los efectos dañinos del frío. De hecho, la adición de 0.1 mg/ml de extensina resultó ser igualmente efectiva en inducir esta estabilización (Akashi *et al.* 1990; 1991). Los transcritos de PRP1 y PRP2 de soya, así como las extensinas Tom J10 y Tom 2-4 de tomate y la p33 de zanahoria se regulan diferencialmente por daño físico (Suzuki *et al.*, 1993; Zhou *et al.* 1992; Tierney *et al.*, 1988).

#### 4b) Respuesta a factores ambientales (estrés hídrico).

Algunos estudios enfocados al estudio de los factores físicos y químicos que intervienen en la modificación de las paredes celulares durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico indican que la reducción en la tasa de crecimiento, no es simplemente una consecuencia de la pérdida de turgor, sino que se encuentra involucrado otro mecanismo relacionado estrictamente con las propiedades de extensibilidad de la pared celular (Iraki 1989b). Nonami y Boyer (1990a,b) sugieren que las respuestas físicas de la pared son más complejas, ya que demuestran que dos de los componentes responsables de la extensibilidad, esto es el componente elástico y el plástico, responden independientemente durante condiciones de bajo potencial hídrico en tallos de soya. Adicionalmente se sabe que el efecto del estrés osmótico en la extensibilidad de la pared es variable para cada especie, órgano y/o condición de crecimiento.

En cuanto a la modificación de los elementos estructurales de la pared durante el déficit hídrico se ha demostrado que los componentes celulósicos así como las pectinas (Iraki 1989a) y algunas proteínas como las AGP's (McCann 1994; Zhu 1993) sufren cambios importantes en las paredes celulares de las células de tabaco adaptadas a NaCl, cuando se comparan con las células no adaptadas al estrés osmótico.

En algunas plantas se han descrito mecanismos interesantes para evitar el endurecimiento de la pared celular durante situaciones de estrés osmótico y con esto asegurar el crecimiento, aun que sea a una tasa menor. Tal es el caso de los coleótilos de trigo, en que se ha observado que bajo condiciones de estrés osmótico, la concentración de polisacáridos, como arabinoxilanos y  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular de las paredes celulares, no se ve alterada y el incremento en las uniones de ac. ferúlico y diferúlico cesa. Lo anterior se refleja en el mantenimiento de la capacidad de extensión así como la prevención del endurecimiento y rigidez de la pared durante condiciones en que la tasa de crecimiento disminuye (Wakabayashi, 1997a, b). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual se efectúa esta supresión del endurecimiento de las paredes es a través del abatimiento de la biosíntesis de fenilpropanoides lo que resulta en niveles reducidos de ac. ferúlico y en consecuencia también de ac. diferúlico.

Como ya se mencionó, los componentes proteicos de las paredes celulares parecen jugar un papel importante durante el proceso de estrés hídrico. Plántulas de soya

muestran una disminución en el crecimiento del tallo cuando se exponen a bajos contenidos de agua ( $\Psi_w = -3$  bar). En estas condiciones, se han observado dos proteínas de pared celular que guardan un comportamiento opuesto. Una de 28 kD que aumenta principalmente en tejidos jóvenes y una de 70 kD que decrece en tejidos maduros. Se ha propuesto que la proteína de 28 kD está asociada al crecimiento temprano de la pared, mientras que la de 70 kD está asociada a la maduración de las paredes. Creelman (1991) por su parte analiza la expresión de algunos genes que codifican para proteínas de pared celular que se modulan por déficit hídrico en zonas de crecimiento de plántulas de soya. Un transcrito que codifica para una proteína quimérica de alfalfa, que contiene un dominio con la región conservada de la PRP-2, se induce por estrés salino (Deutch et al., 1995). Adicionalmente, Colmenero (1997) en nuestro laboratorio, caracterizó seis genes cuya expresión se induce durante el déficit hídrico en frijol. De éstos, dos corresponden a diferentes PRP's de pared celular. Otro grupo de proteínas de pared celular, como las ricas en glicina, también se han visto moduladas por el déficit hídrico (Creelman *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1996). Tal es el caso del aumento en la expresión de las proteínas ricas en glicina de la clase III de tomate (Showalter *et al.*, 1992).

Como ya se mencionó, las expansinas son proteínas que parecen tener un papel muy importante durante el crecimiento de la célula vegetal, debido a su capacidad de inducir la extensión de paredes celulares aisladas. La actividad de las expansinas se ha observado en las raíces primarias de maíz en que se ha demostrado un mantenimiento del crecimiento a bajos potenciales hídricos, mediante un proceso que involucra la actividad de expansinas así como cambios en la susceptibilidad de las paredes a dichas proteínas (Wu *et al.*, 1996).

5) Respuesta a patógenos y elicitores. Existen un gran número de trabajos en donde se reporta la acumulación de transcritos y proteínas de pared celular, y/o el entrecruzamiento de las mismas como respuesta a elicitores de hongos. Tal es el caso del transcrito de una HRGP que se acumula en hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* L después de la infección con *Colletotrichum lindemuthianum* (Templeton, M. *et al.*, 1990) y de la glicoproteína de 42 kD que se acumula en células en suspensión de la misma especie como respuesta de defensa a elicitores (Wojtaszek, P., *et al.* 1995). Se ha observado que cuando células de soya, así como de frijol, se tratan con elicitores de hongos, esto causa una rápida insolubilización de las proteínas ricas en hidroxiprolina de las paredes debido a entrecruzamiento oxidativo mediado por peróxido. Se postula que estos procesos

constituyen las primeras etapas de defensa de la planta contra patógenos y/o enfermedades (Wojtaszek *et al.*, 1995; Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.* 1994).

Para concluir esta sección, podemos decir que las células vegetales se encuentran rodeadas por una matriz extracelular semi-rígida que les da forma y que llamamos pared celular (fig. IV). Está compuesta por fuertes microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos y glicoproteínas altamente entrecruzadas químicamente entre sí. La pared celular tiene como funciones dar forma a la célula, proporcionar soporte al tejido vegetal y proteger a la célula vegetal de situaciones ambientales extremas (temperatura, estrés osmótico), así como de el daño causado por patógenos y/o herbívoros.

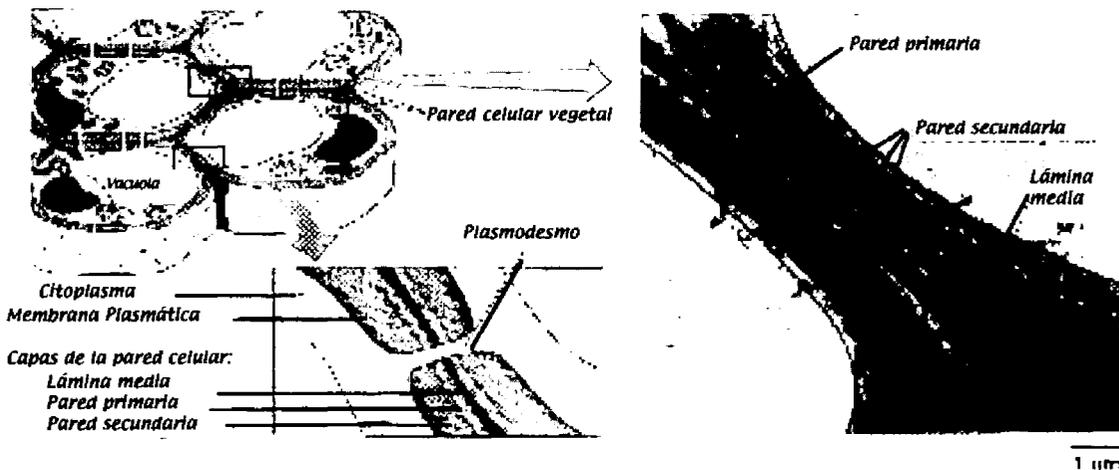


Fig.IV Estructura de la pared celular vegetal.

Campbell. 1996

### I.3 INTERACCIONES ENTRE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Las células animales se encuentran embebidas en una matriz extracelular (ME) intrincada y compleja que mantiene unidas a las células de un tejido, e influye en su diferenciación y comportamiento. Dicha ME está formada por proteínas fibrosas de tipo estructural (colágeno y laminina) y de tipo adhesivo (fibronectinas y vitronectinas) intercaladas en un gel hidratado compuesto de cadenas de glicosaminoglicanos (fig. V) (Alberts et al., 1994).

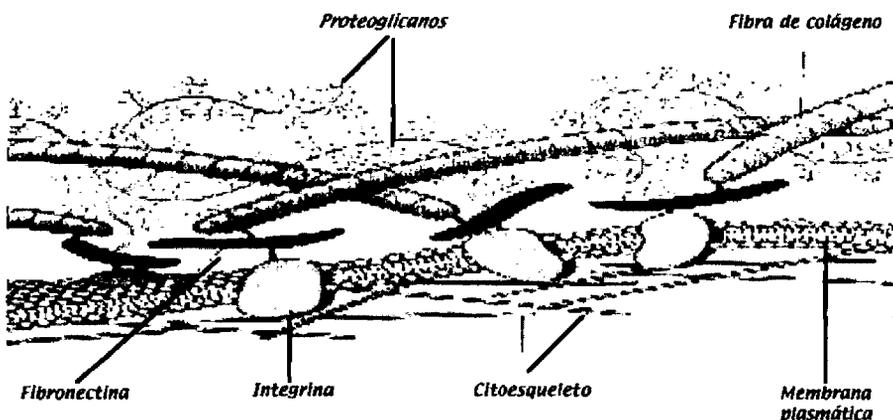


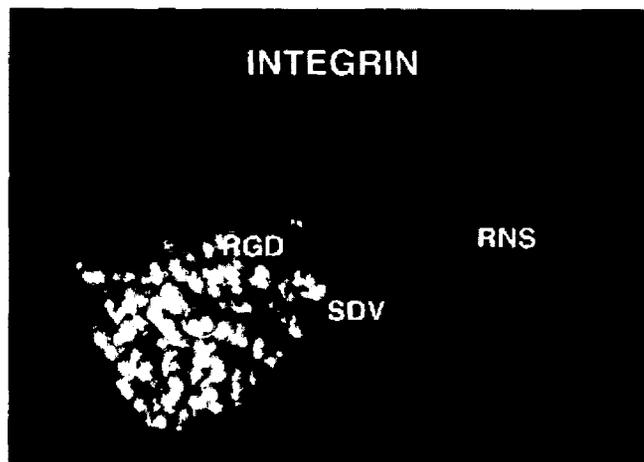
Fig. V Estructura de la matriz extracelular animal

Campbell, 1996.

Tanto las proteínas adhesivas como las estructurales poseen dominios de unión que mantienen en contacto a la MP con la ME a través de proteínas membranales tipo integrinas que funcionan como receptores, activando señales intracelulares como respuesta a factores externos (Alberts *et al.*, 1994 y Santoro y Zutter, 1995).

Las integrinas forman una gran familia de proteínas de unión de tipo transmembranal, están compuestas de dos subunidades de glicoproteínas asociadas no-covalentemente (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ), ambas subunidades están involucradas en la unión con las moléculas de la ME. Una subfamilia de las integrinas reconoce a la secuencia Arginina-Glicina-Acido aspártico (RGD) presente en varias proteínas de la matriz como fibronectina y vitronectina, mientras que otras reconocen otras secuencias o dominios

(Fig. VI) (Alberts *et al.*, 1994; Hynes, 1992). La unión de las integrinas a sus ligandos depende de cationes extracelulares divalentes ( $\text{Ca}^{2++}$  ó  $\text{Mg}^{2++}$  dependiendo de la integrina), esto refleja la presencia de 3 ó 4 dominios de unión a cationes divalentes en el dominio extracelular de la cadena alfa.



*Fig. VI Modelo que muestra la interacción entre integrinas y secuencias conservadas en las proteínas de ME.*

Las integrinas funcionan como “conectores” o “integradores”, mediando la interacción entre el citoesqueleto y la ME, regulando la forma, orientación y movimiento de la célula, así como activando vías de señalamiento intracelular como la del inositol fosfato (Alberts *et al.*, 1994). Aunque el mecanismo molecular aún no se conoce con exactitud, parece que el reclutamiento de integrinas y su unión con las proteínas de ME por un lado, y del citoesqueleto por el otro, son el disparador de estas señales intracelulares, que pueden traer como consecuencia modificaciones en el comportamiento celular frente a una situación específica ó cambios en la expresión de ciertos genes en el desarrollo de ciertos procesos celulares.

A la fecha se han acumulado múltiples evidencias que demuestran la estrecha relación entre algunos elementos de la pared celular de plantas con otros componentes celulares como la membrana plasmática (MP) y el citoesqueleto. Las interacciones se han observado durante el desarrollo de la célula vegetal, así como por efecto de factores externos a esta. Como ya se mencionó, estas interacciones entre la matriz extracelular (ME) y la membrana plasmática han sido extensamente estudiadas en células animales.

La relación de la membrana plasmática de las células vegetales con la pared celular, es un proceso poco estudiado. La información con la que se cuenta es muy limitada, de tal forma que resulta difícil establecer una comparación integrada con lo que ocurre en animales. La búsqueda en plantas de moléculas de adhesión similares a las de origen animal (fibronectina, vitronectina) no ha sido exitosa, sin embargo, se ha detectado la presencia de proteínas cuya función es similar a las de las integrinas. Lo anterior indica que si bien, la composición de las paredes celulares vegetales es distinta a la matriz extracelular animal, existen componentes análogos a ella, que permitirían la existencia de sistemas similares de interacción de los elementos de la pared celular, con la membrana plasmática, como requerimiento para una detección eficiente del estatus ambiental y del desarrollo.

En plantas se han descrito proteínas que pudieran estar relacionadas con procesos de transducción de señales medio-ambientales: proteínas transmembranales, proteínas que establecen la unión con el citoesqueleto así como glicoproteínas de la interfase membrana-ME. Se sabe muy poco de las posibles funciones de todas estas proteínas y del papel que la matriz extracelular vegetal (MEV) pueda estar jugando. A continuación se mencionan algunos de los ejemplos mejor estudiados, aparentemente involucrados en el proceso adhesivo.

#### Establecimiento de la polaridad.

Un ejemplo clásico de la inducción de la polaridad es el establecimiento del sitio de brotación de los rizoides en los huevos fertilizados del alga café *Pelvetia* o *Fucus*. La luz proveniente de un solo punto induce la emergencia de los rizoides en la parte no iluminada. Aproximadamente ocho horas antes de la brotación, el eje se fija y la luz ya no tiene ningún efecto. En este momento, los filamentos de actina forman adhesiones focales en el sitio en donde el rizoide crecerá (Quatrano *et al.*, 1997). La pared celular es necesaria para fijar el eje, y los elementos transmembranales que conectan al citoesqueleto con la MEC parecen estar implicados en la estabilidad de los componentes membranales del eje. Usando anticuerpos anti-vitronectina humana, se ha encontrado en *Fucus* una proteína de 65 kDa, en tanto que utilizando anticuerpos anti-integrina  $\beta 1$  de pollo, se han identificado otras dos proteínas de 92 y 116 kDa respectivamente. Lo anterior indica que probablemente el alga contiene al menos tres de los componentes necesarios de una adhesión focal (Wagner *et al.*, 1992 y Quatrano *et al.*, 1991).

En el alga *Chara* (Katembe, 1997), las células de los internodos crecen

diferencialmente en respuesta a la gravedad y a una diferencia de presión hidrostática entre las células de la parte alta y baja. Se ha propuesto que interacciones entre el citoesqueleto y la ME son importantes para percibir la diferencia de presión. Después de someter al alga a plasmólisis, se han observado sitios localizados de adhesión de la membrana con las paredes, indicando una interacción entre elementos del citoesqueleto con la pared a través de elementos transmembranales. Aún no se han caracterizado las moléculas involucradas en esta adhesión, sin embargo un péptido que contiene la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) bloquea la percepción de la gravedad, y no así los péptidos, DGR y RGE. Como se mencionó anteriormente, el motivo RGD es común en los dominios de unión de varias proteínas animales de ME, con elementos transmembranales. La inhibición antes mencionada sugiere que proteínas de matriz relacionadas con motivos RGD, podrían estar involucradas en la percepción de la gravedad, o bien que existen receptores tipo integrinas animales que reconocen la presencia de péptidos con la secuencia RGD.

#### “Migración” en plantas.

Uno de los ejemplos de “migración” que existe en plantas, lo constituye el crecimiento del tubo polínico a través del estilo de la flor para depositar la célula espermática en el óvulo. Aunque la comparación con la migración de las células animales no es estricta, la presencia de un tracto de ME que dirige el crecimiento de un punto del tubo polínico, puede considerarse análogo. La proteína de 55 kDa presente en las paredes primarias de varias especies de plantas superiores, y que es reconocida por anticuerpos anti-vitronectina humana está altamente enriquecida en el tejido transmisor del pistilo (Sanders *et al.*, 1991). Adicionalmente, durante el crecimiento *in vivo* del tubo polínico se ha detectado actina en adhesiones focales, justo en el sitio de crecimiento del tubo polínico, cosa que no ocurre *in vitro*. Por lo anterior, se ha propuesto un modelo para la extensión del tubo polínico, en el que elementos de unión transmembranales en el punto de crecimiento, reconocen y se unen a la proteína parecida a vitronectina del estilo, ocurriendo la consecuente organización de actina en adhesiones focales (Lord y Sanders 1992).

#### Procesos de adhesión durante el desarrollo y el estrés.

Cuando se plasmolizan las células de plantas adultas, la célula reduce su volumen, induciendo la pérdida de contacto de la membrana plasmática con la pared

celular. Sin embargo, en algunas células se han observado puntos localizados de adhesión entre la membrana plasmática y la pared. Este tipo de uniones se manifiestan como una plasmólisis “concava” en las células epidérmicas de bulbos de cebolla (Pont-Lezica, *et al.*, 1993), así como en células de *Arabidopsis* sometidas a plasmólisis (Canut, *et al.*, 1998)

Otro ejemplo de adhesión localizada se encuentra en el proceso de diferenciación *in vitro* de las traqueidas de *Zinnia*. La plasmólisis de estas células durante ciertas etapas del desarrollo revela una fuerte adhesión de la membrana plasmática a la pared primaria justo en las regiones de engrosamiento secundario. Así mismo, se han localizado filamentos de actina en estas regiones (Roberts y Heigler, 1989).

Las fuertes uniones de la membrana plasmática con la pared también se presentan en células que están adaptadas a crecer en condiciones de estrés biótico y abiótico. Anticuerpos contra vitronectina humana así como la misma vitronectina humana inhiben la unión de *Agrobacterium tumefaciens* a células de cebolla, lo que sugiere que una proteína de la superficie de las células de cebolla, parecida a vitronectina es el receptor de *A. tumefaciens* (Wagner y Matthyse, 1992).

En el caso de chícharo, la síntesis de fitoalexinas en respuesta a patógenos se ve reducida si se incuba a la planta con péptidos que contienen la secuencia RGD y no así con los que contienen la secuencia RGE (Kiba, *et al.*, 1998) detectándose varias proteínas de la pared celular que son reconocidas por anticuerpos anti vitronectina y otras de membrana plasmática que son reconocidas por al anticuerpo anti-integrina  $\beta 1$ .

Así mismo, Zhu y colaboradores (1993), descubrieron una adhesión excepcionalmente fuerte entre la membrana plasmática y la pared de células de tabaco adaptadas a crecer en medio líquido con un exceso de NaCl. Además de otras moléculas, el inhibidor más fuerte de esta adhesión fué un péptido que contenía la secuencia RGD. Tanto en las células adaptadas como en las no adaptadas, se demostró la presencia de un polipéptido de 55 kDa que es reconocido por un anticuerpo policlonal anti-vitronectina humana tanto en paredes como en membranas microsomales. También se ha detectado un polipéptido de aproximadamente 59 KD en las células adaptadas a sal, el cual es reconocido por el anticuerpo anti-fibronectina humana. El incremento en la adhesión de las células adaptadas a sal debe aparentemente, involucrar tanto a componentes de la ME como componentes de la MP.

En células del mesófilo de la angiosperma acuática, *Valisneria gigantea*, se ha reportado que la asociación de la membrana plasmática con la pared celular es

indispensable para mantener la organización de la trama de microfilamentos. Esta interacción parece estar mediada por proteínas de MEC que contienen la secuencia conservada RGD y/o RYD (Ryu, *et al.*, 1997).

Se han reportado otras proteínas que parecen estar inmunológicamente relacionadas con vitronectina humana y/o integrinas, en plantas, aunque su función no ha quedado aún tan claro como en los ejemplos anteriores. Uno de los primeros reportes es el de Shindler (1989) quien, utilizando una columna de RGD-agarosa, purifica un polipéptido de 70-72 kD que cruza inmunológicamente con el receptor de vitronectina. Posteriormente, usando anticuerpos anti-integrina se detectaron diferentes polipéptidos relacionados en raíces y tallos de *Arabidopsis* así como en las células de los internodos de *Chara*. En el mismo trabajo, demuestran mediante fluorescencia que estos polipéptidos están asociados a membranas celulares. Por otro lado, ha sido posible evaluar, la alta afinidad que tiene la membrana plasmática de *Arabidopsis*, por péptidos sintéticos que contienen la secuencia RGD, así como por Pronectina F, proteína sintetizada por ingeniería genética que contiene 13 secuencias de RGD (Canut *et al.*, 1998). Mediante un sistema de visualización computarizado, se han logrado visualizar integrinas putativas en la membrana de células de cebolla formando complejos focales con otras proteínas como espectrina, actina, filamentos intermedios así como con fibronectina y vitronectina (Gens *et al.*, 1996; Reuzeau, *et al.*, 1997). Muy recientemente se han caracterizado e inmunodetectado por fluorescencia a proteínas de superficie celular de *Arabidopsis* y *Rubus*, que muestran propiedades estructurales similares a la integrina  $\alpha$ II $\beta$ 3, se ha encontrado que estas proteínas tienen un peso aparente de 30 y 60 kD (Faik *et al.*, 1998).

En cuanto a la búsqueda de los genes que codifican para integrinas de plantas, se han rastreado bancos de expresión de *Arabidopsis*, encontrando algunas clonas que corresponden a proteínas que presentan homologías con integrinas de animales. (Laval *et al.*, 1997; Punita y Quatrano 1998; Laval *et al.*, 1999).

Las proteínas quiméricas que poseen dominio(s) característicos de proteínas de pared y otro(s) dominio(s) de anclaje y/o interacción con membrana plasmática, apoyan la idea de que las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGP's), descritas con anterioridad, son candidatas para ser algunas de las moléculas de unión de la pared con la membrana plasmática. Los dominios que conforman a proteínas parecidas a extensinas ricas en cisteínas de la familia CELP de tabaco (Wu, 1993), la glicoproteína específica de inversión (ISG) de *Volvox* (Ertl, 1992), la molécula de adhesión(CAM) de algas (Hubert,

1994), las proteínas de *Arabidopsis* ricas en glicina y prolina que interactúan con microsomas (Marty, I. *et al.* 1996), así como la que contiene un dominio de cinasa y otro extracelular (He *et al.*, 1996) indican que estas proteínas están embebidas en la pared celular y que a su vez se encuentran interactuando con la membrana plasmática, el citoplasma, el citoesqueleto y/o el medio extracelular. Recientemente se ha sugerido que proteínas arabinogalactanas que poseen dominios de anclaje del tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI), pueden estar involucradas en vías de transducción de señales durante la proliferación celular y la embriogénesis somática (Schultz *et al.*, 1998)

En *Brassica napus*, se aisló un cDNA inducible por frío con características modulares: un amino terminal que posee un péptido señal a retículo endoplásmico, seguido por 3 dominios ricos en prolina y un carboxilo terminal con tres regiones transmembranales (Goodwin, 1996). Otros componentes de la ME se han caracterizado como involucrados en las interacciones membrana plasmática-ME, tal es el caso de cinasas asociadas a pared (WAK's) de *Arabidopsis*, que contienen un dominio citosólico de cinasa, un dominio transmembranal, y otro relacionado con proteínas de ME animal, como el factor de crecimiento epidérmico, tenacina y otros (He *et al.*, 1999).

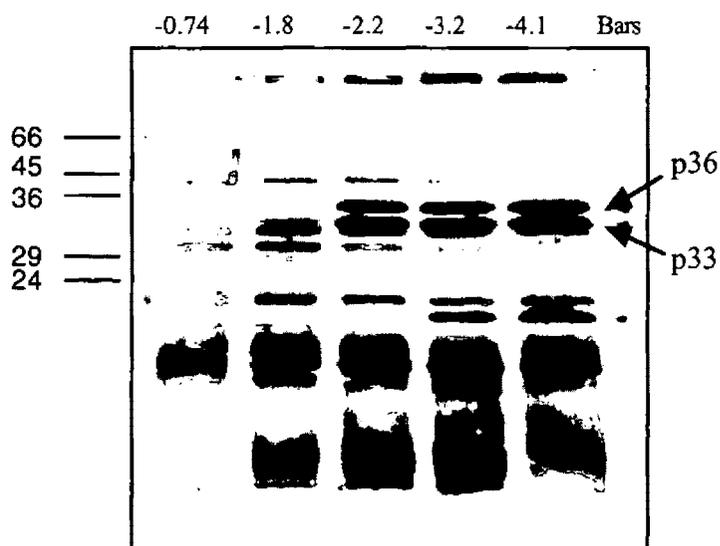
En resumen, es hasta hace muy poco, que el énfasis de los trabajos relacionados con la MEV han dirigido las investigaciones dentro de un contexto más celular y molecular. La idea central de todos ellos radica en que la célula no sólo regula su pared celular, sino que ésta también puede afectar el comportamiento celular a través de interacciones diversas con la MP. Por ejemplo, puede contribuir al mantenimiento de la polaridad celular, la morfogénesis, la protección durante la plasmólisis causada por un choque osmótico e incluso podría tener funciones señalizadoras, ya que a pesar de las diferencias con la ME animal, se cuentan con evidencias para afirmar que existe un sistema de detección del estatus ambiental y del desarrollo común en plantas y animales que justamente inicia en la interfase MP-ME. Por lo anterior, el estudio de proteínas de pared celular que responden específicamente a factores externos y que pudieran estar interaccionando con otros componentes celulares cobra gran interés.

#### **I.4. ANTECEDENTES**

Dado nuestro interés en estudiar el papel que juega la matriz extracelular en la respuesta a la sequía, en nuestro laboratorio se han identificado dos glicoproteínas de frijol (var. Negro Jamapa), de 33 y 36 kilodaltones (p33 y p36) las cuales se encuentran relacionadas inmunológicamente entre sí, y que se acumulan en la fracción soluble de la pared celular. Estas proteínas se acumulan en altos niveles en plantas de frijol en respuesta al estrés osmótico, así como por tratamiento con la hormona ácido abscísico (ABA) (Covarrubias, et.al., 1995) (Fig. IV y V), sin embargo no se ha visto que respondan al daño mecánico ni a tratamiento con elicitores.

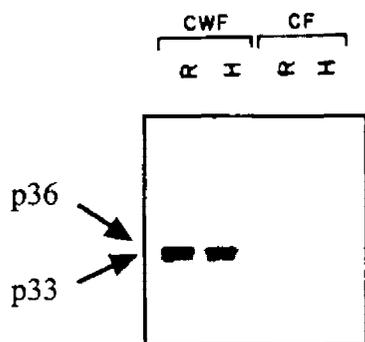
Cabe recalcar, que la acumulación de p33 y p36 siempre se ha observado en la fracción soluble de la pared celular, a diferencia de muchas de las proteínas de este tipo, que más bien se han observado unidas covalentemente (insolubilizadas) a otros elementos de la pared celular.

Se cuenta con evidencias bioquímicas (fraccionamiento celular) (Covarrubias *et. al.*, 1995) y citológicas (inmunolocalización) (Hernández M., en preparación) de que p33 y p36 se encuentran en la pared celular de células de hipocotilos y de raíces de plántulas de frijol sometidas a déficit hídrico. Ensayos de impresión de tejidos en nitrocelulosa ("tissue printing") indicaron que al menos p33 se encuentra muy abundantemente en células del floema, así como en las células de la epidermis. Mediante ensayos tipo western se observó que la acumulación de p33 y p36 en las paredes de células de plántulas de frijol, tiene una distribución a lo largo del eje del hipocotilo, ya que se encontraron más acumuladas en la zona de elongación, y en menor cantidad en las zonas de división y maduración, respectivamente, mientras que en el epicotilo, prácticamente no se detectaron.



**Fig. IV** Patrón de proteína de un extracto ácido de hipocotilos de frijol bajo condiciones de déficit hídrico.

Plántulas de 72 h de germinación se transplantaron a vermiculita bien irrigada (-0.74 bares) o a bajos potenciales de agua (-1.8, -2.2, -3.2 y -4.1 bares). Las proteínas obtenidas de una extracción ácida (25  $\mu$ gcarril) se separaron en un gel al 12% SDS-PAGE (Tomado de Covarrubias et al., 1995).



**Fig. V** Inmunodetección de p33 y p36 en la fracción de pared celular de plántulas de frijol.

Proteínas de pared celular (CWF) y citoplásmicas (CF) de hipocotilos (H) y raíces (R) de plántulas de frijol sometidas a déficit hídrico, se separaron electroforéticamente y se transfirieron a nitrocelulosa para realizar un ensayo tipo Western usando anticuerpo anti-p33 (Tomado de Covarrubias et al., 1995).

### **HIPOTESIS**

Las proteínas p33 y p36 son proteínas de MEV capaces de interactuar con membrana plasmática y/o con otros componentes de la ME. Su función durante la respuesta a estrés osmótico pudiera estar relacionada con procesos de protección de la integridad celular, así como de transducción de señales hacia el interior de la célula.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la posible función de las proteínas de MEV p33 y p36 en la respuesta a condiciones de déficit hídrico, mediante el análisis de algunas de las propiedades que las relacionan con la membrana plasmática.

### **Objetivos Particulares**

- 1.- Investigar si p33 y p36 son capaces de interactuar con la superficie celular.
- 2.- Explorar si p33 y p36 comparten algunas propiedades con proteínas de ME animal que participan en procesos de adhesión.
- 3.- Analizar algunas de las características de la interacción con la superficie celular.

IH/ST

Date: Wed, 01 Mar 2000

Dr Alejandra A Covarrubias  
 Dept de Biología Molecular de Plantas  
 Instituto de Biotecnología  
 Universidad Nacional Autónoma de México  
 Apdo. Postal 510-3  
 Cuernavaca  
 Morelos 62250  
 Mexico

Re: TPJ99/1999/84

Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein

Authors: Blanca I García-Gómez, Magdalena Hernández, Francisco Campos, Alejandra A Covarrubias.

acceptance of TPJ99/1999/000519

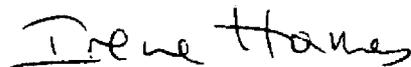
Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein

Blanca I García-Gómez, Francisco Campos, Magdalena Hernández and Alejandra A Covarrubias

Dear Dr Covarrubias

You will be pleased to know that Jean Dénarié has recommended your revised manuscript for publication. You can therefore now take it as accepted for The Plant Journal. A formal letter will be sent to you in the next few days. Glad to be able to bring you good news!

Yours sincerely



Dr Irene Hames  
 Managing Editor

EDITOR-IN-CHIEF  
 Dianna Bowles, UK

EDITORS  
 Thomas Altmann, Germany  
 Jeff Dangl, USA  
 Jean Dénarié, France  
 Jérôme Giraudat, France  
 Harry Klee, USA  
 Maarten Koomneef, Netherlands  
 Cathie Martin, UK  
 Gregory Martin, USA  
 Julian Schroeder, USA  
 Mark Stitt, Germany

EDITORIAL OFFICE  
 Dr Irene Hames  
 Managing Editor  
*The Plant Journal*  
 The Plant Laboratory  
 Department of Biology  
 University of York  
 Heslington  
 York YO10 5DD, UK  
 Tel: +44 1904 434338  
 Fax: +44 1904 434339  
 e-mail: plant.j@york.ac.uk

# **Manuscript**

## **Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein**

**Blanca I. García-Gómez, Francisco Campos, Magdalena Hernández and Alejandra A. Covarrubias\***

**Departamento de Biología Molecular de Plantas,  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3,  
62250 Cuernavaca, Morelos, México.**

Word count: 6,830

Running title:

**Bean cell wall proteins that interact with plasma membrane**

**Keywords:** cell wall, plasma membrane proteins, osmotic stress, proline-rich proteins.

Corresponding author: **Alejandra A. Covarrubias, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 622250, México.**  
E-mail: [crobles@ibt.unam.mx](mailto:crobles@ibt.unam.mx)  
Tel: (52)(5)622-7643; Fax: (52)(73)13 9988

## Summary

Two antigenically related glycoproteins, called p33 and p36 accumulate in the soluble fraction of the cell wall in response to water deficit in *Phaseolus vulgaris* (Covarrubias *et al.*, 1995). In this work, we show that p33 and p36 are able to adhere to leaf protoplasts and that they bind to plasma membrane (PM) vesicles, in a divalent cations-dependent manner. Data from the partial amino acid sequence of the p33 and p36 proteins indicate that they contain repeats of the decapeptide POVYKPOVEK; therefore, they are related to proline-rich proteins. Binding assays demonstrate that both proteins specifically bind to an 80 kDa PM protein. This binding is competed with a peptide that contains the RGD motif, as well as with fibronectin, which also includes this sequence, suggesting that the 80 kDa PM protein has an integrin-like function whose natural ligands are p33 and p36. This is the first case where a PM ligand for a higher plant cell wall protein has been identified.

## Introduction

Water limitation interferes with normal patterns of plant growth and development and induces adaptative responses at different levels (Bray, 1997). At the cellular level, water deficit could result in alterations in cell volume and shape and loss of turgor. Physical and biochemical alterations of the cell wall in response to water stress have been reported (Iraki *et al.*, 1989; Wakabayashi *et al.* 1997; Wu *et al.*, 1996). The accumulation of some proteins (Covarrubias *et al.*, 1995) and several cell wall protein transcripts have been found to be affected by water deficit. An increase in proline-rich proteins (PRP) mRNA in response to water deficit has been observed. That is the case of the soybean PRP1 mRNA (Creelman *et al.*, 1991), two different common bean PRP transcripts, one of which showed high homology with soybean PRP2 (Colmenero-Flores *et al.*, 1997), and an alfalfa transcript encoding a chimeric PRP2 protein (Deutch and Winicov, 1995). Also, the tomato class III glycine-rich protein transcript has been shown to accumulate by drought stress (Showalter *et al.*, 1992).

Additional alterations occur as a consequence of a water deficit. The excessive loss of turgor produces cellular plasmolysis, during which interaction sites between the cell wall and the PM have been observed (Schindler *et al.* 1989). When plant cells are exposed to hypertonic solutions, plasmolysis results in points of continued attachment between PM sites and the cell wall (Oparka, 1994). These points of attachment have also been observed during the *in vitro* development of xylem cells in *Zinnia*, a tight adhesion of the membrane and the primary wall is detected in the plasmolysis stage, in those regions where actin filaments are seen (Roberts and Heigler, 1989). In the brown algae *Fucus*, a localized adhesion of the membrane and the cell wall is observed at the rhizoid tip after plasmolysis of the embryo (Quatrano and Shaw, 1997).

The attachment of anchorage-dependent animal PM to the extracellular matrix (ECM) is essentially mediated by divalent cation-dependent cellular recognition events between a class of PM receptors, termed integrins and a family of ECM-localized adhesive glycoproteins (Hynes, 1992). In plants, it has been suggested that, at least in some cases, the PM-ECM interaction occurs through the participation of integrin-like proteins and plant ECM proteins containing the RGD peptide. Addition of synthetic peptides containing the RGD or RYD sequences to plant cell suspension cultures induces significant changes in the cell wall/PM interactions, altering the growth rate, as well as the stationary organization of the microfilament bundles (Schindler *et al.*, 1989; Ryu *et al.*, 1997). Also, covisualisation in living onion cells of putative integrin and ECM associated proteins, as well as of integrin and cytoskeletal elements have been reported (Gens *et al.*, 1996; Reuzeau *et al.*, 1997). In addition, plant integrin-like proteins have been found in the PM of tobacco, *Arabidopsis*, *Chara*, soybean and onion (Faik *et al.*, 1998; Katembe *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1998; Reuzeau *et al.*, 1997; Schindler, 1989).

In an effort, to understand the role of the cell wall in response to water deficit, we have identified two glycoproteins of 33 and 36 kDa (p33 and p36), immunologically related and localized to the cell wall. These proteins accumulate in response to water stress and treatment with ABA in bean plants (Covarrubias *et al.*, 1995). In this work, we report the partial amino acid sequences of p33 and p36, which suggest that these proteins are similar to PRPs, in particular to the so called PRP2 of soybean and PRP4 from alfalfa. Also, we explored the possibility that these cell wall proteins could be interacting at the interface cell wall-PM, which could suggest that they function as linkers, stabilizing communication trends and/or providing physical support to the cell during water deficit.

## Results

### *p33/p36 proteins are able to adhere to bean protoplasts.*

The possibility that these cell wall proteins interact with PM was first explored by looking at their ability to adhere plant cell protoplasts. Adhesion experiments were carried out using a protein fraction that contained both p33 and p36 with a 98% purity (Figure 1a). Because all the procedures we have tested to obtain the native proteins resulted in their co-purification (unpublished results), most experiments in this work were carried out with fractions containing both proteins. Results in Figure 1b show that 0.5 mg (7.5 pmol), 1.0 mg (15 pmol) and 2.0 mg (30 pmol) of p33/p36 proteins were able to adhere 60%, 70% and 80% of the added protoplasts, respectively; while, under the same conditions, only 5% of the protoplasts adhered to 10 mg (150 pmol) of BSA. To confirm that the adhesion effect was due to characteristics present in these proteins, prior to the addition of protoplasts, immobilized

proteins were incubated with an anti-p33 polyclonal antibody (1:500, 1:5,000 and 1:20,000) that recognizes both p33 and p36 (Covarrubias *et al.*, 1995). Adhesion of protoplasts to p33 and p36 was inhibited in a concentration-dependent manner in the presence of variable amount of antibody (Figures 1b and 1c). To demonstrate that neither the protein concentration nor the IgG's were factors that could be affecting the adhesion of the protoplasts, a non-related antibody (rabbit IgG's) was used at a concentration similar to the one present in the lowest dilution of anti-p33. In this case, only a 10% reduction in the adhesion of the protoplasts was detected (Figure 1b). In an additional experiment, using polylysine (Boehringer Mannheim) as an adhesive agent, the different dilutions of the anti-p33 antibodies were unable to compete the binding of the protoplasts (data not shown), indicating that the inhibition of the binding of the protoplasts to the immobilized p33/p36 proteins by the anti-p33 antibody was specific.

The possibility that proteinaceous elements were involved in the interaction between p33/p36 and the protoplast surface was explored by treating the protoplasts with trypsin. As shown in Figure 1b, protoplasts subjected to a 5 min proteolytic treatment were unable to efficiently bind to the immobilized p33/p36 proteins. The effectiveness of the treatment increased with an increase in trypsin concentration up to 3 ng/ml. Higher concentrations of this enzyme (5, 8 or 10 ng/ml) caused bursting of some protoplasts (data not shown). Proteases inhibitors eliminated the effects of trypsin. Adhesion was not affected when protoplasts were treated with 1 and 3 ng/ml of trypsin simultaneously with 1 mM PMSF (Figure 1b), suggesting that the proteolytic activity of trypsin disturbs the interaction between p33/p36 and protoplasts, through a putative ligand.

Since these results suggested that p33/p36 interact with the surface of the protoplasts, we carried out binding experiments where bean protoplasts were incubated with p33/p36 and, after several washes, bound proteins were detected with anti-p33 antibody (1:50) and a secondary antibody coupled to a fluorophore (1:2,000). As shown in Figure 2, the fluorescent signal was evident in those cases where p33/p36 were added to the protoplasts. In contrast, those samples in which p33/p36 were not added, or where preimmune serum was added, showed only a reduced signal.

Given the adhesive functions of p33/p36, we investigated whether they were able to bind to glass or to heparin as in the case for some animal adhesion proteins (Ayad *et al.*, 1994). For this, we carried out binding experiments where p33/p36 were incubated with glass or heparin matrices. Only 10% and 5% of the load p33/p36 bound to glass beads or heparin, respectively; while 80% of the fibronectin remained bound to glass and 40% to heparin. This result is consistent with the fact that p33 and p36 do not cross react with antibodies against vitronectin or fibronectin (data not shown).

### ***p33/p36 bind to intact PM vesicles.***

To exclude the possibility that some cell wall residues remanent from a partial cell wall digestion during the obtention of the protoplasts could be contributing to the binding of the p33/p36 to the protoplasts surface, we carried out a binding assay using purified PM vesicles which were incubated with a biotinylated protein fraction that contains p33, p36 and an additional 68kDa protein (Figure 3a, lane 1). After washing the non-specifically bound material, only the biotinylated p33 and p36 remained bound to the PM, in contrast to the 68kDa protein which was washed out and, consequently, not detected as associated to PMs (Figure 3b, lane 1). Similar results were obtained when binding assays were performed with each protein (p33 or p36), previously purified by electroelution (Figure 3a, lanes 2 and 3). These data indicate that each protein was able to bind independently to the membrane fraction (Figure 3b, lanes 5 and 6).

Since calcium is an abundant component of plant ECM (McCann and Roberts, 1991), participation of calcium ions in the interaction between the p33/p36 and the PM was investigated. To address this question, binding assays were carried out in the absence or presence of Ca<sup>2+</sup> ions, with or without EGTA, a Ca<sup>2+</sup> chelating compound. As shown in Figure 3b, the highest levels of bound p33 and p36 were detected in the presence of calcium ions (Figure 3b, lanes 2, 7 and 8); a significant decrease in the levels of bound p33 and p36 was observed when Ca<sup>2+</sup> was not added (Figure 3b, lanes 1, 5 and 6) or in the presence of EGTA (Figure 3b, lanes 4, 11 and 12). Although these data suggested that calcium ions are required to stabilize the interaction between the p33 and p36 and the PM, a more severe effect was observed when EDTA was used as chelating compound (Figure 3b, lanes 3, 9 and 10), suggesting the participation of additional divalent cations.

### ***p33 and p36 bind to an 80kDa PM protein.***

To seek for a specific PM protein that might participate in the interaction of p33/p36 to the PM, we carried out blot overlay-binding assays using proteins from purified PMs. The purity of the PM fraction used in this analysis was verified by determining the tonoplast V-ATPase and PM P-ATPase hydrolytic activities in both membrane fractions. A high enrichment of the V-ATPase and P-ATPase activities were detected in the tonoplast and PM fractions, respectively (Table 1). This was confirmed by western blot experiments using antibodies against PM H<sup>+</sup>-ATPase (Campos *et al.*, 1996), as well as antibodies against a tonoplast intrinsic protein (MIP-F) (Yamada *et al.*, 1995). These data indicated that the PM H<sup>+</sup>-ATPase was highly enriched in the PM fraction and barely detected in the tonoplast, whereas MIP-F was only detected in the tonoplast fraction (data not shown).

Proteins from purified PM were separated by SDS-PAGE (Figure 4a, lane 1) and transferred

onto nitrocellulose. After a renaturation step, nitrocellulose membranes were incubated in the presence of biotinylated p33/p36 (Figure 4b, lane 1) or, with p33 and p36 previously separated by electroelution (Figure 4b, lanes 2 and 3). Protein-protein interactions were detected with streptavidin-HRP and chemiluminescence. Results showed that both p33 and p36 were able to bind an 80 kDa PM protein (Figure 4c, lane 1 and Figure 6, lane 1). No signal was detected when tonoplast proteins were used (Figure 4c, lane 6). In addition, it was possible to compete the binding of the biotinylated p33/p36 by using either unlabeled p33/p36 (Figure 4c, lane 2 and Figure 6, lane 2) or anti-p33 antibody (Figure 4c, lane 3). Since  $\text{Ca}^{2+}$  ions seem to be required to stabilize the interaction between p33/p36 and intact PM vesicles, we asked whether this effect could be detected in the interaction between the 80 kDa PM protein and p33/p36 proteins. The addition of increasing  $\text{CaCl}_2$  concentrations (100 mM and 300 mM) to the BB allowed us to detect an increase in the interaction between p33/p36 and the 80 kDa PM protein (Figure 4c, lane 6 and 7). This interaction was inhibited when EGTA was present, in addition to  $\text{CaCl}_2$  (Figure 4, lane 8), supporting the enhancing effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in the binding of p33/p36 to the 80 kDa PM protein. Similar results were obtained when  $\text{Mg}^{2+}$  ions were added instead of  $\text{Ca}^{2+}$  (data not shown) indicating a more general requirement for divalent cations.

#### ***RGD-containing peptides compete the interaction of p33/p36 with PM.***

A number of reports support the existence of integrin-like proteins in plant systems. We asked whether the nature of the p33/p36 binding protein in the PM could be related to integrin-like proteins, using RGD- or RAD-containing hexapeptides to compete the binding of biotinylated p33/p36 in blot overlay-binding assays. As shown in Figure 5, the RGD-containing hexapeptide (340 mM) was able to compete the binding of p33/p36 to the 80 kDa PM protein (lane 5). This was not the case for either the RAD-containing peptide (340 mM) (lane 4) or a non-related peptide (340 mM; bp18: CKAKAEERKRRKMSRGLC) (lane 6). Additionally, we tested fibronectin (62 nM), a well characterized protein in animal systems which is known to contain the RGD sequence and to bind to integrin proteins. The results showed that this protein was also able to compete the p33/p36 binding to the 80 kDa PM protein (lane 3).

To support the data described above, we investigated whether the RGD peptide was able to compete the adhesion of plant protoplasts to p33/p36 by incubating protoplasts for 1 h with the RGD or RAD containing peptides, and then loaded them onto wells coated with p33/p36. The results from these experiments showed that the RGD peptide (340 mM) lead to a 90% inhibition of protoplast adhesion. In contrast, when the inactive RAD peptide (340 mM) was used, only a 10% inhibition was detected (Figure 6a and 6b).

### ***p33 and p36 are proline-rich related proteins***

To investigate the identity of p33 and p36, the amino acid sequence of internal peptides and of their amino-terminal ends were obtained. For p33, a 20 amino acids internal peptide showed the sequence KPOVEKPOVYKPOVEKPOVY. Similarly, for p36 the amino acid sequence of two internal peptides of 20 and 30 amino acids, only showed repetitions of the motif POVEKPOVYK. The presence of this repetitive motif in both proteins not only confirmed the relation between them, but also to the so called PRP2 from soybean (Hong *et al.*, 1990) and to PRP4 from alfalfa (Wilson, 1994). The amino acid sequence of p33 and p36 amino-terminal ends was the same, NYDXPOVEKPOVYKPOVEKP, except for the fourth residue which in p33 was V and in p36 corresponded to K. This amino acid sequence also showed high similarity to the SbPRP2 and MtPRP4 amino terminal ends (Hong *et al.*, 1990; Wilson, 1994) and to a 42 kDa protein previously characterized in *P. vulgaris* (Millar *et al.*, 1992).

### ***Soybean PRP2 competes the interaction of p33/p36 with the 80 kDa PM protein.***

Given the amino acid sequence similarity between p33, p36 and soybean PRP2, we evaluated the ability of SbPRP2 to compete the binding of p33/p36 to the 80 kDa PM protein in blot overlay-binding assays. The results in Figure 7 showed that SbPRP2 was able to compete the p33/p36 binding to the 80 kDa protein (lanes 1 and 2). Non-specific binding of SbPRP2 was discarded since biotinylated SbPRP2 interacted with a 80 kDa polypeptide and since this binding was competed by the p33/p36 proteins (Figure 7, lanes 3 and 4, respectively).

## **Discussion**

Although PRPs have been implicated in various aspects of plant development, in plant-microbe interactions and in the response to pathogen attack, their precise functions remain unknown. It has been suggested that PRPs play a role in structural strengthening or as an oxygen barrier since they are presumably insolubilized in the cell wall matrix (Cassab, 1998). Nevertheless, alternative functions have not been explored. In this work, we demonstrate that p33 and p36, two cell wall-glycoproteins that accumulate in response to water deficit in common bean, are related to PRPs and interact with an 80 kDa PM protein (pmp80). We present evidence that p33 and p36 proteins are able to bind to the plant cell surface using bean protoplasts. These proteins adhere to the protoplasts surface, either when they are immobilized as in cell adhesion assays (Figure 1), or when they are in solution as in experiments where p33/p36 were detected on the protoplasts outer face by

immunofluorescence (Figure 2). The possibility that this interaction was mediated through cell wall residues that had not been eliminated from the protoplasts surface was ruled out by using isolated PM vesicles (Figure 3). This binding assay allowed us also to test the requirement of calcium ions for this interaction. Our data indicate that although calcium is able to enhance the binding of p33/p36 to PM, additional divalent cations might play a role. These ions may interact directly with a PM component, as in the case of animal integrins where calcium ions bind to a specific domain in the  $\alpha$ -chain to stabilize the binding with their ligand (Hynes, 1992), or may bind to both elements which could ultimately contribute to stabilize the association.

In agreement with the results obtained from the adhesion assays where the proteolytic treatment suggested the involvement of PM proteins in the binding of p33/p36 to PM, the blot overlay-binding assays allowed us to show that, under our experimental conditions, p33 and p36 were able to recognize and bind only one PM protein with an apparent molecular mass of 80 kDa (pmp80) (Figure 4c). As in the case of the interaction of p33/p36 with PM vesicles, calcium and magnesium enhanced the interaction between p33/p36 and pmp80 (Figure 4d), supporting the idea that divalent cations are needed to stabilize the binding between these proteins. Although additional factors could be involved in the interaction of p33/p36 proteins with the protoplast surface, these data suggest that, at least, one PM protein is specifically involved.

Despite the fact that adhesion molecules similar to those described in animal cells have been unsuccessfully searched in different plant species using immunological approaches (Sanders *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996), the biological activity of the RGD-containing peptides is supported by various studies (Canut *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1989). Recently, an extracellular RGD-containing plant aspartic proteinase from pistils of *Cyanara cardunculus* was shown to interact specifically with a 100 kDa protein from pollen (Faro *et al.*, 1999). Therefore, even though non-homologous molecules to animal ECM proteins have been identified in plants, these data suggest that plant cells express receptors that recognize ECM proteins containing the RGD sequence or analogous functional domains. To investigate whether pmp80 was related to this kind of receptors, the effect of an RGD-containing peptide was analyzed, both in the protoplasts adhesion assays as well as in the blot overlay-binding assays (Figures 5 and 6). The results demonstrate that the RGD-hexapeptide, but not the RAD-containing peptide, inhibited the adhesion of the protoplasts to immobilized p33/p36. Similar results were obtained when these peptides were used to compete the binding of p33/p36 to PM proteins; that is, the RGD-hexapeptide as well as fibronectin inhibited the p33/p36 binding to pmp80 whereas no effect was detected with the RAD-hexapeptide, supporting the specificity of this interaction. These data strongly suggest

that pmp80 is a protein able to recognize an RGD sequence, an RGD-like configuration or an analogous functional domain in p33 and p36. Using purified membranes from *Arabidopsis*, Canut *et al.* (1998) have reported the presence of several RGD-binding sites with different affinities. They have proposed that the RGD-binding activity fulfills the characteristics of integrins. In the case of the pmp80 from bean cells, this possibility is under investigation.

The fact that p33/p36 proteins do not cross react with antibodies anti-vitronectin or anti-fibronectin suggested that there is no relation between these proteins. Consistent with this, the p33 and p36 partial amino acid sequences indicate that these proteins are closely related to PRPs, in particular to SbPRP2, MtPRP4 and Pvp42, since they contain the repetitive motif POVEKPOVYK and the sequence NYDXPOVEKPOVYKPOVEK in their amino-termini. Although the presence in p33/p36 of an RGD-motif cannot be totally discarded since we do not know their complete amino acid sequence, the fact that SbPRP2, whose complete sequence is known, is able to compete the binding of p33 and p36 to pmp80 and to bind to an 80 kDa PM protein, suggests that the interaction between pmp80 and p33/p36 does not occur through an RGD-sequence but rather through an RGD-like configuration (Greenspoon *et al.*, 1993). The amino acid sequence deduced from the SbPRP2 cDNA nucleotide sequence does not show an RGD-motif, its amino-terminus corresponds to NYENPOVYKPOTEK whereas the rest of the protein is constituted by 19 repetitions of the POVEKPOVYK-motif (Hong *et al.*, 1990). It has been shown by immunocytochemical localization that a similar protein from French bean (Pvp42) is particularly abundant in the plasmalemma-wall interface (Millar *et al.*, 1992). The identity of the motifs in these proteins that mimic the configuration of the RGD-functional groups awaits investigation. Interestingly, the proline-rich regions of some animal and bacterial proteins that contain repetitive proline-rich sequences have been considered as structural elements and have been implicated in binding processes that involve the recognition of specific proteins on the cell surface (Williamson, 1994; O'Sullivan *et al.*, 2000). This is the case of collagen, one of the most well-known PRPs and component of the ECM in animals, particularly in connective tissues (Alberts *et al.*, 1994). Both the fibrillar collagens, such as type I collagen, and the basement membrane-associated network-forming type IV collagen interact with the cell surface through integrin receptors (Käpylä *et al.*, 2000). In conclusion, in this work we demonstrate that PRPs, such as p33 and p36, interact with PM through a specific protein (pmp80), suggesting that PRPs may carry out alternative functions not necessarily related with their insolubilization in the cell wall matrix. Our data support the idea that PRPs play an important role, either during plant development or in response to environmental stimuli, by the recognition of specific PM proteins and further triggering of particular functions. To our knowledge, this is the first report in higher plants where a PM-ligand for an ECM-PRP is identified. The fact that p33/p36 accumulate in response to water

deficit suggests that these proteins may participate to maintain a tight adhesion of the PM to the cell wall, as well as to trigger cell responses to osmotic stress.

## Experimental procedures

### *Plant Material*

Bean seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa were kindly provided by J. Acosta (INIFAP-Texcoco). Germination and water deficit treatments were as described by Covarrubias *et al.* (1995). Protoplasts and membrane preparations were obtained from well-irrigated 21-day-old bean plants grown under greenhouse conditions.

### *Protein purification*

Protein extracts were obtained from water stressed bean seedlings by acidic extraction according to Covarrubias *et al.* (1995). After acetone precipitation, proteins were resuspended in 100 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> pH 4.5. p33/p36 were enriched by a precipitation with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20-40% saturation) (after this purification step the major bands were p33, p36 and a 68 kDa protein); proteins in the pellet were resuspended in 100 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> pH 4.5 and dialyzed against the same solution. Further purification was attained by filtration chromatography using a FPLC system with a Superdex-200 column equilibrated in 100 mM NaCl, 100 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, pH 4.5. Fractions containing p33 and p36 were selected and dialyzed against 100 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> pH 4.5. After concentration, proteins were quantitated and their purity was assessed by SDS-PAGE. Even though different non-denaturing purification procedures were tested, p33 and p36 always copurify. The separation of p33 and p36 was only possible through preparative SDS-PAGE and subsequent electroelution. After recovery, proteins were extensively dialyzed against 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, lyophilized, resuspended in water and precipitated with acetone. SbPRP2 was purified according to the procedure described by Kleis-San Francisco and Tierney (1990).

### *Binding assay to glass and heparin matrixes*

Binding to glass was tested by incubating for 30 min at room temperature 5 mg of p33/p36 (or BSA fraction V), in 100 ml of a buffer containing 5 mM EDTA, 10 mM Na-phosphate (pH 7.7) and 8 M urea, with glass beads equilibrated in the same buffer (Yatogo, 1988). Once binding was allowed, then beads were washed three times with the same buffer. Bound proteins were subsequently eluted from the glass beads with the buffer described above but additionated with 200 mM, 500 mM and 700 mM NaCl. Fractions were collected after each elution and analyzed by SDS-PAGE. For the heparin matrix binding assay the same

procedure was followed except that Heparin-agarose (Sigma-Aldrich) was used (Yatogo, 1988). Human plasma fibronectin (Life Technologies, Inc.) was used as a positive control throughout these experiments.

### *Preparation of protoplasts*

Mesophyll bean cell protoplasts were isolated by enzymatic digestion of small segments of bean leaves cut with a razor blade, by incubation for 1 h with gentle shaking in digestion medium containing 1% cellulase Onozuka RS (Yakult Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), 0.1% pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), 0.1% BSA (Fraction V, Research Organics, Inc.) in 10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mM MES pH 5.5 and 450 mM mannitol. Before incubation, the leaf segments were floated on the digestion medium for 10 min under weak vacuum in order to infiltrate them with the enzymes. The resulting suspension was filtered through a 20 µm pore-width nylon mesh. Protoplasts, which passed through the mesh, were washed twice with wash buffer (WB) (15 mM KCl, 5 mM MES pH 5.5 and 450 mM mannitol), and collected by centrifugation at 100g for 3 min. Then, they were resuspended in WB and adjusted at a density of 3x10<sup>4</sup> protoplasts/ml. Fluorescence immunolocalization experiments were carried out with protoplasts derived from *P. vulgaris* cv Negro Jamapa suspension cell culture (León, *et al.*, 1991). In this case protoplasts were obtained from 50 ml of cell culture, after three days of subculture, following the same procedure described above, except that the vacuum-infiltration step was omitted.

### *Protoplast adhesion assay*

Adhesion assays of bean leaf protoplasts were performed according to Grinell *et al.* (1977) with some modifications. Terasaki plates wells were coated with 0.5 mg, 1.0 mg and 2.0 mg of 98% pure p33 and p36; or with 2 mg, 5 mg, 10 mg and 15 mg of BSA (fraction V, Research Organics, Inc.) as a control, and 10 ml (approx. 300 protoplasts) of a protoplast suspension obtained as described above, were added to each well. Then, the plates were incubated for 1 h at 37°C. The suspension was gently shaken for 30 min, and then the protoplasts were allowed to settle for 30 min. Wells were washed 3 times and attached protoplasts were quantified by counting them using an inverted microscope with a 10X objective.

Adhesion inhibition experiments were carried out by adding different polyclonal antibodies to the Terasaki plates wells previously coated with 2 mg of p33/36. Three dilutions (1:500, 1:5,000 and 1:20,000) of anti-p33 antibodies were used to compete the binding of protoplasts to p33/36. When rabbit IgG's were used as a competitors, a 1:5 dilution was assayed. In those competition experiments where peptides were used, protoplasts were

incubated for 1 h at room temperature with 200 mg/ml of either two hexapeptides, GRGDSP or GRADSP (purified by HPLC to  $\geq 98\%$ , Life Technologies, Inc.).

Proteolytic treatments were carried out as described by Akashi and Shibaoka (1991) with some modifications. Protoplasts were incubated for 5 min at 26°C in protoplast WB supplemented with 1 to 10 ng/ml trypsin. Proteolytic reactions were inhibited with 1mM PMSF.

#### *Immunofluorescence.*

Protoplasts were incubated in suspension medium for 1h, in the absence or presence of the p33 and p36. They were fixed for 30 min. with 4% paraformaldehyde/0.2% glutaraldehyde solution prepared in protoplast suspension medium, and then incubated overnight at 4°C with the anti-p33 antibody diluted 1:50 in blocking buffer (1X PBS pH 7.5 with 5% non-fat dry milk). After three 30-min washes with 1X PBS, protoplasts were stained with goat anti-rabbit IgG antibodies coupled to Alexa-594 fluorophore (Molecular Probes Inc.) diluted 1:2,000 in blocking buffer for 5 h. Stained protoplasts were washed with 1X PBS and then examined under a confocal microscope. For control experiments, either p33 and 36 were omitted or preimmune serum was added.

#### *Bean plasma membrane purification.*

Leaves of 25 days after germination bean plants grown under green house conditions were used for PM purification. A microsomal fraction was obtained by differential centrifugation and PM and tonoplast enriched-fractions were purified according to Vera-Estrella *et al.* (1999). Purity of these fractions was verified by immuno-blotting using antibodies raised against the *Arabidopsis* PM H<sup>+</sup>-ATPase (Campos *et al.*, 1990), and antibodies against the tonoplast MIP-F protein from *Mesembryanthemum crystallinum* (Yamada *et al.*, 1995).

#### *Assays of enzymatic activities.*

Hydrolytic activity of the tonoplast V-ATPase and plasma-membrane P-ATPase were measured by the release of Pi according to the method described by Vera-Estrella *et al.* (1994), using isolated tonoplast and plasma-membrane vesicles (10 mg protein from each fraction). Values are presented as mmol Pi released (mg membrane protein)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. PM P-ATPase activity was inhibited including 100 mM vanadate in the reaction mixture, meanwhile 50 mM nitrate was used as an inhibitor of tonoplast V-ATPase.

### *Biotin labeling of p33/36 proteins*

Labeling was carried out by adding 15-fold molar excess of the activated ester D-Biotin-N-hydroxysuccinimide (Biotin-NHS, Boehringer Mannheim Biochemica) to the proteins dissolved in PBS pH 8.5. The reaction mixture was stirred 2 h at room temperature and dialyzed against 100 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> pH 4.5. Biotinylated proteins were kept at -20°C until use.

### *Binding of p33 and p36 proteins to bean PM vesicles.*

Binding assays were carried out as described by Bosch, *et al.* (1994). PM proteins (20 mg) were incubated for 1 h at 25°C with 100 ng of biotinylated protein, in a final volume of 100 ml of binding buffer (PBS 1X pH 7.6, 0.1% BSA and 0.1% Tween-20) with or without 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM EGTA or EDTA. Following incubation, the mixture was centrifuged for 10 min. at 14,000g, the supernatant was discarded and the pellet washed 3 times with the same buffer. The pellet was resuspended in Laemmli buffer and the proteins were resolved by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The presence of the labeled proteins was detected by a chemiluminescence assay (ECL; Amersham) using streptavidin-HRP.

### *Blot overlay-binding assay.*

Detection of protein-protein interactions was performed following the procedure described by Reymond *et al.* (1996). PM proteins were separated in a 12% SDS-PAGE. A renaturation step was included where the gel was washed twice for 1 h in renaturation buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 20 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 4 M urea) before transferring onto nitrocellulose membranes. The blot was incubated overnight at 4°C with gentle shaking in binding buffer (BB) (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 5% non-fat dry milk, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) containing 5.0 nM of the labeled ligand. After four 30-min washes in BB, the blot was incubated for 1 h in the same buffer (without non-fat dry milk) containing acidic-HRP conjugate (1:1,000), followed by five 5-min washes in BB and five 5-min washes in BB without non-fat dry milk. Bound ligand was detected by chemiluminescence. To assess the effect of Ca<sup>2+</sup> ions on the protein-protein interactions determined by this assay, the binding conditions were modified by removing the sources of Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub> and non-fat dry milk) from BB. Binding was carried out by incubating the nitrocellulose membrane with the labeled ligand in 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.0 containing CaCl<sub>2</sub> (100 or 300 mM) with or without EDTA. The rest of the procedure was followed as described above.

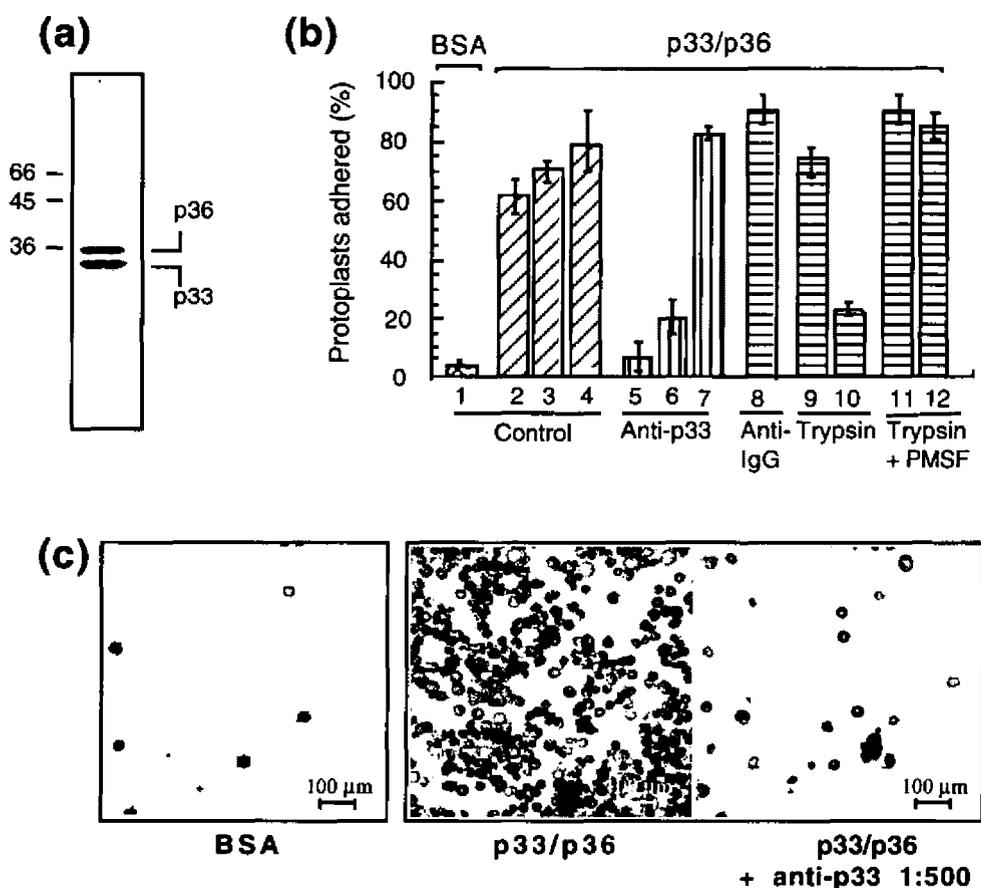
### *Partial amino acid sequence determination*

For sequence analysis, p33 and p36 purified as described above were separated by 12% SDS-PAGE, from which the corresponding bands were cut out. The partial amino acid sequences of internal peptides from these proteins were obtained by the Harvard Microchemistry Unit, the amino-terminal sequences from electroeluted p33 and p36 were obtained by the Protein Sequencing Unit of the Instituto de Biotecnología-UNAM.

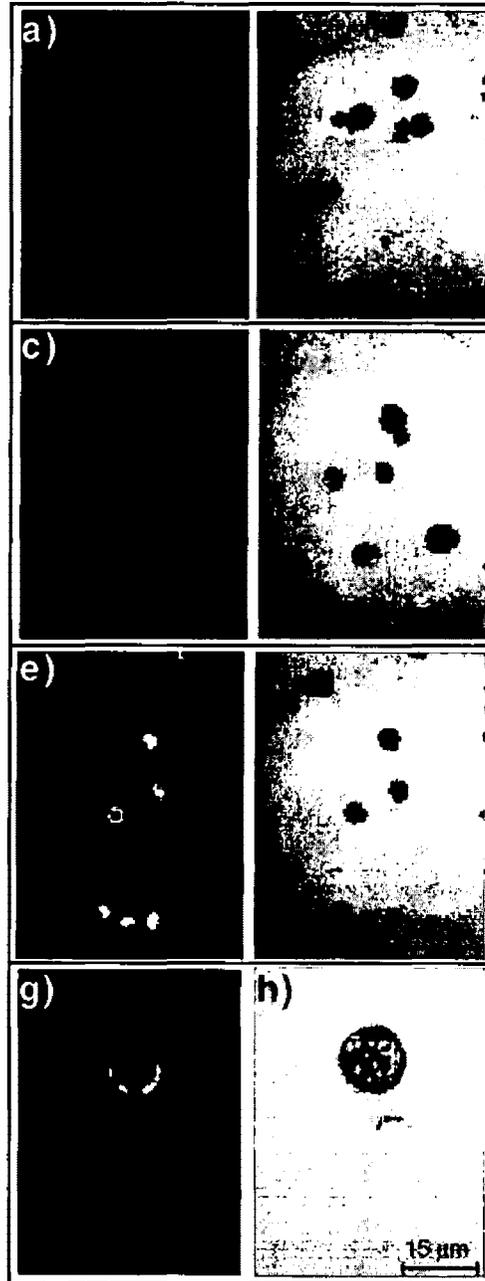
### **Acknowledgments**

We thank B. Pickard and Y. Rosenstein for critical reading of the manuscript and stimulating discussions and R. Quatrano for helpful suggestions. We are also grateful with E. García-Ramírez and X. Alvarado for technical support, E. Mata for animal care during the antibody production, F. Zamudio for providing the bp18 synthetic peptide and for the p33 and p36 amino-terminal sequences. Specially, we acknowledge R. Vera-Estrella for advice and support in the determination of ATPase activities. We also thank M. Tierney, R. Serrano and B. Barkla for generously providing antibodies against SbPRP2, *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-ATPase and *M. crystallinum* MIP-F, respectively. This work was partially funded by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) 0131P-N9506 and 26242-N and from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN204496.

## FIGURES



**Figure 1.** Protoplast adhesion assays using p33 and p36 proteins. **(a)** The purified p33/p36 preparation used for these assays is shown after separation in SDS-PAGE and staining with Coomassie Blue. Molecular mass markers are shown at the left of the figure: BSA: 66kDa, egg albumin: 45 kDa and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle: 36 kDa. **(b)** Protoplasts (300) were suspended in 10 ml of protoplast WB and loaded onto Terasaky wells previously covered with: 10 mg of BSA (column 1); 0.5 mg, 1 mg and 2 mg of pure p33/36 (columns 2, 3 and 4, respectively). Competition experiments with different dilutions of anti-p33 antibody were carried out using 2 mg of p33/p36: 1:500 (column 5), 1:5,000 (column 6) and 1:20,000 (column 7); also a 1:5 dilution of rabbit IgG (column 8) was included. After 2 h of incubation, protoplasts were washed and counted. For proteolytic treatments, protoplasts were incubated in the presence of 1 ng/ml (column 9) and 3 ng/ml (column 10) of trypsin. Inhibition of the proteolytic activity was performed by addition of 1 mM PMSF to both trypsin treatments (columns 11 and 12, respectively). After treatments, protoplasts were recovered by centrifugation, suspended in protoplast WB and loaded onto Terasaky wells previously covered with 2 mg of pure p33/36. The data in this figure are the result of, at least, 3 independent experiments. **(c)** Micrographs (10x) showing an example of the results described above: protoplasts remained adhered when p33/p36 (2 mg) were immobilized to the bottom of the plate; in contrast, none or few protoplasts were detected when either BSA was used instead of p33/p36 or when the adhesion was competed with anti-p33 antibody (1: 500).

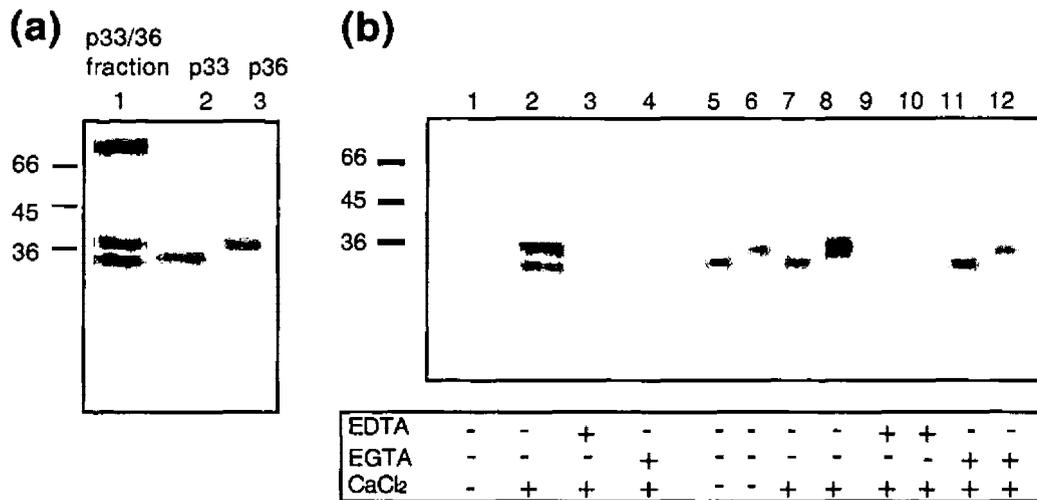


**Figure 2.** Representative immunofluorescence photomicrographs illustrating the p33/p36 proteins adhered to the bean protoplasts surface. Immunofluorescence was detected in protoplasts incubated with 1 mg of pure p33/p36 and anti-p33 antibody followed by Alexa-594-conjugated anti-rabbit immunoglobulin and visualized by confocal laser scanning microscopy (e and g). When the p33/p36 were added but a pre-immune serum was used instead anti-p33, no fluorescence was detected (a). The same result was obtained when anti-p33 was used but no p33/p36 were added (c). Panels b, d, f and h show the corresponding bright field images.

**Table 1.** ATPase activities of different membrane fractions

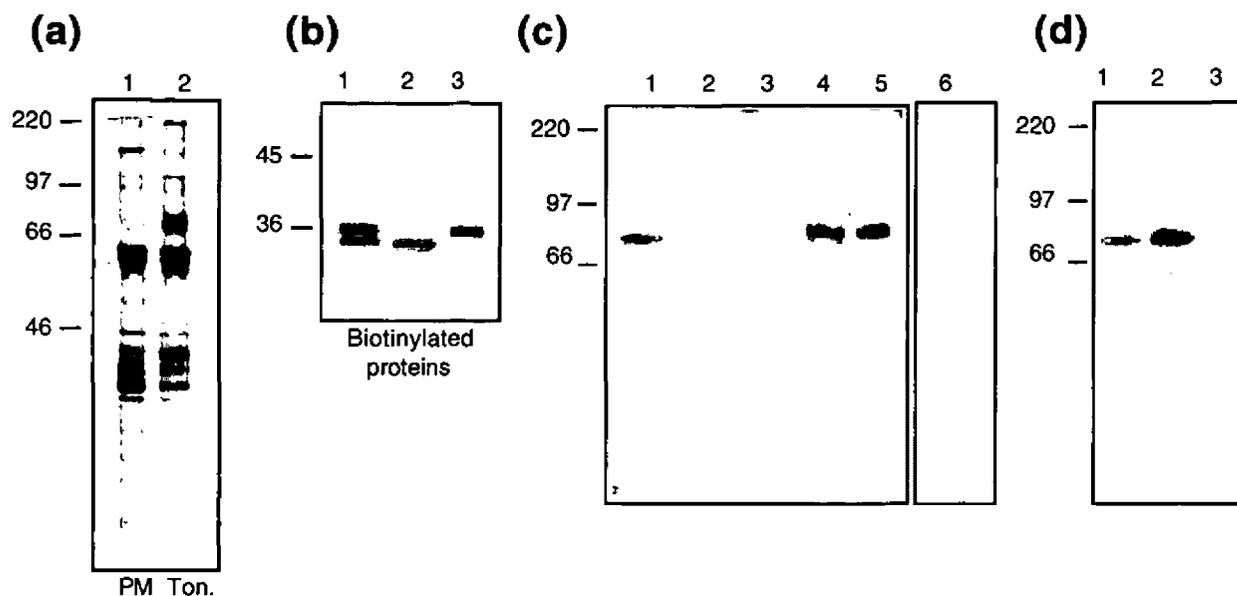
Membrane fractions	ATPase Activities		
	Total	Residual (a)	Residual (b)
	(μmoles Pi hr <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )		
Plasma Membrane	18.64 ± 0.367	3.35 ± 0.278	17.89 ± 0.200
Tonoplast	13.28 ± 0.224	13.37 ± 0.225	2.76 ± 0.750

(a) Inhibition of the initial ATPase activity by 100 μM vanadate. (b) Inhibition of the initial ATPase activity by 50 mM nitrate.

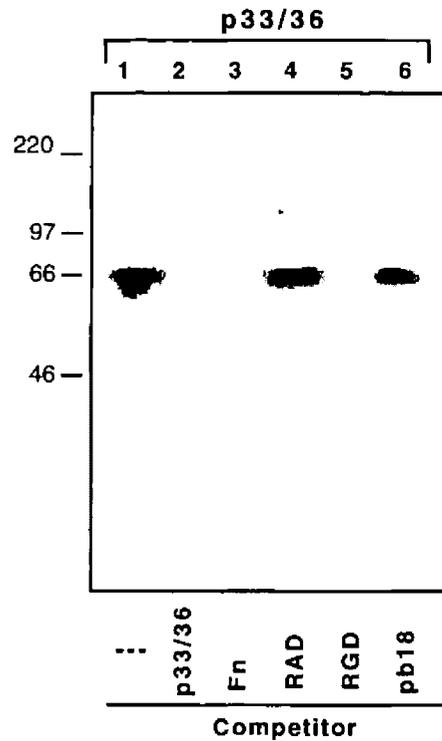


**Figure 3.** Binding of p33 and p36 to plasma membrane vesicles. **(a)** Biotinylated p33 and p36 used in these experiments: lane 1, biotinylated p33/p36 enriched fraction. This fraction, obtained after ammonium sulfate precipitation, contains a contaminant 68 kDa protein in addition to p33 and p36. Lanes 2 and 3, biotinylated p33 and p36, respectively, purified by electroelution.

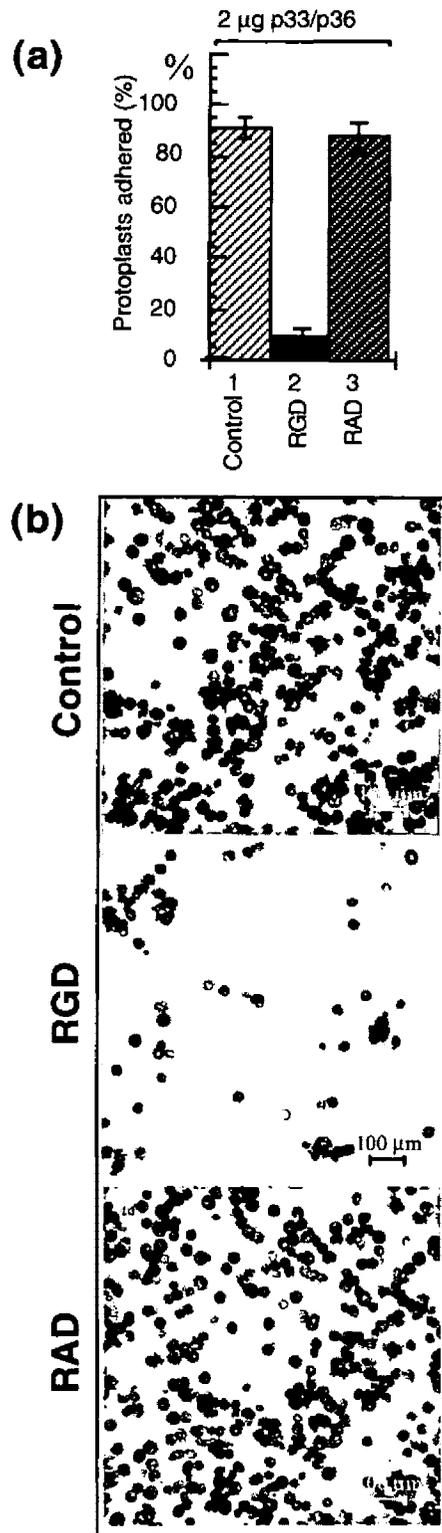
**(b)** Binding of p33 and p36 to PM vesicles. In these experiments, biotin-labeled p33/36 (lanes 1 - 4), p33 (lanes 5, 7, 9 and 11) and p36 (lanes 6, 8, 10 and 12) were incubated with PM vesicles under different conditions (see below), washed by centrifugation and the final pellet was analyzed by SDS-PAGE after transfer to nitrocellulose. Biotinylated proteins that remained bound were detected by chemiluminescence (see Experimental procedures for details). Lanes 1, 5 and 6 show the results of the incubation with no additions, lanes 2, 7 and 8 when CaCl<sub>2</sub> (1 mM) was included, lanes 3, 9 and 10 show the results when, in addition to CaCl<sub>2</sub>, EDTA (25 mM) was present and lanes 4, 11 and 12 when EGTA (25 mM) was used as chelator. These experiments were reproduced at least 5 times. The molecular mass markers (M) are as in Figure 1.



**Figure 4.** Identification of the plasma membrane protein that binds p33 and p36. **(a)** Quality of the PM fraction. Total proteins from PM (MP) and tonoplast (Ton) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue (1 and 2, respectively). **(b)** A sample of the biotinylated p33/36 (lane 1), p33 (lane 2), and p36 (lane 3) used in these experiments after separation in SDS-PAGE. **(c)** Blot overlay-binding assay using the biotinylated proteins. PM and tonoplast proteins were separated in SDS-PAGE and, after a renaturation step, they were transferred onto nitrocellulose membranes and incubated with biotinylated p33/36 (see Experimental procedures for details). Lanes 1, 4 and 5: PM proteins incubated with biotinylated p33/36, p33 and p36 respectively; lane 2: PM proteins incubated with biotinylated p33/36 and competed with non-labeled p33/p36 (1 mg); lane 3: as in lane 2 but competed with anti-p33 antibody (1:50); lane 6: tonoplast proteins incubated with biotinylated p33/36. **(d)** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  in the overlay-binding assay. This assay was performed as described for (c) except that non-fat dry milk was not included in the BB to eliminate  $\text{Ca}^{2+}$  sources (see Experimental procedures for details). Lanes 1 and 2: PM proteins incubated with biotinylated p33/36 in the presence of 100 mM and 300 mM  $\text{CaCl}_2$ , respectively; lane 3: PM proteins incubated with biotinylated p33/36 in the presence of 100 mM  $\text{CaCl}_2$  plus 250 mM EGTA. These experiments were reproduced at least 3 times. The molecular mass markers (M) correspond to myosin (220 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66 kDa) and egg albumin (46kDa).

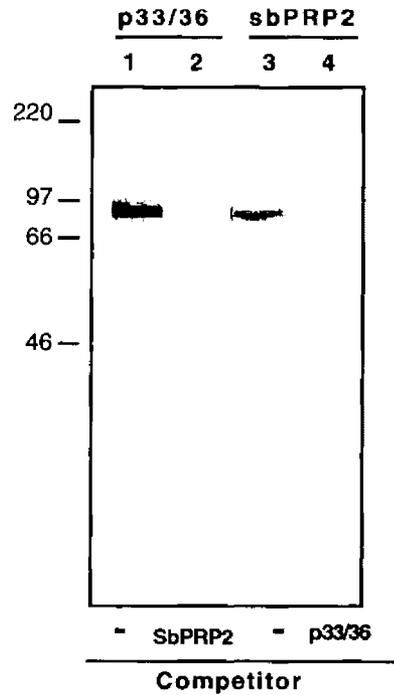


**Figure 5.** An RGD-containing peptide and fibronectin inhibit the binding of p33/p36 to the plasma membrane protein. The competition experiments were carried out as indicated in Figure 4. In all cases 0.3 mg of biotinylated p33/p36 were used, and binding was competed with either 1 mg of unlabeled p33/36 (lane 2), 15 mg of unlabeled fibronectin (lane 3), 200 mg/ml of the unlabeled RAD-peptide (lane 4), 200 mg/ml of the unlabeled RGD-peptide (lane 5) or a non-related peptide: CKAKAEERKRRKMSRGLC (bp18). These experiments were reproduced at least 3 times. The molecular mass markers are as described in Figure 4.



**Figure 6.** Inhibition of p33/ p36 adhesion to bean protoplasts mediated by RGD- and RAD-containing peptides. (a) Before loading the wells covered with 2 mg of p33/36, protoplasts were incubated with either 200 mg/ml of the RGD- peptide (column 2) or 200 mg/ml of the

RAD-peptide (column 3). Column 1 shows the percentage of protoplasts adhered when no peptides were included. (b) Micrographs (10x) showing representative images of the results described above. Protoplasts were photographed directly in Terasaky plates wells with an inverted microscope using the 10X objective.



**Figure 7.** SbPRP2 competes the interaction of p33/p36 with the 80 kDa plasma membrane protein. A blot overlay-binding assay was carried out as in Figure 5. In this case, the binding of 0.4 mg of biotinylated p33/p36 (lane 1) or 1.5 mg SbPRP2 (lane 3) was competed with 1 mg of unlabeled PRP2 (lane 2) or 1 mg of unlabeled p33/36 (lane 4), respectively. The molecular mass markers are as described in Figure 5.

## REFERENCES

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York & London: Garland Publishing, Inc., pp. 978-995.
- Ayad, S., Boot-Handford, R.P., Humphries, M.J., Kadler, K.E. and Shuttleworth, C.A. (1994). In *The extracellular matrix. Facts Book Series*. London: Academic Press, pp. 104-151.
- Bosch, D., Schipper, B., van der Kleij, H., de Maagd, R.A. and Stiekema, J. (1994). Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: Possibilities for resistance management. *Bio/Technology* 12: 915-918.
- Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2: 48-54.
- Campos F., Pérez-Castineira J.R., Villalba J.M., Culiáñez-Marcia F.A., Sánchez F. and Serrano R. (1996). Localization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 32: 1043-1053.
- Canut, H., Carrasco, A., Galaud, J.-P., Cassan, C., Bouyssou, H., Vita, N., Ferrara, P. and Pont-Lezica, R. (1998). High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall. *Plant J.* 16: 63-71.
- Cassab, G.I. (1998). Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:281-309.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A.A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol. Biol.* 35: 393-405.
- Covarrubias, A.A., Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernández, M. and Garcarrubio, A. (1995). Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 107: 1119-1128.
- Creelman, R.A. and Mullet, J. (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new b-tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol. Biol.* 17: 591-608.
- Deutch, C.E. and Winicov, I. (1995). Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Mol. Biol.* 27: 411-418.
- Faik, A., Labouré, A., Gulino, D., Mandaron, P. and Falconet, D. (1998). A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *Eur. J. Biochem.* 253: 552-559.
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J. and Pires, E. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.* 274: 28724-28729.
- Gens, J.S., Reuzeau, C., Doodlittle, K.W., McNally, J.G. and Pickard, B.G. (1996). Covisualization by computational optical-sectioning microscopy of integrin and associated proteins at the cell membrane of living onion protoplasts. *Protoplasma* 194: 215-230.
- Greenspoon, N., HersHKoviz, R., Alon, R., Varon, D., Shenkman, B., Marx, G., Federman, S., Kapustina, G. and Lider, O. (1993). Structural analysis of integrin recognition and the inhibition of integrin-mediated cell functions by novel nonpeptidic surrogates of the Arg-Gly-Asp sequence. *Biochemistry* 32, 1001-1008.

- Grinnell, F., Hays, D.G. and Minter, D.** (1977). Cell adhesion and spreading factor. *Exp. Cell. Res.* **110**: 175-190.
- Hong, J.C., Nagao, R.T. and Key, J.L.** (1990). Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. *J. Biol. Chem.* **265**: 2470-2475.
- Hynes, R.O.** (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Iraki, N.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Carpita, N.C.** (1989). Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol.* **91**: 39-47.
- Käpylä, J., Ivaska, J., Riikonen, R., Nykvist, P., Pentikäinen, O., Johnson, M. and Heino, J.** (2000). Integrin  $\alpha$ 2I domain recognizes type I and type IV collagens by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**: 3348-3354.
- Katembe, W.J., Swatzell, L.J., Makaroff, C.A. and Kiss, J.Z.** (1997). Immunolocalization of integrin-like proteins in *Arabidopsis* and *Chara*. *Physiol. Plant.* **99**: 7-14.
- Kleis-San Francisco, S.M. and Tierney, M.L.** (1990). Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. *Plant Physiol.* **94**: 1897-1902.
- León, P., Planckaert, F. and Walbot, V.** (1991). Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. *Plant Physiol.* **95**: 968-972.
- Lynch, T.M., Lintilhac, P.M. and Domozych, D.** (1998). Mechanotransduction molecules in the plant gravisensory response: amyloplast/statolith membranes contain b1 integrin-like protein. *Protoplasma* **201**: 92-100.
- McCann, M.C. and Robert, K.** (1991). Architecture of the primary cell wall. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. (Lloyd, C.W., ed) New York: Academic Press, pp. 109-130.
- Millar, D. J., Slabas, A. R., Sidebottom, C., Smith, C. G., Allen, A. and Bolwell, P.** (1992). A major stress-inducible Mr-42000 wall glycoprotein of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* **187**: 176-184.
- Oparka, K.J.** (1994). Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytol.* **126**: 571-591.
- O'Sullivan, J.M., Jenkinson, H. and Cannon R.** (2000). Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology.* **146**: 41-48.
- Quatrano, R.S. and Shaw, S.L.** (1997). Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends Plant Sci.* **2**: 15-21.
- Reuzeau, C., Doolittle, K.W., McNally, J.G. and Pickard, B.G.** (1997). Covisualization in living onion cells of putative integrin, putative spectrin, actin, putative intermediate filaments, and other proteins at the cell membrane and in an endomembrane sheath. *Protoplasma* **199**: 173-197.
- Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm, R. and Eckerskorn, C.** (1996). Cloning of a cDNA encoding a PM-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* **8**: 2265-2276.

- Roberts, A.W. and Heigler, C.H.** (1989). Rise in chlorotetracycline fluorescence accompanies tracheary element differentiation in suspension cultures of *Zinnia*. *Protoplasma* **152**: 37-45.
- Ryu, J.-H., Mizuno, K., Takagi, S. and Nagai, R.** (1997). Extracellular components implicated in the stationary organization of the actin cytoskeleton in mesophyll cells of *Vallisneria*. *Plant Cell Physiol.* **38**: 420-432.
- Sanders, L.C., Wang, C.-S., Walling, L.L. and Lord, E.** (1991). A homolog of the substrate adhesion molecule vitronectin occurs in four species of flowering plants. *Plant Cell* **3**: 629-635.
- Shindler, M.** (1989). RGD-dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane: consequence for growth. *J. Cell Biol.* **108**: 1955-1965
- Showalter, A.M., Butt, A.D. and Kim, S.** (1992). Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol Biol.* **19**: 205-215.
- Vera-Estrella R., Barkla B.J., Higgins V.J. and Blumwald E.** (1994). Plant defense response to fungal pathogens: activation of host-plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* **104**: 209-215.
- Vera-Estrella R., Barkla B.J., Bohnert, H. and Pantoja, O.** (1999). Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta* **207**: 426-435.
- Wakabayashi, K., Honson, T. and Kamisaka, S.** (1997). Changes in amounts and molecular mass distribution of cell-wall polysaccharides of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles under water stress. *J. Plant Physiol.* **151**: 33-40.
- Wang, J.-L., Walling, L.L., Jauh, G.Y., Gu, Y.-Q. and Lord, E.M.** (1996). Lily cofactor-independent phosphoglycerate mutase: purification, partial sequencing, and immunolocalization. *Planta* **200**: 343-352.
- Williamson, M.P.** (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**: 249-260.
- Wilson, R.C., Long, F., Maruoka, E.M. and Cooper, J.B.** (1994). A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell* **6**: 1265-1275.
- Wu, Y., Sharp, R.E., Durachko, D.M. and Cosgrove, D.J.** (1996). Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* **111**: 765-772.
- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W.B., Michalowski, C.B. and Bohnert H.J.** (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* **7**, 1129-1142.
- Yatogo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H. and Hayashi, M.** (1988). Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. Funct.* **13**: 281-292.
- Zhu, J.K., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** (1994). A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1a. *Plant Cell* **6**: 393-404.

## **IV.1. MATERIAL Y METODOS**

**(No reportados en el artículo)**

### **Relacion inmunológica de p33/p36 con fibronectina y vitronectina.**

Las muestras de proteína enriquecida en p33/p36 se separaron electroforéticamente en un gel discontinuo de poliacrilamida-SDS a una concentración de 12%, preparado de acuerdo con Laemli (1970). El gel se equilibró con solución de transferencia (ácido 3-cicloeximilamino-4hidroxi-1-propanosulfónico (CAPSO) 100 mM) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por 2 horas a 300 mA de corriente constante o toda la noche a 200 mA.

La detección se llevó a cabo mediante ensayos tipo Western bloqueando la membrana con solución de bloqueo (5% de leche descremada en PBS 1x) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-vitronectina humana (dilución 1:1,000) ó anti-fibronectina (1:20,000) según el caso. Como anticuerpo secundario se usaron anti-inmunoglobulinas de conejo acopladas a fosfatasa alcalina (1:10,000), y se detectó por el desarrollo de color usando los sustratos adecuados (NBT y BCIP).

### **Anticuerpos que reconocen integrinas y secuencias con el péptido RGD compiten por la unión de p33 y p36 a la membrana plasmática.**

Estos experimentos de unión de protoplastos a proteína p33/p36 inmovilizada en placas tipo Terasaki, se realizaron del mismo modo que los experimentos reportados por García -Gómez *et al.* (ver artículo). Previo a la unión con p33/p36, los protoplastos se incubaron por 1 hr. con dos anticuerpos que reconocen integrinas: el anticuerpo policlonal anti - $\alpha$ P2 (Talamás-Rohana *et al.*, 1994) (diluciones 1:500 y 1:2,000) y el anticuerpo monoclonal que reconoce a la subunidad  $\alpha$ V (GIBCO BRL) (diluciones 1:500 y 1:10,000). En el mismo experimento, también se usaron los pentapéptidos que contienen la secuencia interna RGD y RAD en una concentración de 200  $\mu$ g/ml (resultado reportado en el artículo).

Como control, los protoplastos se incubaron con los mismos anticuerpos (dilución 1:5) y péptidos ( 200  $\mu$ g/ml) y se adhirieron a placas previamente tratadas con 0.01% de poli-L-Lisina.

### **Pureza de las fracciones membranales usadas.**

Proteínas provenientes de la fracción de membrana plasmática y de tonoplasto (30  $\mu\text{g}$ ) de células de hojas de frijol, se separaron electroforéticamente por duplicado en geles de 12% acrilamida SDS/PAGE. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y una vez bloqueadas (5% de leche en PBS), cada una de ellas se incubó con anticuerpos que reconocen a la ATP-H<sup>+</sup> de membrana plasmática de *Arabidopsis* (Campos *et al.*, 1990) y con anticuerpos dirigidos contra una proteína intrínseca de tonoplasto de 35 kD (MIP-F) de *Mesembryanthemum crystallinum* (Yamada *et al.*, 1995), en una dilución 1:500, en ambos casos. Como segundo anticuerpo se usó anti-inmunoglobulinas de conejo acopladas a peroxidasa y se detectó con el sistema de luminiscencia ECL de Amersham.

### **Inmunodetección de p33 y p36 con anticuerpos anti-PRP2 de soya.**

Extractos de proteínas ácidas provenientes de plántulas de frijol sometidas a estrés hídrico se separaron electroforéticamente y se transfirieron a nitrocelulosa. Con dicha membrana se procedió a realizar un ensayo tipo Western utilizando anticuerpos dirigidos contra la PRP2 de soya. Como segundo anticuerpo se usó anticuerpos anti-inmunoglobulinas de conejo acoplados a fosfatasa alcalina y se detectó con los sustratos correspondientes.

### **Competencia del péptido con la secuencia PPVYKPPVEK por la unión de p33/36 con pmp80.**

Se utilizó el sistema de unión en membrana (Far Western ó Blot overlay binding assay) del mismo modo como se ha descrito en los experimentos anteriores (García-Gomez, *et al.*, 1999) pero la membrana de nitrocelulosa una vez bloqueada, se incubó durante toda la noche, con 200 y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido sintético que contiene la secuencia PPVYKPPVEK, posteriormente se incubó con 300 ng de p33/p36 marcadas con biotina durante 6 hrs. Después de los lavados previamente descritos, se incubó 1 hr. con estreptoavidina acoplada a peroxidasa y se detectó la emisión de fluorescencia usando el sistema ECL-Plus de Amersham.

**Inmunodetección de proteínas de plantas que son reconocidas por anticuerpos anti-integrinas.**

Vesículas de membrana plasmática de células de hojas de frijol (30  $\mu\text{g}$ ) se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida/SDS-PAGE al 12% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Con dicha membrana se procedió a realizar un ensayo tipo Western utilizando anticuerpos dirigidos contra diferentes subunidades de integrinas. Se uso el anticuerpo policlona  $\alpha$ -P2 y monoclonal  $\alpha$ V previamente descritos, así como anticuerpos monoclonales que reconocen la subunidad  $\beta$ 1 de integrinas. Como segundo anticuerpo se usaron anticuerpos anti-inmunoglobulinas de conejo y ratón respectivamente acoplados a peroxidasa y se detectó la emisión de fluorescencia usando el sistema ECL-Plus de Amersham.

## IV.2. RESULTADOS

### p33 y p36 NO SE UNEN A SUSTRATOS DE HEPARINA NI VIDRIO

Si bien, p33 y p36 no mostraron relación inmunológica con fibronectina y vitronectina humanas, se decidió evaluar si compartían propiedades como la capacidad de unirse a sustratos como el vidrio y la heparina .

La capacidad de las proteínas p33 y p36 de unirse a heparina y a vidrio se ensayó en tubo eppendorf, así como por columnas, siguiendo las mismas condiciones que se utilizan para la purificación de vitronectina (García-Gomez, *et al.*, 2000), esto es, utilizando 8 M urea, para evitar la agregación de la proteína y activar la unión a heparina y/o a vidrio. Se analizó y comparó la cantidad aproximada de proteína no pegada, tanto la que salió en el eluado como la que se despegó durante los lavados, así como la que permaneció unida y se despegó en presencia de diferentes concentraciones de buffer con sal. El despegado de la proteína se realizó en presencia de concentraciones crecientes de NaCl utilizando como control positivo y negativo fibronectina y albúmina, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que después de 3 lavados con el buffer, sólo una pequeña fracción de p33 y p36 permanece unida al sustrato (vidrio y heparina). Esta fracción que se retiene en los diferentes sustratos es posible despegarla con 200 mM de NaCl lo cual sugiere que su unión es débil (Tabla 1) ya que para despegar fibronectina se requieren 500 mM de NaCl.

PROTEINA	SUSTRATOS (% de unión)	
	VIDRIO	HEPARINA
p33/36	13%	6%
BSA	10%	19%
FIBRONECTINA	80%	43%

**Tabla 1.** Cuadro que muestra el porcentaje de unión de p33/36 a vidrio y heparina.

### ANTICUERPOS QUE RECONOCEN A VITRONECTINA Y FIBRONECTINA HUMANA NO RECONOCEN A LAS PROTEINAS p33 Y p36.

Como se menciona en el artículo anexo, ensayos tipo western mostraron que no existe ninguna relación inmunológica entre p33 y p36 y dos de las proteínas adhesivas más estudiadas en animales como son la vitronectina y fibronectina que además se sabe que se unen a receptores tipo integrinas. Experimentos paralelos a esta tesis (cuyos datos se incluyen) confirmaron lo anterior, al demostrar que las proteínas p33 y p36 están relacionadas a proteínas ricas en prolina de la pared celular.

### ANTICUERPOS QUE RECONOCEN INTEGRINAS Y SECUENCIAS CON EL PEPTIDO RGD COMPITEN LA UNION DE p33 Y p36 A LA MP

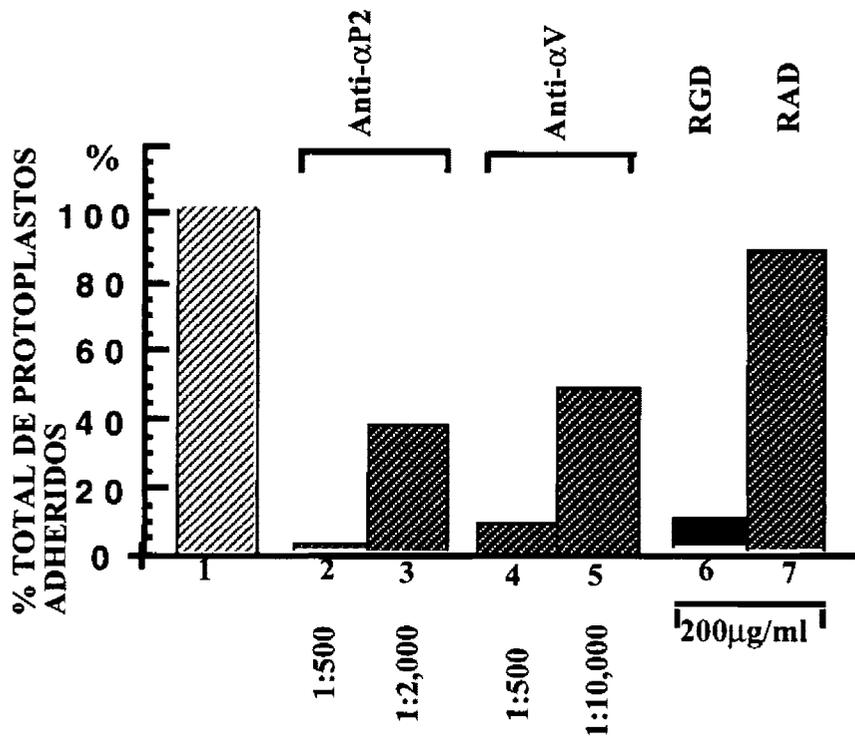
Como ya se mencionó con anterioridad, algunos de los receptores de membrana plasmática que reconocen a las proteínas de matriz extracelular animal pertenecen a la familia de las integrinas. Con base en la información anteriormente expuesta, se decidió usar dos anticuerpos que reconocen integrinas, (anti- $\alpha$ P2 y anti- $\alpha$ V) para estudiar la posible inhibición de la adhesión. Los anticuerpos policlonales anti- $\alpha$ P2 se generaron para reconocer a un hexapéptido sintético (generado a través de complementariedad hidropática) correspondiente al sitio concenso de unión a fibronectina y es capaz de reconocer a varias integrinas animales (Talamás *et al.*, 1994). El anticuerpo anti- $\alpha$ V, es un anticuerpo monoclonal comercial que reconoce a la subunidad  $\alpha$  de integrinas humanas.

En ambos casos la inhibición fué positiva, esto es, que se observó un menor número de protoplastos adheridos a p33/p36, después del tratamiento de los protoplastos con dichos anticuerpos (Fig.1, columnas 1-5).

La unión de proteínas de matriz extracelular a sus receptores (integrinas) se inhibe por la presencia de péptidos que contiene la secuencia Arginina-Glicina-Ac.aspártico (RGD), ya que tales receptores se unen a dicho epítipo presente en las proteínas de adhesión. En ensayos de adhesión como los anteriormente descritos, se probó que los protoplastos de frijol son capaces de unirse al péptido RGD (datos no mostrados), lo que habla de la existencia de elementos en la membrana plasmática de la célula vegetal que son capaces de reconocer a dicho epítipo .

Intentando dilucidar si una interacción similar es la responsable de la unión de las

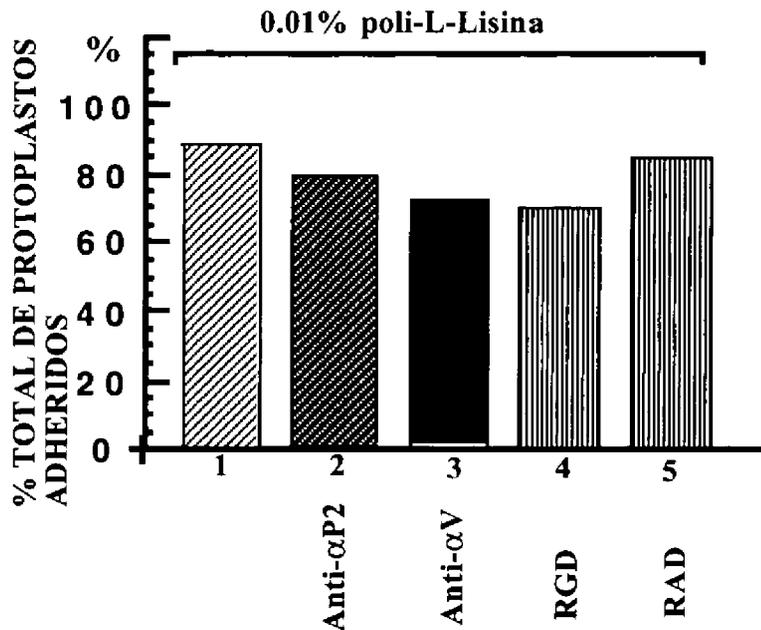
proteínas p33 y p36 a la membrana plasmática de los protoplastos, se intentó inhibir la adhesión usando dicho péptido y como control negativo un péptido modificado que resulta ser inactivo en el proceso de adhesión (RAD). Se observó que en presencia del péptido que contiene la secuencia RGD, disminuye el número de protoplastos adheridos y no así con el péptido RAD (Fig.1, columnas 6 y 7).



**Fig. 1.** Gráfica que muestra el porcentaje inhibición de la adhesión de protoplastos de frijol a las proteínas p33 y p36.

En todos los casos se probó la adhesión a 2  $\mu$ g de p33/36. En la columna 1 no se adició ningún competidor, mientras que en los demás tratamientos, los protoplastos se incubaron con los diferentes anticuerpos y/o péptidos indicados en la figura.

Para descartar que la inhibición de la adhesión de los protoplastos a p33/36 era un efecto inespecífico de los anticuerpos, las mismas concentraciones de anticuerpo se usaron para incubar protoplastos que se sometieron a unión a poli-L-lisina. La poli-L-lisina es un polication usado para adherir diferentes tipos celulares a placas de cultivo. En ninguno de los tratamientos con anticuerpos se observó un abatimiento significativo de la adhesión (Fig 2).

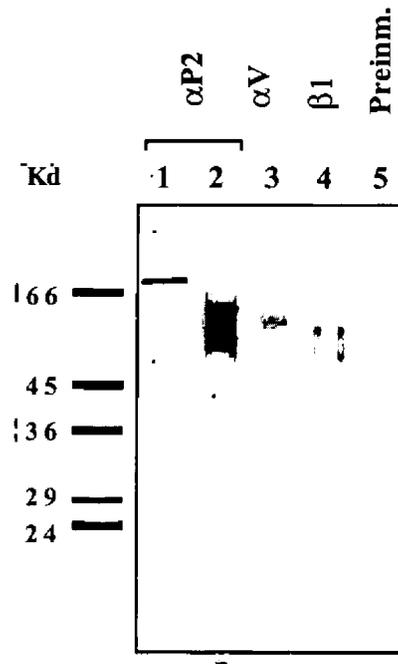


**Fig.2** Gráfica que muestra el porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos usados con protoplastos adheridos a poli-L-lisina 0.01%.

Columna 1: No se adicionó ningún inhibidor. Columnas 2 y 3: Anticuerpos en una dilución 1:5. Columnas 4 y 5: Péptidos usado a una concentración de 200  $\mu$ g/ml.

### INMUNODETECCION DE INTEGRINAS DE FRIJOL

Mediante ensayos tipo Western se probó la capacidad de algunos anticuerpos anti-integrina para reconocer a alguna(s) proteína(s) de la membrana plasmática de células de frijol, usando como control positivo, un carril con proteínas totales de células embrionarias de ratón. Para dicho efecto se usó el anticuerpo anti- $\alpha$ P2 que en trabajos previos se demostró que es capaz de reconocer integrinas de varias especies (Talamás, 1994); el monoclonal anti- $\alpha$ V y el lisado anti- $\beta$ 1. En todos los casos se observó que los anticuerpos reconocen a proteínas de membrana plasmática de frijol de entre 50 y 60 kilodaltones (Fig. 3)



**Fig.3** Inmunodetección de proteínas de membrana plasmática que son reconocidas por anticuerpos anti-integrinas.

Proteínas de embrión de ratón (carril 1), y de membrana plasmática de frijol (carriles 2-5), incubadas con diferentes anticuerpos que reconocen integrinas animales: anti- $\alpha$ P2 (carriles 1 y 2), anti subunidad  $\alpha$ V (carril 3), anti-subunidad  $\beta$ 1 (carril 4) y suero preinmune.

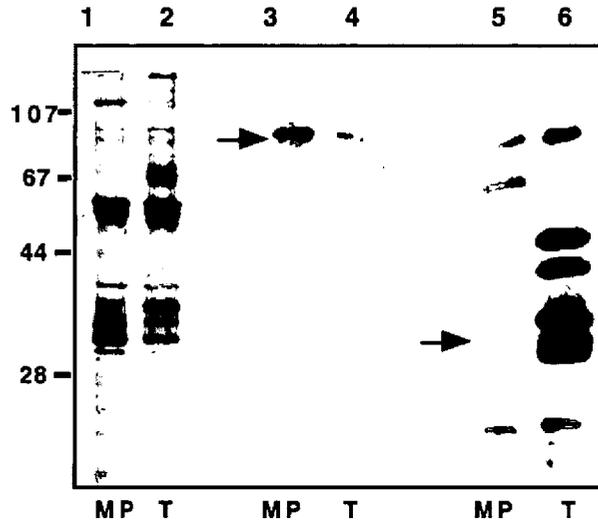
### PUREZA DE LAS FRACCIONES MEMBRANALES USADAS

Antes de iniciar los experimentos en que se utilizaron vesículas de membrana plasmática, quisimos estar seguros de la pureza de las fracciones membranales obtenidas después de la purificación, para lo cual realizamos dos tipos de ensayos, uno en que se midió de actividad de la ATPasa- $H^+$  de membrana plasmática y de tonoplasto (ver artículo) y otro de detección de dicha enzima así como de una proteína intrínseca de tonoplasto usando anticuerpos para cada una de estas proteínas, en ensayos tipo Western.

Para la inmunodetección, las proteínas de membrana plasmática y tonoplasto separadas electroforéticamente y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se usaron dos diferentes anticuerpos, unos que reconoce a la ATPasa- $H^+$  de membrana plasmática de *Arabidopsis* (Campos *et al.*, 1990) y otros dirigidos contra

una proteína intrínseca de tonoplasto de 35 kD (MIP-F) de *Mesembryanthemum crystallinum* (Yamada *et al.*, 1995).

En ambos casos se pudo corroborar el enriquecimiento de cada una de las fracciones analizadas.



**Fig.4** Determinación de la pureza de las fracciones de membrana plasmática y tonoplasto. Proteínas de membrana plasmática (MP) (carril 1) y tonoplasto (T) (carril 2) teñidas con azul de coomassie. Detección de la ATPasa de MP (carriles 3 y 4) y de la MIP-F de tonoplasto (carriles 5 y 6).

#### IDENTIDAD DE LAS PROTEINAS p33 y p36.

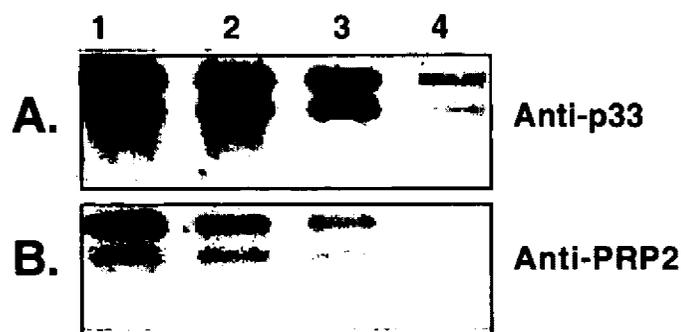
A partir de una fracción pura de p33 y p36 se cortaron bandas conteniendo 100 nanomolas de cada una de las proteínas previamente separadas en geles SDS/PAGE. Después de una degradación parcial con quimiotripsina, fué posible obtener y secuenciar, un péptido interno de p33 y dos de p36 (Harvard Microchemistry). La secuencia del extremo amino de cada una de ellas se obtuvo en la Unidad de Proteínas del Instituto de Biotecnología/ UNAM.

Tanto las secuencias internas, como las de los extremos amino, relacionan a p33 y a p36 con la PRP2 de soya (Hong *et al.*, 1990), así como con la PRP4 de alfalfa (Wilson *et al.*, 1994) y con una PRP de 42 kD the frijol (Millar *et al.*, 1992) (Fig. 5)

p33 and p36 internal aminoacid sequences			
Pvp33	KPOVEKPOVY	KPOVEKPOVY	
Pvp36 (1)	KPOVEKPOVY	KPOVEKPOVY	KPOVEKPOVY
Pvp36 (2)	KPOVEKPOVY	KPOVEKPOVY	
SbPRP2	KPOVEKPOVY	KPOVEKPOVY	KPOVEKPOVY
MtPRP4	KPOVEKPOVH	KPOVEKPOVH	KPOVEKPOVH
Cons.	KPOVxKPOVx	KOVxKPOVx	KPOVxKPOVx
p33 and p36 N-terminal aminoacid sequences			
	1	10	20
Pvp33	NYDVPOVEKP	OVYKPOVEKP	
Pvp36	NYDKPOVEKP	OVYKPOVEKP	
SbPRP2	NYEN		
MtPRP4	NYEK		
Pvp42	NYDK		

**Fig.5** Comparación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos internos y del extremo amino de p33 y p36 con proteínas tipo PRP's. Pv= *Phaseolus vulgaris*; Sb= *Glicine max*; Mt= *Medicago truncatolata*.

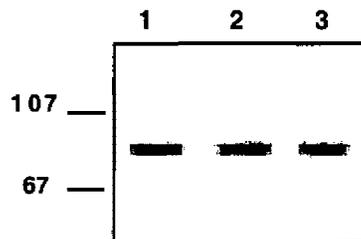
La relación de p33 y p36 con la SbPRP2, se corroboró mediante ensayos tipo Western en donde anticuerpos anti-PRP2 de soya son capaces de reconocer a p33 y a p36 (Fig. 6).



**Fig.6.** Relación inmunológica de p33/36 con la PRP2 de soya. Extractos enriquecidos en p33/36 (carriles 1-4) se hicieron reaccionar con anticuerpos anti-p33 (línea A) y anti-PRP2 (línea B). Carriles 1-4: Concentraciones decrecientes de proteína.

**LA SECUENCIA CONSERVADA EN LAS PROTEINAS p33 Y p36  
NO ESTA INVOLUCRADA EN LA UNION CON LA pmp80.**

Como se muestra en la fig. 7, La secuencia de aminoácidos POVYKPOVEK, es un decapeptido presente repetidamente a lo largo de algunas PRP's de plantas, así como en al menos un péptido interno de p33 y p36. Se sintetizó químicamente dicho pentapéptido (PPVYKPPVEK) y se evaluó su capacidad de inhibir la unión de p33 y p36 con la pmp80, en ensayos de unión tipo far western. Se pudo observar que el péptido PPVYKPPVEK no compite por la unión de p33 y p36 y la pmp80.



**Fig.7** Competencia del péptido que contiene la secuencia conservada de las PRP's por la unión de p33/36 a la pmp80. Proteínas de membrana plasmática (MP) se transfirieron a nitrocelulosa y una vez bloqueada la membrana se incubaron en presencia de 0, 200 y 500 mg/ml del péptido

***V. Discusión, Conclusiones y Perspectivas.***

## V.I. DISCUSION

Las PRP's se han descrito como proteínas involucradas en varios aspectos del desarrollo, en la interacción planta-microorganismo y en la respuesta de las plantas al ataque por patógenos (Cassab, 1998), sin embargo sus funciones precisas se desconocen. Se ha sugerido que las PRP's juegan un papel en el endurecimiento de la estructura de la pared o bien como barrera a la difusión de oxígeno, debido a su presumible insolubilización en la pared celular (Cassab, 1998). En este trabajo proponemos funciones alternativas para las PRP's, al demostrar que p33 y p36, dos glicoproteínas de la pared celular que se acumulan en respuesta al estrés hídrico en frijol, y que están relacionadas con PRP's, interaccionan con una proteína de MP de 80 kDa (pmp80). A continuación se hace un análisis crítico de la información que nos permite proponer algunos modelos del posible papel de p33 y p36 durante la sequía.

Como ya se mencionó en la introducción, existen datos que demuestran que procesos como el crecimiento celular y la síntesis de pared son dos de los primeros eventos que se ven afectados durante el déficit hídrico (Hsiao, 1973; Nonami y Boyer, 1990). Ambos procesos están íntimamente interconectados, sin embargo es difícil establecer si los cambios en el metabolismo de la pared celular son una causa o el resultado de la reducción en el crecimiento. Existen experimentos que demuestran que aún bajo condiciones de estrés hídrico ligero se sigue sintetizando pared celular y la turgencia de la mayoría de las células se mantiene constante, aún cuando la planta ha dejado ya de crecer (Nonami y Boyer, 1989). Por lo anterior, podemos considerar que la caída en la tasa de crecimiento, los cambios en el metabolismo de la pared celular y el mantenimiento de la turgencia son eventos independientes, por lo menos bajo condiciones de estrés hídrico ligero. La extrema sensibilidad de la tasa de crecimiento celular a disminuciones en el potencial hídrico, nos hace pensar en la existencia de finos sistemas de comunicación celular que involucren a moléculas capaces de relacionar al metabolismo general de la célula (incluyendo los cambios en la síntesis de pared), con el abatimiento en la expansión celular, resultado de una condición hiperosmótica.

Con la información con la que ahora contamos, respecto a la caracterización de algunas de las propiedades que relacionan a las proteínas p33 y p36 con la MP, podemos proponerlas como parte de este complejo de moléculas que permitirían una comunicación directa de la matriz extracelular con la célula, ya sea: a) desencadenando una cascada de señalización ó b) manteniendo unidos dichos compartimentos aún durante la disminución de la turgencia celular.

Otro dato muy importante para acercarnos al entendimiento del posible papel funcional de p33 y p36 durante la sequía, es su identidad. Recordemos que la secuencia parcial de las proteínas p33 y p36 las relacionan con proteínas ricas en prolina de plantas ó PRP's y que este grupo de proteínas han sido ampliamente estudiadas bajo ciertas condiciones de estrés, especialmente el daño mecánico y por elicitores de hongos. En ambos casos, se ha observado que las PRP's se insolubilizan en la ME, entrecruzandose covalentemente entre sí y con otros componentes de la misma, lo cual ocurre tambien en otras proteínas de la pared celular como las extensinas. Este entrecruzamiento químico se realiza entre residuos de tirosinas, catalizado por peroxidases de la pared celular y tiene la función de proporcionar protección y aumentar la rigidez de la pared durante las condiciones de estrés antes mencionadas (Morimoto, S., *et al.* 1999).

Salvo algunas clonas de PRP's que se inducen por sequía (Creelman *et al.*, 1991 y Colmenero-Flores *et al.* 1997), y por estés salino (Deutch *et al.*, 1995) se cuenta con poca información en lo que respecta a la respuesta específica de las PRP's al estrés hídrico. El hecho de que p33 y p36 se acumulen como respuesta al estrés hídrico en la fracción soluble de la pared, apoya que su función pudiera no ser exclusivamente estructural como históricamente se ha propuesto (Tierney *et al.*, 1988; Wyatt *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994). No obstante, no descartamos que parte de la proteína permanezca física y químicamente unida a la pared celular mediante uniones covalentes y que por lo tanto se traten de proteínas bifuncionales, es decir, que bajo ciertas condiciones de desarrollo parte de la proteína se encuentre retenida en las paredes, mientras que como respuesta a otras condiciones específicas como el estrés hídrico, se acumulen y permanezcan solubles para poder realizar otras funciones.

Aunque los datos son aún muy preliminares, sabemos que p33 y p36 se acumulan abundantemente en células del floema, aún no sabemos con exactitud si esta proteína permanece en las paredes de dichas células o la abundancia observada se debe a que p33/36 viajan a través de estos conductos. El segundo caso, apoyaría aún más la idea del papel funcional de su forma soluble, posiblemente como señalizadoras a distancia.

El modelo que hemos propuesto en que las proteínas de pared celular p33 y p36 se encuentran interaccionando directamente con la MP, se fundamenta en nuestros datos experimentales y en algunas evidencias que demuestran la estrecha relación que existe entre la ME, la MP y otros elementos citoplásmicos de la célula vegetal, tanto en condiciones normales de desarrollo, como durante el estrés osmótico. Se ha visto, por ejemplo, que en células en cultivo de *Zinnia*, durante ciertas etapas del desarrollo y diferenciación a traqueidas, existe una fuerte interacción de la membrana plasmática con la pared primaria y el

citoesqueleto en los sitios en donde se producirá un engrosamiento secundario (Roberts y Heigler, 1989). Existen otros datos que apoyan la idea de que la adecuada localización, diferenciación y morfogénesis celular vegetal, está determinada por mecanismos de comunicación célula-célula en donde se involucran elementos de la matriz extracelular junto con otros componentes celulares (Fowler y Quatrano, 1997; Satoh, 1998). Si bien estas interacciones se han observado durante el desarrollo normal de una planta, en situaciones de déficit hídrico cobran especial importancia, ya que en la interfase ME-MP suceden cambios subcelulares y ultraestructurales que tienen implicaciones en el funcionamiento general de la célula. Una manifestación clara de la relevancia de estas interacciones es el proceso de plasmólisis, el cual puede definirse como una separación total o parcial del protoplasto con respecto a la pared celular que lo rodea, como respuesta a una condición hiperosmótica (Oparka, 1994) en donde el tipo de plasmólisis puede ser un indicativo importante de las relaciones MP-pared celular. La literatura cuenta con múltiples ejemplos que ilustran dichas interacciones, como es el caso de los puntos de fuerte adhesión localizados entre la MP y la pared en células de cebolla sometidas a plasmólisis, así como en células de tabaco adaptadas a crecer en altas concentraciones de NaCl (Pont-Lezica, *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1993). Resultaría interesante poder probar de una manera más directa que bajo condiciones de estrés osmótico, p33/p36 se encuentran en interacción con la MP en ciertos sitios de la superficie celular, lo que validaría nuestra segunda hipótesis respecto a las funciones de p33 y p36 durante el déficit hídrico.

Las secuencias ricas en prolina presentes en algunas proteínas están ampliamente distribuidas tanto en procariontes como en eucariontes. Generalmente las prolinas se encuentran presentes como múltiples repeticiones a lo largo de las proteínas, y en algunos casos se les ha relacionado con sitios de interacción proteína-proteína (Williamson, 1994). Dada la identidad de p33 y p36, debe considerarse la posibilidad de que diferentes combinaciones de secuencias ricas en prolina puedan tener un papel importante en la unión de p33 y p36 a la pmp80.

A pesar de esta amplia distribución, las funciones específicas de las regiones ricas en prolinas no están del todo claras (Williamson, 1994). Se sabe que ciertos aminoácidos como serina, treonina, lisina, tirosina, hidroxiprolina y dopa, tienen un papel muy importante en las interacciones adhesivas de algunos organismos entre los que se encuentran los moluscos del género *Mytilus* (Filipula *et al.*, 1990), sin embargo el proceso es radicalmente diferente a lo observado con p33 y p36, ya que las proteínas del molusco no actúan a nivel celular, sino que se encargan de fijar al organismo completo a su sustrato (rocas) y no específicamente a otra proteína. Se han hecho estudios en que se ha podido determinar la secuencia de aminoácidos

involucrada en este proceso adhesivo y ésta no presenta similitud con lo encontrado en las PRP's de plantas. Así mismo, algunas proteínas salivales de mamíferos ricas en prolina (PRP1) median selectivamente la adhesión de *Candida albicans* y *Porphyromonas gingivalis* a cierto grupo de bacterias que forman parte de las superficies de las mucosas de las cavidades orales (O'Sullivan *et al.*, 1997; 2000). Experimentos usando péptidos inhibidores sugieren que el péptido mínimo requerido para la unión de *Porphyromonas gingivalis* a las PRP's de saliva contiene la secuencia PQGPPQ (Kataoka, *et al.*, 1997).

Por otro lado, así como las PRP's juegan un papel importante en la estructura y conformación de las paredes celulares de las células vegetales, en la ME animal existen proteínas estructurales como el colágeno que a lo largo de toda su estructura también contiene secuencias ricas en prolina. De modo similar a lo que estamos proponiendo que sucede con las PRP's de plantas y la pared celular, las fibras de colágeno se encuentran dando estabilidad a la ME animal y la comunican con el resto de la célula a través de la interacción con proteínas adhesivas que a su vez se unen a receptores membranales del tipo integrinas (Alberts, 1994). Adicionalmente se ha descrito que el colágeno tanto en su forma filamentosa como en la no-filamentosa también es capaz de unirse específicamente a receptores tipo integrinas, específicamente a la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , y esta unión es dependiente de cationes divalentes (Santoro y Zutter, 1995). El sitio de reconocimiento del colágeno por la integrina, es diferente a la secuencia RGD, y se encuentra distribuido a lo largo de toda la proteína (Käpylä *et al.*, 200). De hecho algunos autores han señalado que muchos de los procesos de adhesión celular son independientes de RGD y por lo tanto los sitios de unión en las proteínas no contienen esta secuencia (Engel *et al.*, 1994)

En plantas se sabe muy poco al respecto ya que hasta el momento no existe algún reporte en donde se demuestre directamente la interacción de las PRP's con otras proteínas, aunque algunos autores han sugerido su posible interacción con la MP (Millar, *et al.*, 1992). Lo anteriormente expuesto hace resaltar la importancia que tienen las secuencias ricas en prolina durante algunas interacciones proteína-proteína. Nuestros experimentos de inhibición demostraron que el péptido no-hidroxilado PPVYKPPVEK, no fué capaz de competir por la unión de p33 y p36 a la pmp80 kD. Es importante mencionar que en su forma nativa, la segunda prolina de cada decapeptido de las PRP's, se puede encontrar hidroxilada. Lo anterior es un factor importante, ya que Burzio *et al.* (1997) mencionan que por lo menos para la proteína rica en prolina de los organismos marinos, la presencia de hidroxilación en tirosinas así como los residuos glicosilo de las glicoproteínas pueden estar jugando un papel muy importante en el proceso adhesivo, lo cual podría explicar que el péptido usado no haya competido por la unión de p33/36 con pmp80.

En plantas, la búsqueda de moléculas de adhesión similares a las de animales ha sido infructuosa, tal es el caso de la proteína parecida a vitronectina que reporta Sanders *et al.* (1991) y que una vez clonada, resultó ser una fosfoglicerato mutasa (Wang *et al.*, 1996) así como la proteína parecida a vitronectina reportada por Zhu *et al.*, (1993) que resultó ser un factor de elongación de la traducción. Un tercer caso son dos proteínas de 60 y 66 kD que son reconocidas con los anticuerpos anti-vitronectina humana, pero que corresponden a proteínas ricas en hidroxiprolinas. La posibilidad de una relación inmunológica de p33 y p36 con vitronectina y fibronectina animal, fué poco favorecida desde los inicios del trabajo, ya que anticuerpos para estas proteínas no son capaces de reconocer a p33 y p36; además de que ni p33 ni p36 tienen propiedades de unión a heparina y/o vidrio similares a vitronectina y fibronectina, con lo que también se desfavorece la posibilidad de que p33 y p36 sean proteínas de las llamadas “pegajosas”.

Ha sido demostrado en varios trabajos, la actividad que tienen péptidos con la secuencia RGD para afectar procesos fisiológicos en las células de vegetales (Canut *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1989 y Faro *et al.*, 1999); estos datos sugieren que las células vegetales contienen receptores que reconocen a la secuencia RGD o bien dominios funcionalmente análogos. El efecto inhibitorio que sobre la unión de p33/p36 a la pmp80 tienen péptidos con la secuencia RGD así como proteínas como la fibronectina, nos permiten proponer que pmp80 es una proteína de unión que reconoce una secuencia RGD, una configuración parecida a la del RGD y/o bien un dominio funcional análogo al RGD presente en p33 y p36. La existencia de proteínas que reconocen al epítipo RGD en plantas no resulta nuevo, ya que por ejemplo Canut *et al.* (1998) reportaron la presencia de varios sitios de unión a RGD con diferentes afinidades, usando preparaciones de membranas de *Arabidopsis*. Otro dato interesante es que la unión de p33 y p36 a la membrana plasmática, es dependiente de cationes divalentes. La dependencia de cationes divalentes para la unión de una proteína receptora con su ligando, ha quedado claramente demostrada para el caso de las integrinas, que unen iones calcio en sitios específicos de su cadena alfa para estabilizar la unión con su ligando en la ME (Hynes, 1992).

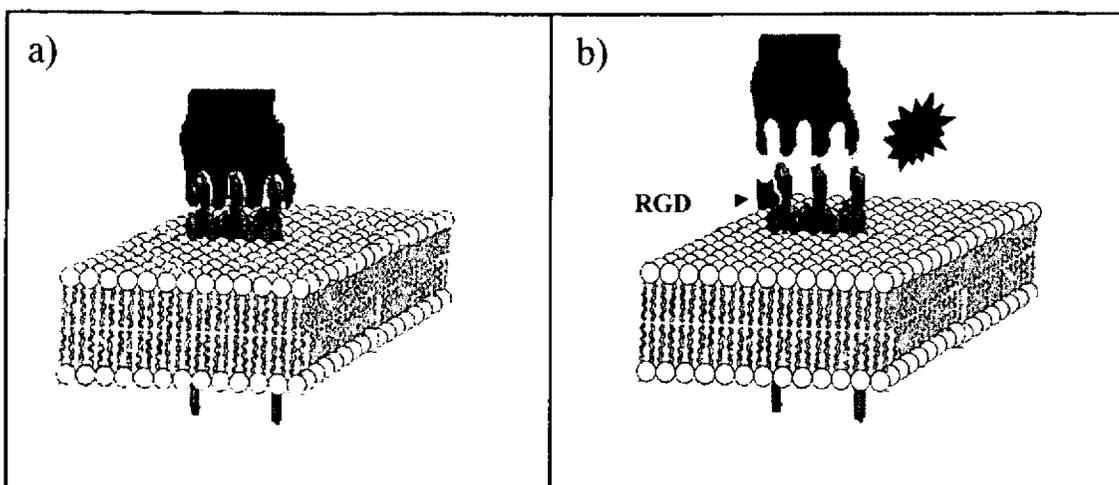
Nuestros datos apoyan la presencia de receptores membranales capaces de reconocer a la secuencia RGD, tal como sucede con receptores tipo integrinas. Aunque la presencia de un RGD en p33 y p36 no se puede descartar ya que no se conoce la secuencia completa de la proteína. El hecho de que SbPRP2 (cuya secuencia completa se conoce y carece de algún RGD) sea capaz de competir por la unión de p33 y p36 a la pmp80, y también, de unirse a una proteína de 80 kD, sugiere que la interacción entre pmp80 y p33/p36 no ocurre a través de una secuencia RGD estricta, pero sí probablemente a través de una configuración funcionalmente análoga a RGD (Greenspoon *et al.*, 1993; Ruoslahti, 1996). Lo anterior se

puede apoyarse con el hecho de que las predicciones funcionales de las moléculas basadas en su estructura primaria son muchas veces erróneas (Engel *et al.*, 1994).

La hipótesis de que alguna región dentro de la secuencia de aminoácidos de p33 y p36 sea capaz de actuar funcionalmente como un RGD se apoya con los datos de Greenspoon *et al.* (1993), quienes diseñan moléculas estructuralmente mimetizadoras del triplete RGD. Utilizando estructuras que contienen al grupo guanidinio en un extremo y al carboxílico en otro separados por un esqueleto de 11 átomos de carbono, logran sintetizar moléculas con una considerable afinidad por integrinas de plaquetas, inhibiendo su agregación a una concentración submilimolar. Los mismos autores concluyen que una secuencia con cierta específica flexibilidad y con un adecuado espaciamiento entre sus grupos funcionales, puede potencialmente adquirir una configuración parecida al RGD. Así mismo Ruoslahti (1996) reporta un grupo de secuencias alternativas al RGD que son capaces de unirse a integrinas, como en el caso del colágeno antes mencionado. Estas observaciones son muy importantes para nosotros, ya que al menos en el extremo amino de p33, p36, SbPRP2 y Pvp42 se encuentra una secuencia que potencialmente podría cumplir estos requisitos (NYDX), aunque no se puede excluir la posibilidad de que al menos en p33 y p36 se encuentren otro tipo de secuencias funcionalmente análogas a RGD, en algún sitio interno de la proteína o en el extremo carboxilo.

Existen otras posibilidades para explicar la competencia que ejerce el péptido con la secuencia RGD en la unión de p33/p36 a la pmp80, una de ellas es que la pmp80 sea una proteína que contenga un sitio de unión a RGD muy cercano a la región de unión con p33/p36 y por dicha razón se impida el adecuado reconocimiento de la pmp80 con p33/36 sin que estas últimas necesariamente tengan un RGD en su secuencia (Fig. 8).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



**Fig. 8.** Modelo que muestra la posible interacción de las proteínas p33 y p36 con la pmp80.

a) Reconocimiento conformacional de las proteínas p33 y/o p36, con la pmp80. b) Unión del péptido que contiene la secuencia RGD, a la Pmp80 y la consecuente competencia por la unión con p33 y/o p36.

Utilizando anticuerpos que reconocen a péptidos derivados de las secuencias de putativas integrinas de *Arabidopsis*, se pudo detectar una proteína de aproximadamente 80 kD en la fracción de proteínas de membrana plasmática de dicha especie (Laval *et al.*, 1999). Sin embargo, en nuestros ensayos tipo western usando algunos anticuerpos que reconocen integrinas de origen animal, fué posible detectar algunos péptidos en las membranas plasmáticas de frijol, pero ninguna de estas bandas posee un peso de 80 kD, por lo que suponemos que al menos en las condiciones del ensayo los anticuerpos usados no reconocen epítopes presentes en la pmp80, a pesar de que al menos algunos de estos mismos anticuerpos fueron capaces de afectar negativamente la unión de los protoplastos de frijol a las proteínas p33/36.

Nuestros datos apoyan la idea de que las PRP's juegan un papel importante, tanto en el desarrollo normal de las plantas, como en respuesta a estímulos ambientales. El mecanismo mediante el cual podrían realizar estas funciones consiste en el reconocimiento de proteínas específicas en la MP, de modo similar al colágeno y las integrinas en células animales. Hasta el momento este es uno de los primeros reportes en plantas superiores, en donde se identifica a una PRP de la ME como el ligando natural de una proteína de membrana plasmática con características similares a las integrinas animales.

## BIBLIOGRAFIA

- Akashi, T., Kawasaki, S. and Shibaoka, H. (1990). Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells. *Planta*. 182: 363-369.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. 717 Fifth Avenue, New York, NY 10022. pp 1000-1009.
- Bohnert, H. and Jensen, R. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *TIBTECH*. 14: 89-97.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*. 70: 21-30.
- Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol*. 103: 1035-1040.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. and Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell*. 6: 1703-1712.
- Burzio, L.O., Burzio, V.A., Silva, T., Burzio, L.A. and Pardo, J. (1997). Environmental bioadhesion: themes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol*. 8: 309-312.
- Campos, F., J.R., P.-C., J.M., V., F.A., C.M. and R., S. (1990). Localization of plasma H<sup>+</sup>-ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol*. 32: 1043-1053.
- Canut, H., Carrasco, A., Galaud, J.-P., Cassan, C., Bouyssou, H., Vita, N., Ferrara, P. and Pont-Lezica, R. (1998). High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall. *The Plant Journal*. 16: 63-71.
- Cassab, G.I. (1998). Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 49: 281-309.
- Castonguay, Y., Nadeau, P. and Laberge, S. (1993). Freezing tolerance and alteration of translatable mRNAs in alfalfa (*Medicago sativa* L.) hardened at subzero temperatures. *Plant Cell Physiol*. 34: 31-38.
- Chen, C.-G., Cornich, E.C. and Clarke, A.E. (1992). Specific expression of an extensin-like gene in the style of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell*. 4: 1053-1062.
- Cheung, A.Y., May, B., Kawata, E.E., Gu, Q. and Wu, H. (1993). Characterization of cDNA's for stylar transmitting tissue-specific proline-rich proteins in tobacco. *The Plant Journal*. 3: 151-160.
- Chispeels, M.J. and Sadava, D.E. (1994). *Plants, Genes, and Agriculture*. London, England. pp 187-200.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology*. 35: 393-405.

- Condit, C.M. and Meagher, R.B. (1986). A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature*. 323: 178-181.
- Cosgrove, D.J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 171-201.
- Coupe, S.A., Taylor, J.E., Isaac, P.G. and Roberts, J.A. (1993). Identification and characterization of a proline-rich mRNA that accumulates during pod development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Mol. Biol.* 23: 1223-32.
- Covarrubias, A.A., Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernández, M. and Garcarrubio, A. (1995). Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. 107. 1119-1128.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E. (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new b-tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Molecular Biology*. 17: 591-608.
- Datta, K., Schmidt, A. and Marcus, A. (1989). Characterization of two soybean repetitive proline-rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes. *The Plant Cell*. 1: 945-952.
- Deutch, C.E. and Winicov, I. (1995). Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Molecular Biology*. 27: 411-418.
- Didierjean, L., Frendo, P. and Burkard, G. (1992). Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.* 18: 847-849.
- Ertl, H., Hallmann, A., Wenzl, S. and Sumper, M. (1992). A novel extensin that may organize extracellular matrix biogenesis in *Volvox carteri*. *The EMBO Journal*. 11: 2055-2062.
- Engel, J., Efimov, V. and Maurer, P. (1994). Domain organizations of extracellular matrix proteins and their evolution. *Development Supplement*. 35-42.
- Esaka, M. and Hayakawa, H. (1995). Specific secretion of proline-rich proteins by salt-adapted winged bean cells. *Plant Cell Physiol.* 36: 441-446.
- Faik, A. (1998). A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *Eur. J. Biochem.* 253: 552-559.
- Faro, C. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 274, 40: 28724-28729.
- Filpula, D.R., Lee, S.-M., Link, R.P., Strausberg, S.L. and Strausberg, R.L. (1990). Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Prog.* 6:171-177
- Fincher, G.B., Stone, B.A. and Clarke, A.E. (1983). Arabinogalactan-proteins: structure biosynthesis and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 47-70.
- Fosket, D.E. (1994). *Plant Growth and Development*. San Diego, California.
- Fowler J.E. (1997). Plant cell morphogenesis: Plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:697-743.

- Gens, J.S., Reuzeau, C., Doodlittle, K.W., McNally, J.G. and Pickard, B.G. (1996). Covisualization by computational optical-sectioning microscopy of integrin and associated proteins at the cell membrane of living onion protoplasts. *Protoplasma*. 194: 215-230.
- Goodwin, W., Pallas, J.A. and Jenkins, G.I. (1996). Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*. 31: 771-781.
- Greenspoon, N., Hershkoviz, R., Alon, R., Varon, D., Shenkman, B., Marx, G., Federman, S., Kapustina and Lider, O. (1993). Structural analysis of integrin recognition and the inhibition of integrin-mediated cell functions by novel nonpeptidic surrogates of the Arg-Gly-Asp sequence. *Biochemistry*. 32: 1001-1008.
- Hanson, A.D. (1980). Interpreting the metabolic responses of plants to water stress. *HortScience*. 15: 623-629.
- He, Z.-H., Fujiki, M. and Kohorn, B.D. (1996). A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 19789-19793.
- He, Z.H., Cheeseman, I., He, D. and B.Kohorn. (1999). A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 39: 1189-1196.
- Hong, J.C., Nagao, R.T. and Key, J.L. (1989). Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. *The Plant Cell*. 1: 937-943.
- Hong, J.C., Nagao, R.T. and Key, J.L. (1990). Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 2470-2475.
- Hsiao, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 24: 519-70.
- Hubert, O. and Sumper, M. (1994). Algal-CAMs: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga *Volvox* with homology to *Drosophila* fasciclin I. *The EMBO Journal*. 13: 4212-4222.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69: 11-25.
- Iraki, N.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Carpita, N.C. (1989). Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol*. 91: 39-47.
- Iraki, N.M., Singh, N., Bressan, R.A. and Carpita, N.C. (1989). Cells walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol*. 91: 48-53.
- Käpylä, J., Ivaska, J., Riikonen, R., Nykvist, P., Pentikäinen, O., Johnson, M. and Heino, J. (2000). Integrin  $\alpha_2$ I domain recognizes type I and type IV collagens by different mechanisms. *JBC*. 275,5: 3348-3354.

- Kataoka, K., Amano, A., Kuboniwa, M., Horie, H., Nagata, H. and Shizukuishi, S. (1997). Active sites of salivary proline-rich protein for binding to *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae. *Infection and Immunity*. 3159-3164.
- Katembe, W.J., Swatzell, L.J., Makaroff, C.A. and Kiss, J.Z. (1997). Immunolocalization of integrin-like proteins in *Arabidopsis* and *Chara*. *Physiologia plantarum*. 99: 7-14.
- Kiba, A., Sugimoto, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1998). Interaction between cell wall and plasma membrane via RGD motif is implicated in plant defense responses. *Plant Cell Physiol*. 39: 1245-1249.
- Knight, C., Morton, L., Peachey A., Tuckwell, D., Farndale, R. and Barnes, M. (2000). The collagen-binding A-domains of integrins  $\alpha1\beta1$  and  $\alpha1\beta1$  recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *Vol. 275, No.1*: 35-40.
- Kreuger, M. and Holst, G.-J.v. (1993). Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol. Biol.* 30: 1077-86.
- Küster, H., Shróeder, G., Frühling, M., Pich, U., Rieping, M. and al., e. (1995). The nodule specific *VfENOD GRP3* gene encoding a glycine-rich early nodulin is located on chromosome I of *Vicia faba* L. and is predominantly expressed in the interzone II-III of root nodules. *Plant Biol. Mol.* 28: 405-421.
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Laval, V., Chabannes, M., Carrière, M., Canut, H., Barre, A., Rougé, P., Pont-Lezica, R. and Galaud, J.P. (1999). A family of *Arabidopsis* plasma membrane receptors presenting animal  $\beta$ -integrin domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1435: 61-70.
- Lawton, M.A. and Lamb, C.J. (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol. Cell. Biol.* 7: 335-341.
- Lord, E.M. and Sanders, L.C. (1992). Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movement in plants. *Developmental Biology*. 153: 16-28.
- Marty, I., Monfort, A., Stiefel, V., Iudevid, D., Delseny, M. and Puigdomenech, P. (1996). Molecular characterization of the gene coding for GPRP, a class of proteins rich in glycine and proline interacting with membranes in *Arabidopsis thaliana*.. *Plant Molecular Biology*. 30: 625-636.
- McCabe. P., Valentine, T., Forsberg L., Pennell R. (1997). Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *The Plant Cell*. 9: 2225-2241.
- McCann, M.C. and Roberts, K. (1991). Architecture of the primary cell wall. En: *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Press, A. (eds). pp 109-129.
- McCann, M.C., Shi, J., Roberts, K. and Carpita, N.C. (1994). Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *The Plant Journal*. 5: 773-785.

- McQueen-Mason, S. and Cosgrove, D.J. (1995). Expansin mode of action on cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107: 87-100.
- McQueen-Masson, S. (1977). Plant cell walls and the control of growth. *Biochemical Society Transactions.* 25: 204-213.
- Millar, D.J., Slabas, A.R., Sidebottom, C., Smith, C.G. and Allen, A.K. (1992). A major stress-inducible Mr-42 000 wall glycoprotein of french bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Planta.* 187: 176-184.
- Morimoto, S., Tateishi, N., Inuyama, M., Taura, F., Tanaka, H. and Shoyama, Y. (1999). Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties. *JBC.* 274: 26192-26198.
- Mundy, J. and Chua, N.-H. (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.
- Muñoz, F.J., Dopico, B. and Labrador, E. (1998). A cDNA encoding a proline-rich protein from *Cicer arietinum*. Changes in expression during development and abiotic stresses. *Physiologia Plantarum.* 4: 582-590.
- Nonami, H. and Boyer, J. (1990(a)). Primary events regulating stem growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 94: 1601-1609.
- Nonami, H. and Boyer, J.S. (1990 (b)). Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. *Plant Physiol.* 93: 1610-1619.
- Oliveira, D.D., Franco, L.d., Simoens, C., Seurinck, J., Coppitiers, J. and al., e. (1993). Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins. *Plant J.* 3: 495-507.
- Oparka K. J. (1994). Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytol.* 126: 571-591.
- O'Sullivan, J., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. and Jenkinson, H.F. (1997). Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. *Microbiology.* 143: 341-348.
- O'Sullivan, J., Jenkinson, H. y Cannon, R. (2000). Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology.* 146: 41-48.
- Pont-Lezica, R., Mc. Nally, J.G. and Pickard, B.G. (1993). Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypothesis. *Plant, Cell and Environment.* 16: 111-123.
- Punita. (1998).
- Quatrano, R., Brian, L., Aldridge, J. and Schultz, T. (1991). *Development* 1 (Suppl.). 11-16.
- Quatrano, R.S. and Shaw, S.L. (1997). Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in plant Science.* 2: 15-21.

- Reuzeau, C., Doolittle, K.W., McNally, J.G. and Pickard, B.G. (1997). Covisualization in living onion cells of putative integrin, putative spectrin, actin, putative intermediate filaments, and other proteins at the cell membrane and in an endomembrane sheath. *Protoplasma*. 199: 173-197.
- Roberts, A.W. and Heigler, C.H. (1989). Rise in chlorotetracycline fluorescence accompanies tracheary element differentiation in suspension cultures of *Zinnia*. *Protoplasma*. 152: 37-45.
- Roberts, M.R., Foster, G.D., Blundell, R.P., Robinson, S.W., Kumar, A. and al., e. (1993). Gametophytic and sporophytic expression of an anther-specific *Arabidopsis thaliana* gene. *Plant J*. 3: 111-20.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol*. 12: 679-715.
- Ryser, U., Shorderet, M., Zhao, G.-F., Studer, D. and Ruel, K. (1997). Structure cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J*. 12: 97-111.
- Ryu, J.-H., Mizuno, K., Takagi, S. and Nagai, R. (1997). Extracellular components implicated in the stationary organization of the actin cytoskeleton in mesophyll cells of *Vallisneria*. *Plant Cell Physiol*. 38: 420-432.
- Sanders, L.C., Wang, C.-S., Walling, L.L. and Lord, E. (1991). A homolog of the substrate adhesion molecule vitronectin occurs in four species of flowering plants. *The Plant Cell*. 3: 629-635.
- Santoro, S., and Zutter, M., (1995). The  $\alpha 2\beta 1$  integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thrombosis and Hemostasis*. 74(3) 813-21.
- Satoh, S. (1998). Functions of the cell wall in the interactions of Plant cells: Analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol*. 39(4): 361-368.
- Schultz, C., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J. and Bacic, A. (1998). GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in plant science*. 3: 426-431.
- Shindler, M. (1989). RGD-dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane: consequence for growth. *The Journal of Cell Biology*. 108: 1955-1965
- Shirsat, A.H., A., B., J., S. and N., H.J. (1996). The *Brassica napus extA* extensin gene is expressed in regions of the plant subject to tensile stresses. *Planta*. 199: 618-24.
- Showalter, A.M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*. 5: 9-23.
- Showalter, A.M., Butt, A.D. and Kim, S. (1992). Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol. Biol*. 19: 205-215.
- Showalter, A.M. and Varner, J.E. (1989). Plant hydroxyproline-rich glycoproteins. En: *The Biochemistry of Plants*. P.K. Stumpf and E.E. Conn, e. (eds). (New York: Academic Press). 15: pp 485-520.

- Sommer-Knudsen, J., Clark, A.E. and Bacic, A. (1996). A galactose-rich cell-wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*. *Plant J.* 9: 71-83.
- Sturm, A. (1992). A wound-inducible glycine-rich proteins from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleotide acid-binding proteins. *Plant Physiol.* 99: 1689-1692.
- Suzuki, H., Fowler, T.J. and Tierney, M.L. (1993(a)). Deletion analysis and localization of SbPRP1, a soybean cell wall protein gene, in roots of transgenic tobacco and cowpea. *Plant Molecular Biology.* 21: 109-119.
- Suzuki, H., Wagner, T. and Tierney, M.L. (1993(b)). Differential expression of two soybean (*Glycine max* L.) proline-rich protein genes after wounding. *Plant Physiol.* 101: 1283-1287.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (1991). Water balance of the plant. En: *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, I. (eds). Redwood City, California. pp 81-99.
- Talamás-Rohana, P., Hernández, V.I. and Rosales-Encina, J.L. (1994). A b1 integrin-like molecule in *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 88: 596-599.
- Templeton, M.D., Dixon, R.A., Lamb, C.J. and Lawton, M.A. (1990). Hydroxyproline-rich glycoprotein transcripts exhibit different spatial patterns of accumulation in compatible and incompatible interactions between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant physiol.* 94: 1265-1269.
- Tierney, M.L., Wiechert, J. and Pluymers, D. (1988). Analysis of the expression of extensin and p33-related cell wall proteins in carrot and soybean. *Mol. Gen. Genet.* 211: 393-399.
- Varner, J.E. (1989). *Plant Cell Wall Architecture*. *Cell.* 56: 231-239.
- Wagner, V.T., Brian, L. and Quatrano, R.S. (1992). Role of a vitronectin-like molecule in embryo adhesion of the brown alga *Fucus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3644-3648.
- Wagner, V.T. and Matthysse, A.G. (1992). Involvement of a Vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. *Journal of Bacteriology.* 174: 5999-6003.
- Wakabayashi, K., Hoson, T. and Kamisaka, S. (1997(a)). Changes in amounts and molecular mass distribution of cell-wall polysaccharides of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleotiles under water stress. *J. Plant Physiol.* 151: 33-40
- Wakabayashi, K., Hoson, T. and Kamisaka, S. (1997(b)). Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleotiles. *Plant Physiol.* 113: 967-973.
- Wang, J.-L., Walling, L.L., Jauh, G.Y., Gu, Y.-Q. and Lord, E.M. (1996). Lily cofactor-independent phosphoglycerate mutase: purification, partial sequencing, and immunolocalization. *Planta.* 200: 343-352.
- Williamson, M. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem.J.* 297: 249-260.

- Wilson, R.C., Long, F., Maruoka, E.M. and Cooper, J.B. (1994). A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *The Plant Cell*. 6: 1265-1275.
- Winicov, I. and Bastola, D.R. (1999). Transgenic overexpression of the transcription Factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiology*. 120: 473-480.
- Wojtaszek, P., Trethowan, J. and Bolwell, G.P. (1995). Specificity in the immobilisation of cell wall proteins in response to different elicitor molecules in suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology*. 28: 1075-1087.
- Wu, H.M., Wang, H. and Cheung, A.Y. (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell*. 82: 395-403.
- Wu, Y., Sharp, R.E., Durachko, D.M. and Cosgrove, D.J. (1996). Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol*. 111: 765-772.
- Wyatt, R.E., Nagao, R.T. and Key, J.L. (1992). Patterns of soybean Proline-rich protein gene expression. *The Plant Cell*. 4: 99-110.
- Yamada, S. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*. 7: 1129-1142.
- Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H. and Hayashi, M. (1988). Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. and Func.* 13: 281-292.
- Ye, Z.-H. and J.E., V. (1991). Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant Cell*. 3: 23-37.
- Yu, L.-X., Chamberland, H., Lafontaine, J.G. and Tabaeizadeh, Z. (1996). Negative regulation of gene expression of a novel proline-, threonine-, and glycine- rich protein by water stress in *Lycopersicon chilense*. *Genome*. 39: 1185-1193.
- Zhou, J., Rumeau, D. and Showalter, A.M. (1992). Isolation and characterization of two wound-regulated tomato extensin genes. *Plant Molecular Biology*. 20: 5-17.
- Zhu, J.-K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1993). Loss of arabinogalactan-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells. *Planta*. 190: 221-226.