



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

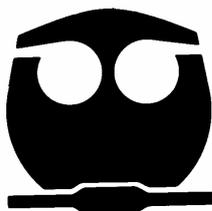
---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA  
ATPasa DE H<sup>+</sup> DE LA MEMBRANA  
PLASMÁTICA POR DISMINUCIÓN DE  
CERAMIDAS ENDÓGENAS EN  
EMBRIONES DE MAÍZ.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO EN ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**CHRISTIAN ALEJANDRO VÁZQUEZ VÁZQUEZ**



MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dra. Irma Bernal Lugo

Vocal: Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Secretario: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Suplente: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Suplente: Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

Sitio en donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio 101. Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema: \_\_\_\_\_  
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor Técnico: \_\_\_\_\_  
QFB. Consuelo Enríquez Arredondo

Sustentante: \_\_\_\_\_  
Christian Alejandro Vázquez Vázquez

## RECONOCIMIENTOS

Christian Alejandro Vázquez Vázquez, recibió beca de UC-MEXUS, Universidad de California y del proyecto CONACYT (40311-Q).

El trabajo de tesis fue financiado por los proyectos UNAM (PAIP 6290-02) DGAPA UNAM (EN2O9204), CONACYT (40311-Q) y UC-MEXUS, Universidad de California (CN-03-118).

A la colaboración de la M. en C. Laura Carmona Salazar

A la ayuda técnica de la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo y de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Al Dr. Luis E. González de la Vara del CINVESTAV Irapuato, por haber proporcionado el anticuerpo contra la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática.

Al jurado asignado, por la revisión y las sugerencias realizadas al presente trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS 7

ÍNDICE DE FIGURAS 8

ABREVIATURAS 9-10

RESUMEN 11-12

INTRODUCCIÓN 13-36

- I. La membrana plasmática. 13-20
  1. Composición de la membrana plasmática. 13-17
    - A. Lípidos. 13-16
    - B. Proteínas. 16-17
    - C. Carbohidratos. 17
  2. Estructura de la membrana plasmática. 17-19
    - A. Modelo de balsas lipídicas. 18-19
  3. Funciones de las membranas plasmáticas. 19-20
    - A. Barrera de compartimentalización y permeabilidad. 19
    - B. Señalización transmembranal. 19
    - C. Matriz de soporte de enzimas. 19-20
    - D. Transducción de energía. 20
  4. Propiedades de las membranas plasmáticas. 20
- II. La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas. 20-36
  1. Estructura. 21-22
  2. Catálisis, transporte de protones e hidrólisis de ATP. 22-25
  3. Papel fisiológico. 25-26
  4. Regulación. 26-32
    - A. Expresión de los genes de la enzima. 26-27
    - B. Expresión diferencial de isoformas. 27
    - C. Región auto-inhibitoria del COO<sup>-</sup> terminal. 27-28
    - D. Asociación con la proteína 14-3-3. 28-30
    - E. Influencia de los lípidos membranales. 31-32
  5. Oligomerización. 32
  6. Compuestos que afectan la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. 32-34
    - A. Fitorreguladores. 32-33
      - a) Auxinas. 33
      - b) Giberelinas. 33
      - c) Ácido abscísico. 33
    - B. Evocadores. 33

C.	Toxinas fúngicas.	33-34
a)	Beticolinas.	33
b)	Fusicoccina.	34
c)	FB1.	34
7.	Relación de la ATPasa de H <sup>+</sup> en la interacción con patógenos.	34-36
A.	Unión directa del compuesto a la enzima.	34
B.	La unión del compuesto a un receptor específico localizado en la membrana o en el citoplasma, que podría directamente interactuar con la enzima o bien a través de un mecanismo de transducción de señales.	35
C.	A través de la interacción con los lípidos u otro componente de la membrana que pueden cambiar la conformación de la enzima.	35-36
HIPÓTESIS		37
OBJETIVO GENERAL		38
OBJETIVOS PARTICULARES		38
MATERIALES Y MÉTODOS		39-48
I.	Reactivo.	39
II.	Material biológico.	39
III.	Imbibición de los embriones de semillas de <i>Zea mays</i> .	39
IV.	Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática de <i>Zea mays</i> .	40-41
1.	Obtención de la fracción microsomal.	40
2.	Obtención de vesículas de membrana plasmática.	40-41
V.	Ensayo de hidrólisis de ATP.	41-42
VI.	Efecto de la Metil-β-ciclodextrina.	42
VII.	Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes.	42-44
1.	Equipo y material necesario.	42
2.	Soluciones y reactivos.	42
3.	Procedimiento.	42-44
VIII.	Tinción de geles.	44-45
IX.	Inmunoréplica de la fracción membranal.	45-48
1.	Equipo y material necesario.	45
2.	Soluciones y reactivos.	45-46
3.	Procedimiento.	46-48
X.	Análisis densitométrico.	48
RESULTADOS		49-62
I.	Determinación de los niveles de actividad de la ATPasa de H <sup>+</sup> de MP de embriones expuestos a FB1, FB1 + Ceramida C <sub>6</sub> /Ceramida C <sub>16</sub> , o FB1 + Ceramida C <sub>16</sub> .	49-51

- II. Establecimiento de las condiciones para detectar a la ATPasa de H<sup>+</sup> y la proteína 14-3-3 por inmunoréplica. 52-54
- III. Inmunodetección de ATPasa de H<sup>+</sup> en vesículas de membrana plasmática. 55-56
- IV. Detección de la proteína 14-3-3 por inmunoréplica. 57-59
- V. Determinación del efecto del secuestro de esteroides endógenos en la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de embriones control y expuestos a FB1 ó FB1 + CerC<sub>6</sub>. 59-62

DISCUSIÓN 63-68

- I. Efecto de la FB1 y las ceramidas sobre los niveles de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática. 63-65.
- II. Incorporación de la ATPasa de H<sup>+</sup> a la membrana plasmática. 65-66
- III. Fosforilación, FB1 y asociación de la proteína 14-3-3 con la ATPasa de H<sup>+</sup>. 66-67
- IV. Efecto de los esteroides endógenos en la actividad de la enzima. 67-68

CONCLUSIONES 69

APÉNDICE 70

Ciclodextrinas. 70

BIBLIOGRAFÍA 71-82

**ÍNDICE DE TABLAS**

- I. Composición de lípidos de la membrana plasmática de plantas. 14
- II. Familia génica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP en *Arabidopsis thaliana*. 29
- III. Composición de amortiguadores para la obtención y purificación de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz. 39
- IV. Composición de la mezcla de fases y del sistema de fases para la purificación de membrana plasmática a partir de la fracción microsomal obtenida de embriones de maíz. 40
- V. Composición y concentración final del reactivo “E” para la hidrólisis de ATP. 41
- VI. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS según Schägger y von Jagow. 43
- VII. Soluciones para geles. 43
- VIII. Actividad de las tres principales enzimas que hidrolizan ATP en las preparaciones de vesículas de membrana plasmática provenientes de embriones de maíz embebidos en presencia de FB1 y/o las CerC<sub>6</sub>, ó CerC<sub>16</sub>. 50
- IX. Actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en presencia de FB1 y/o las CerC<sub>6</sub>, ó CerC<sub>16</sub>. 51
- X. Eliminación de la reactividad inespecífica del anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP en el procedimiento de inmunoréplica. 53
- XI. Condiciones para eliminar la reactividad inespecífica del anticuerpo contra la proteína 14-3-3 en el procedimiento de inmunoréplica. 54
- XII. Análisis densitométrico de la banda correspondiente a la ATPasa de H<sup>+</sup> de las inmunorélicas con VMP control, VMP con FB1 y VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub>. 55
- XIII. Representación tabular de la comparación de los datos provenientes del análisis densitométrico de la banda de la ATPasa de H<sup>+</sup> y sometidos al análisis de varianza. 56
- XIV. Análisis densitométrico de la banda correspondiente a la proteína 14-3-3 de las inmunorélicas con VMP control, VMP con FB1 y VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub>. 58

**ÍNDICE DE FIGURAS**

1. Principales lípidos y su distribución ordenada en la MP de raíces de maíz. 15
2. Representación esquemática de la fitoesfingosina y la ceramida C<sub>18</sub>, esfingolipidos comúnmente encontrados en plantas. 16
3. Modelo de la estructura de las membranas biológicas. 18
4. Transportadores primarios y secundarios en la membrana plasmática. 21
5. Modelo de la topología de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP [modificado de Palmgren 2001]. 23
6. Ciclo de reacción de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP [tomado de Morsomme y Boutry 2000]. 24
7. Esquema propuesto para la reacción de fosforilación durante la catálisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP [tomado de Palmgren 2001]. 25
8. Modelo de regulación para la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP [tomado de Morsomme y Boutry 2000]. 30
9. Estructura de la FB1. 36
10. Procedimiento de purificación de las VMP. 41
11. Efecto de la adición de ceramida *in vitro* a VMP obtenidos de embriones expuestos a FB1. 51
12. Efecto de la concentración de leche desgrasada en la inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de embriones de maíz en membranas de PVDF. 53
13. Efecto de la concentración de leche desgrasada en la inmunodetección de la proteína 14-3-3 en embriones de maíz en membranas de PVDF. 54
14. Inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> en VMP obtenidas de embriones de maíz incubados en presencia y ausencia de FB1. 56
15. Inmunodetección de la proteína 14-3-3 en VMP obtenidas de embriones de maíz incubados en presencia y ausencia de FB1. 58
16. Sensibilidad del ensayo de detección de la ATPasa de H<sup>+</sup> y contra la proteína 14-3-3 a una disminución de proteína. 59
17. Efecto de la M-β-CD sobre la hidrólisis total de ATP y sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. 61
18. Efecto de distintas concentraciones de M-β-CD sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en VMP control y en VMP tratadas con FB1. 62
19. Modelo del efecto de la FB1 sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en embriones de maíz. 68
20. Representación de la M-β-CD y algunas de sus propiedades físicas. 70

1. $\Delta\Psi$	Potencial de membrana
2. $\Delta\text{pH}$	Diferencia de pH
3. Å	Amstrongs
4. %C	Proporción de entrecruzamiento del agente bisacrilamida-acrilamida
5. %T	Contenido total de archilamida (peso / volumen)
6. A	Dominio de activación
7. A.	<i>Arabidopsis</i>
8. AHA1 (2,3)	Isoforma 1, 2,...,12 de ATPasa de H <sup>+</sup> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
9. Aprox	Aproximadamente
10. BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolilfosfato p-Toloidina
11. Brij	Polioxietilenlauril éter
12. BTP	Bis Tris propano
13. CCCP	Carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona
14. Ceramida C <sub>6</sub>	N-hexanoil-D-esfingosina
15. Ceramida C <sub>16</sub>	N-palmitoil-D-esfingosina
16. CerC <sub>6</sub>	N-hexanoil-D-esfingosina
17. CerC <sub>16</sub>	N-palmitoil-D-esfingosina
18. COO <sup>-</sup> terminal	Carboxilo terminal
19. COP	Coat protein complex
20. DEAE	Dietilaminoetil
21. Dex	Dextran
22. DMF	N,N-dimetilformamida
23. DRM's	Membranas resistentes a la solubilización por detergentes
24. DTT	DL-Ditiotreitol
25. E1	Estado conformacional 1 en ciclo catalítico de la ATPasa
26. E2	Estado conformacional 2 en ciclo catalítico de la ATPasa
27. E1-P	Estado conformacional 1 fosforilado
28. E2-P	Estado conformacional 2 fosforilado
29. EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
30. FC	Fosfatidilcolina
31. FE	Fosfatidiletanolamina
32. FG	Fosfatidilglicerol
33. FI	Fosfatidilinositol
34. Fig	Figura
35. FS	Fosfatidilserina
36. FB1	Fumonisina B1
37. HEPES	N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-Ácido etanosulfónico

---

38. kDa	Kilo dalton
39. Km	Constante cinética de Michaelis-Menten
40. M1, M2,..., M10	Cruce transmembranal 1, 2,..., 10 de la ATPasa de H <sup>+</sup>
41. M-β-CD	Metil-β-ciclodextrina
42. MP	Membrana plasmática
43. Mr	Peso molecular
44. N	Dominio de unión al nucleótido ATP
45. <i>N.</i>	<i>Nicotiana</i>
46. NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride (Nitro azul cloruro de tetrazolio)
47. P	Dominio de fosforilación
48. Peg	Polietilenglicol
49. P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
50. PF2A	Proteína fosfatasa 2A
51. PIPES	Ácido 1,4-Piperazinadietanosulfónico
52. Pma1	Isoforma 1 de ATPasa de H <sup>+</sup> de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
53. PVDF	Polivinilideno Difluoruro
54. R	Dominio de regulación
55. RE	Retículo endoplasmico
56. RNA	Ácido ribonucleico
57. rpm	Revoluciones por minuto
58. <i>S.</i>	<i>Sacharomyces</i>
59. SAT	Esfinganina- <i>N</i> -aciltransferasa
60. SDS	Dodecilsulfato de sodio
61. TBS	Amortiguador salino con Tris
62. TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilendiamina
63. TTBS	Amortiguador salino con Tris y Tween 20
64. uORF	Upstream open reading frame (Marco de lectura abierto corriente arriba)
65. V <sub>max</sub>	Velocidad máxima
66. VMP	Vesículas de membrana plasmática

## RESUMEN

La ATPasa de H<sup>+</sup> (EC 3.6.3.6) es una enzima de la membrana plasmática que es fundamental en la fisiología de la célula vegetal, ya que de ella dependen los procesos de elongación celular, transporte de nutrientes, apertura y cierre de estomas y regulación del pH intracelular [Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Siendo una enzima membranal, su actividad está influenciada por el entorno lipídico. Al respecto, hay varios reportes en la literatura que indican que diferentes glicerolípidos y esteroides membranales, así como detergentes, modifican positiva o negativamente su actividad [Brauer y Tu 1989, Sandstrom y Cleland 1989, Gomès *et al.* 1996, Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997]. Hasta el momento, hay pocos reportes que señalen que la ATPasa requiere de esfingolípidos para su función.

En el laboratorio, se ha encontrado que la adición de fumonisina B1 (FB1) a embriones de maíz produce una inhibición del 20 al 30 % de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> [Gutiérrez 2005]. La toxina también produce un aumento en los niveles de esfinganina en la membrana plasmática, gracias a la inhibición de la esfinganina *N*-acil transferasa (SAT). Sin embargo, la inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> no es producida por el aumento de esfinganina y sí es revertida por la adición de ceramida, sugiriendo que la disminución observada en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> por la FB1 está relacionada con una disminución en los niveles endógenos de ceramida.

En este trabajo se trata de dilucidar el mecanismo por el cual la ceramida (o esfingolípidos complejos) es requerida para la actividad completa de la enzima, explorándose varias posibilidades: incorporación adecuada de la enzima a la membrana plasmática, mayor nivel de fosforilación de la enzima, conformación más activa de la enzima por requerimiento estructural del lípido o por una interacción de éste con esteroides membranales.

Este trabajo se llevó a cabo en embriones de maíz expuestos a 20 µM de FB1 y/o a 20 µM de ceramida C<sub>6</sub> por 24 h y de los cuales se purificaron vesículas de membrana plasmática (VMP). En éstas, se determinó la actividad de hidrólisis de ATP por un método colorimétrico y la presencia de la enzima y de la proteína reguladora 14-3-3 por anticuerpos específicos. Se evaluó el efecto de la metil-β-ciclodextrina (M-β-CD) para disminuir los niveles de esteroides endógenos.

Los resultados muestran que la ATPasa de H<sup>+</sup> no sufrió cambios en la cantidad de la enzima presente en las VMP cuando los embriones eran tratados con 20 µM de FB1, por lo que podemos descartar que la FB1 esté influyendo en la disminución de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> por un defecto en su incorporación en la membrana plasmática.

Como una de las formas de regulación de la ATPasa de H<sup>+</sup> es por medio de la unión de la proteína 14-3-3 al carboxilo terminal fosforilado, la disminución en la actividad inducida por FB1 podría deberse a una menor fosforilación de la enzima y por tanto, a una menor cantidad de la proteína 14-3-3 asociada a la enzima. No se observó un cambio en la cantidad de la proteína 14-

3-3 en las VMP control y las provenientes de embriones embebidos con 20  $\mu$ M de FB1, lo que nos dice que la disminución en la actividad de la enzima por la FB1, no está relacionada con cambios en su regulación por fosforilación e interacción con la proteína 14-3-3.

La posibilidad de que la inhibición de la ATPasa de  $H^+$  debida a la falta de ceramida endógena estuviera relacionada con una interacción de la ceramida con los esteroides membranales, se exploró removiendo los esteroides con M- $\beta$ -CD. Se encontró que la actividad de la ATPasa de  $H^+$  fue más sensible a la remoción de esteroides en las VMP de embriones tratadas con 20  $\mu$ M de FB1 en comparación con las VMP control. Estos resultados sugieren que la ceramida está interactuando con los esteroides membranales que se requieren para la actividad de la enzima. Además, se ha reportado en la literatura que la ATPasa de  $H^+$  se encuentra en balsas lipídicas [Mongrand *et al.* 2004, Shaollari *et al.* 2004, Borner *et al.* 2005] y las balsas lipídicas son ricas en esteroides y esfingolípidos complejos [Simons e Ikonen 1997]. Al haber una deficiencia de ceramida, los esteroides podrían encontrarse en estructuras menos ordenadas y compactas, siendo más fácil su remoción.

La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática aparentemente se requiere de ceramida/esfingolípidos complejos para su función a través de una interacción de este lípido con la enzima y los esteroides.

## INTRODUCCIÓN

### I. La membrana plasmática

La membrana plasmática es una bicapa lipídica resistente, flexible y selectivamente permeable a sustancias polares, considerada como la frontera entre la célula y su entorno. Los componentes lipídicos de la membrana constituyen la barrera hidrofóbica de permeabilidad, que sumada a la asimetría de su distribución entre las dos caras de la membrana plasmática (MP), contribuye a conectar el exterior con el interior de la célula [Edidin 2003], mientras que las proteínas funcionan principalmente como sistemas de transporte y como señalizadores para el tráfico celular [Ephritikhine *et al.* 2004].

#### 1. Composición de la membrana plasmática.

La composición química es muy variada, lo cual indica la diversidad de funciones biológicas que la MP tiene en los seres vivos. Los componentes principales son: las proteínas (las cantidades relativas son de 20 % a 60 % dependiendo del tipo de membrana), los lípidos polares (30 % a un 80 % del peso total) y una pequeña cantidad de carbohidratos (de un 0 % a un 10 % del peso total), que forman parte de glucoproteínas y glucolípidos [Lehninger *et al.* 1993].

#### A. Lípidos

El análisis químico de membranas aisladas de fuentes diversas pone de manifiesto ciertas propiedades comunes. La composición de los lípidos de la MP es característica de cada especie, tejido y del tipo de células. Está claro que las células tienen mecanismos para controlar las clases, distribución y cantidades de lípidos de membrana sintetizados (Tabla I y Fig. 1), ya que su inadecuada distribución o metabolismo puede tener serias consecuencias para las células y los organismos [Lehninger *et al.* 1993, Holthuis y Levine 2005, Maxfield y Tabas 2005].

Por definición, los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos. Los lípidos de las membranas son moléculas relativamente pequeñas que tienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica (excepto por el estigmasterol). Una de las propiedades más importantes de los lípidos, desde el punto de vista biológico, es su hidrofobicidad. Esta propiedad se debe a la estructura de los ácidos grasos, las bases esfingoideas o los anillos heterocíclicos, dependiendo del tipo de lípido de que se trate. Los tres principales tipos de lípidos en la MP son los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides [Stryer *et al.* 2003].

Los glicerolípidos son los lípidos más abundantes en las membranas biológicas. Una molécula de glicerolípido está constituida por cuatro componentes, un ácido graso (los que más ocurren en las membranas biológicas son los ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono), un esqueleto al que se unen los ácidos grasos, generalmente glicerol, un fosfato y un alcohol unido al fosfato.

Tabla I. Composición de lípidos de la MP de maíz [Bohn *et al.* 2001].

Tipos de lípido	Ejemplos de lípidos	% en mol de membranas plasmáticas aisladas de raíces de maíz
Glicerolípidos	Fosfatidilcolina	15.8
	Fosfatidiletanolamina	14.2
	Fosfatidilserina	4.0
	Fosfatidilglicerol	5.3
	Fosfatidilinositol	4.6
Esfingolípidos	Glucocerebrósidos	6.8
	Esterilglicósidos	5.8
	Esteroglucósidos acilados	2.7
Esteroles	Estigmasterol	19.8
	Campesterol	13.0
	Sitoesterol	6.7
	Colesterol	No detectado

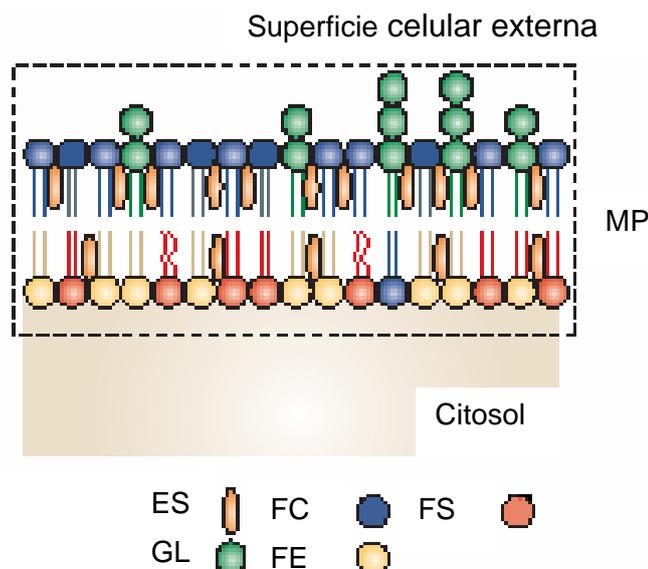
Los esfingolípidos son lípidos derivados de la esfingosina (4-esfingenina) o estructuras relacionadas. Estructuralmente, los esfingolípidos son definidos y distinguidos por la presencia de un esqueleto esfingoideo. En células de mamíferos, el esfingolípidos usual es la esfingosina (trans-D-eritro-2-Amino-4-octadecano-1,3-diol), en células de plantas y levaduras se encuentra en mayor proporción la fitoesfingosina (D-Ribo-2-aminooctadecano-1,3,4-triol).

Los esfingolípidos son sintetizados en el lumen del aparato de Golgi a partir de la condensación de L-serina con un ácido graso más Coenzima A. Los esfingolípidos son distribuidos selectivamente a la MP y a otros organelos a través de vías de tráfico vesicular.

La ceramida es un esfingolípidos acilado en la posición 2-amino de la cadena (Fig. 2). Las ceramidas varían principalmente en el esqueleto lipídico, sobre todo en los distintos sustituyentes en la posición 1-OH. Esta variación va desde un simple grupo fosfato, pasando por una unión  $\beta$ -glucosídica de una glucosa o una galactosa, hasta especies de ceramidas altamente glucosiladas. La ceramida es sintetizada por la ceramida sintasa (esfingosina-N-aciltransferasa). Un potente inhibidor de la ceramida sintasa es la toxina FB1 de *Fusarium verticillioides*.

En la actualidad se ha encontrado que las ceramidas tienen un papel muy importante en una amplia variedad de respuestas celulares, como el crecimiento, diferenciación, muerte y detención del ciclo celular [Hannun y Obeid 2002].

El grupo final de esfingolípidos, consiste en N-diacilderivados, como la 1-galactosilesfingosina y otros [Petty 1993, Huwiler *et al.* 2000]. Los glucolípidos, como su nombre lo indica, son esfingolípidos que contienen azúcares. Están orientados de manera totalmente asimétrica, con el azúcar expuesto hacia la cara extracelular de la MP.



**Fig. 1. Principales lípidos y su distribución ordenada en la MP de raíces de maíz.** ES = estigmasterol, FC = fosfatidilcolina; FE = fosfatidiletanolamina; FS = fosfatidilserina, GL = Glicolípidos

El colesterol es un lípido con una estructura diferente a la de los glicerolípidos y esfingolípidos. Es un esteroide formado por la unión de cuatro anillos hidrocarbonados. Es sintetizado en el retículo endoplásmico y repartido a otros organelos por combinación de tráfico vesicular y no vesicular [Maxfield y Tabas 2005]. La MP se encuentra enriquecida en colesterol. Este enriquecimiento está probablemente determinado por su alta afinidad por los esfingolípidos y glicerolípidos. Si bien éste es el principal esteroide en células animales, en las de plantas hay otros esteroides en mayor proporción como el sitoesterol, el campesterol y el estigmasterol (Tabla I).

La distribución diferencial y el ordenamiento de los lípidos en las células no se puede explicar sólo por el metabolismo subcelular, también hay que considerar el enorme tráfico vesicular entre la MP y los distintos organelos de la célula. Por tanto en la actualidad se ha puesto mucha atención en el mecanismo que siguen las células para imponer la selectividad y la direccionalidad del tráfico lipídico.

Los lípidos en la MP presentan tres tipos de movimientos que son: difusión lateral en el plano de la membrana, un movimiento llamado flip-flop entre los lados opuestos de la membrana y a través de ella y una difusión fuera de la membrana, hacia la fase acuosa, seguido de una inserción a otra membrana. Un ejemplo de este último mecanismo es cuando lípidos específicos son enviados selectivamente junto con proteínas recién sintetizadas, cuyo destino es la MP y que son importados primero por el retículo endoplásmico, después enviados al aparato de Golgi y finalmente son empacados dentro de vesículas secretoras que se funden con la MP (llamado también ruta exocítica).

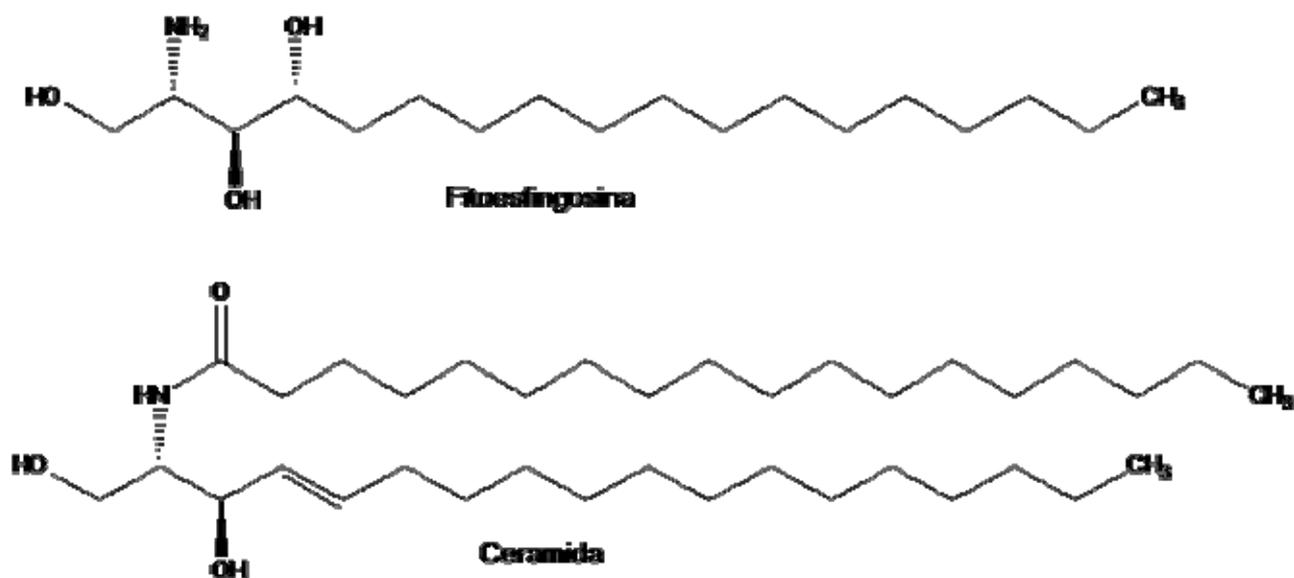


Fig. 2. Representación esquemática de la fitoesfingosina y la ceramida C<sub>18</sub>, esfingolípidos comúnmente encontrados en plantas.

Los lípidos están siendo reconocidos de manera amplia como reguladores versátiles y dinámicos de numerosos procesos celulares que van desde el crecimiento celular, desarrollo y supervivencia a partir de mecanismos de señalización intracelular, así como mecanismos de clasificación molecular (carga sorting) y tráfico membranar [Stryer *et al.* 2003, Holthuis y Levine 2005].

### B. Proteínas.

Mientras los lípidos forman la barrera estructural de las membranas y contribuyen a sus atributos funcionales, las proteínas participan muy activamente en este último aspecto [Petty 1993]. La composición proteica de membranas de orígenes diferentes varía aún más ampliamente que su composición lipídica, lo que refleja su especialización funcional [Lehninger *et al.* 1993].

Las proteínas son polímeros de moléculas que contienen nitrógeno y que son conocidos como amino ácidos. El mismo grupo de 20 amino ácidos es usado para la formación de todas las proteínas a través de su ordenamiento en diferentes posiciones. Las proteínas son grandes y complejas y contienen cientos de amino ácidos, por tanto, la gran cantidad de secuencias de amino ácidos es muy importante porque determina la estructura y función de las proteínas.

Hay dos tipos de proteínas asociadas a las membranas plasmáticas: las llamadas proteínas periféricas y otras proteínas que están estrechamente unidas a las membranas, que son llamadas proteínas integrales o transmembranales. Las proteínas periféricas son aquellas que están unidas a las membranas a través de interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno, se disocian de la membrana por procedimientos relativamente suaves que dejan intacta la membrana, tales como la exposición a soluciones salinas de elevada fuerza iónica, agentes quelantes de metales o cambios de pH. La mayoría de las proteínas periféricas de la MP están unidas a la superficie de proteínas integrales, ya sea en la cara citosólica de la membrana o

ya sea en la cara extracelular. Otras están ancladas a las membranas a través de enlaces covalentes con una cadena hidrofóbica, como un ácido graso [Stryer *et al.* 2003]. Las proteínas integrales pueden consistir de una simple subunidad o de grandes complejos hechos de varias subunidades, con componentes adicionales no proteicos, como grupos prostéticos. Algunas proteínas integrales sólo tienen acceso a un lado de la MP, mientras que las proteínas transmembranales atraviesan la membrana y tienen acceso a ambos lados de la misma [Raven *et al.* 1992, Hopkins 1995].

### **C. Carbohidratos.**

Muchos componentes de la MP pueden estar glicosilados. Alrededor del 5 % del peso total de lípidos membranales está en forma de glicolípidos y se ha establecido que el contenido de carbohidratos puede llegar a constituir hasta el 14 % del peso seco total de la MP, con un promedio entre 2 % y 8 %. A pesar de que en la naturaleza existen más de 100 tipos diferentes de monosacáridos, solamente algunos se encuentran en las glucoproteínas y los glicolípidos de las membranas en general. Entre los principales están la galactosa, manosa, fructosa, glucosa, glucosamina, galactosamina y ácido siálico; éste último se encuentra generalmente como grupo terminal, contribuyendo de manera importante a la carga negativa neta que presenta la superficie de la membrana de mamíferos. Las cadenas de carbohidratos laterales presentes en glucoproteínas y lipoproteínas, pocas veces exceden de 15 residuos [Zagoya y Hicks 1995].

## **2. Estructura de la membrana plasmática**

El principio de la estructura molecular de la MP lo propusieron en 1935 Danielli y Davson. Para explicar algunas de las propiedades de la membrana, ellos propusieron un modelo de bicapa lipídica, con proteínas unidas a ambas interfases lípido-agua. El grosor de las membranas biológicas que oscila entre 5 y 8 nm según mediciones realizadas por microscopía electrónica, es lo que cabría esperar de una bicapa lipídica. La difracción por rayos "X" muestra también una distribución de densidad electrónica esperada para la estructura de una bicapa, además de verse con apariencia trilaminar cuando se observan en sección transversal al microscopio electrónico.

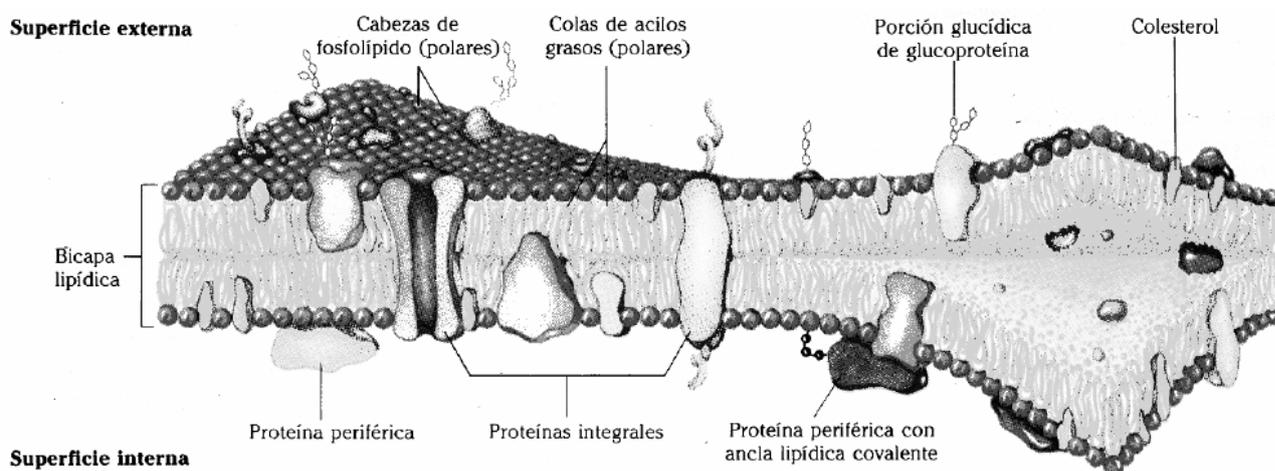
Las pruebas combinadas de microscopía electrónica, composición química y estudios físicos de permeabilidad y movimiento de moléculas individuales de proteínas y lípidos dentro de las membranas, justifican el modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson propuesto en 1972, para la estructura de las membranas biológicas (Fig. 3), en donde los lípidos y proteínas integrales forman un mosaico diverso y dinámico gracias a su fluidez, por lo que, tanto los lípidos como las proteínas integrales pueden realizar movimientos laterales dentro de la bicapa. El concepto de fluidez membranar indica que los principales componentes de la membrana tienen una movilidad lateral libre dentro de cada monocapa, pero preservan su estabilidad a través de interacciones no covalentes lípido-lípido y lípido-proteína.

En esta bicapa lipídica, las proteínas integrales están incrustadas, relacionándose por medio de interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de la membrana y los dominios hidrofóbicos

de las proteínas y también por medio de interacciones recíprocas entre las porciones hidrofílicas de las mismas especies.

### A. Modelo de balsas lipídicas.

Por observaciones realizadas utilizando sondas con movimiento de rotación del electrón, hay zonas que se forman en la MP cuya existencia no es fácilmente explicable por el modelo del mosaico fluido. En estas zonas, se propone que hay una mezcla de lípidos organizados en pequeños dominios y de lípidos desorganizados en el resto de la membrana [Jain y White 1977]. Este concepto fue evolucionando hasta que, en 1997, el término de balsa lipídica (lipid raft) fue acuñado [Simons e Ikonen 1997]. El modelo propone que los distintos tipos de lípidos no están uniformemente distribuidos a lo largo de las membranas plasmáticas de las células eucariotas, sino que están organizadas a forma de parches en distintos conjuntos de lípidos.



**Fig.3. Modelo de la estructura de las membranas biológicas [tomado de Lehninger *et al.* 1993].**

El modelo de balsas lipídicas se basa experimentalmente en estudios con membranas artificiales en las cuales los esteroides promueven la formación de microdominios que son otro nombre de las balsas lipídicas [Xu *et al.* 2001]. Al parecer, las fuerzas principales que promueven la formación de balsas lipídicas es la interacción lípido-lípido. Los esfingolípidos se asocian unos con otros a través de sus cabezas de carbohidratos y su larga cadena hidrocarbonada predominantemente saturada, mientras que los esteroides sirven para llenar los espacios que quedan entre los esfingolípidos [Simons e Ikonen 1997]. Una de las principales evidencias que hay de la existencia de balsas lipídicas, es la extracción de membranas resistentes a la solubilización con detergente (DRM's por sus siglas en inglés). En plantas, se ha reportado la evidencia de DRM's en *Nicotiana tabacum* [Peskan *et al.* 2000, Mongrand *et al.* 2004] y *Arabidopsis thaliana* [Borner *et al.* 2005]. Además, en la actualidad un gran número de métodos bioquímicos, inmunológicos y biofísicos proveen evidencia de su existencia [Bhat y Panstruga 2005].

A pesar de su presunta composición y estructura, no se han determinado las funciones de las balsas lipídicas. Se les han atribuído muchos eventos celulares como procesos de transducción de señales, secreción polarizada, transporte membranal, organización del citoesqueleto, apoptosis y como puerta de entrada a organismos patógenos [Simons y Toomre 2000, Bhat y Panstruga 2005]. En este último punto, donde se ha propuesto que las balsas lipídicas sirven como puerta de entrada a patógenos, se ha visto que la modificación de la composición lipídica, en particular de los esteroides (extraídos con M- $\beta$ -CD), ha resultado en una inhibición de la infección por *Escherichia coli* [Shin *et al.* 2000] y una disminución de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, pues requieren de plataformas ricas en ceramidas y colesterol para infectar a pacientes inmunodeprimidos [Grassmé *et al.* 2003].

### **3. Funciones de las membranas plasmáticas.**

La fisiología de la MP está ligada a la dinámica de los lípidos y proteínas que la constituyen. Esta relación tiene un impacto significativo en los procesos celulares esenciales como la activación, reconocimiento de una molécula receptora por una ligante, presentación de antígenos, interacciones intracelulares, por mencionar algunos [Vereb *et al.* 2003].

Algunas de las funciones celulares fundamentales de la MP son:

#### **A. Barrera de compartimentalización y permeabilidad.**

Dentro de todas las funciones de las membranas plasmáticas, la principal es la de ser la barrera hidrofóbica entre los medios acuosos externo e interno, regulando la entrada y salida de solutos para mantener un balance entre la presión osmótica en ambos lado de la MP y además limitando, el volumen celular [Robertis y Robertis 1981, Singer 2004].

#### **B. Señalización transmembranal.**

En la actualidad se sabe que la MP es una parte altamente sensible de la célula y es el principal intermediario entre los acontecimientos del entorno con los cuales tiene que relacionarse [Cowan *et al.* 1993]. Las células poseen proteínas de membrana que presentan sitios de unión altamente específicos para moléculas que funcionan como señales extracelulares, como el caso de la acetilcolina y su receptor específico, el cual al momento de unirse al receptor de acetilcolina, desencadena una cascada de señalización al interior de la célula con la cual hizo contacto [Lenhinger *et al.* 1993]. Pero no sólo las proteínas de membrana realizan la señalización, también se ha encontrado que los lípidos a través del tráfico vesicular entre la membrana y los distintos organelos sirven como potentes señalizadores y desencadenadores de respuestas, como por ejemplo la modulación de la fluidez de la membrana que está dada por el tipo de lípidos predominantes en la MP [Cowan *et al.* 1993, Bohn *et al.* 2001, Holthuis y Levine 2005].

#### **C. Matriz de soporte de enzimas.**

La membrana funciona como una matriz en la que están embebidas enzimas que realizan catálisis vectorial, es decir, reacciones que requieren una direccionalidad (en el caso de la MP, entre el citosol y el medio extracelular). La NADPH oxidasa es un ejemplo de la formación de

complejos proteicos que realizan catálisis química, que en este caso es la producción regular de especies reactivas de oxígeno en respuesta a factores de crecimiento, citocinas, señales de calcio, defensa del hospedero apoptosis y modificación oxidativa del medio extracelular [Lambeth 2004].

#### D. Transducción de energía.

La MP se caracteriza por mantener un potencial eléctrico, debido a la diferencia de carga entre el medio extracelular y el medio intracelular. Esta diferencia de carga es debido al transporte y difusión de solutos a través de ella, generándose una diferencia de concentración de iones entre el medio externo e interno, lográndose así una diferencia de potencial eléctrico [Zagoya y Hicks 1995]. El mejor ejemplo es el sistema de transporte de electrones y protones de la fosforilación oxidativa en las membranas de bacterias y mitocondrias y el transporte de protones producido por la ATPasa de  $H^+$  en las membranas plasmáticas de levaduras y plantas [Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001].

#### 4. Propiedades de las membranas plasmáticas

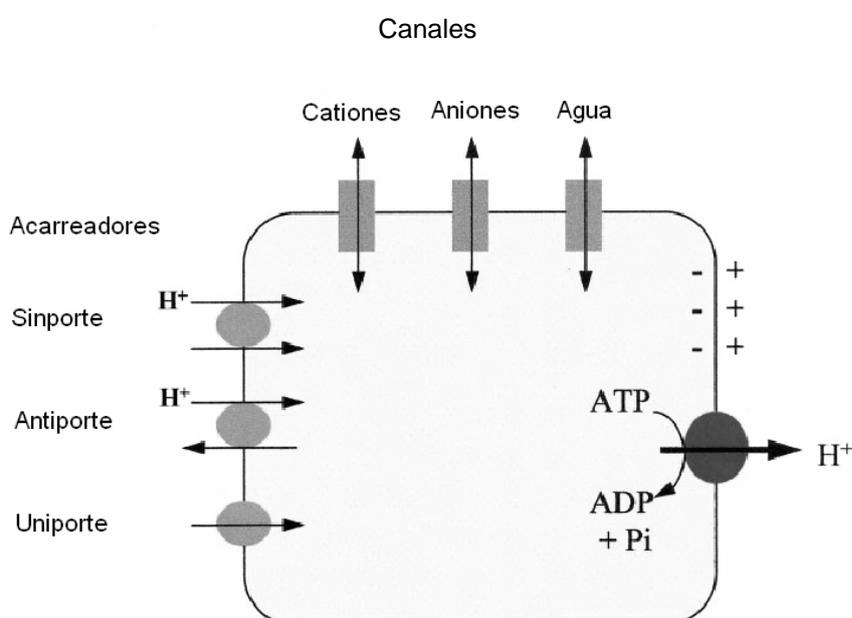
Todas las membranas biológicas comparten varias propiedades fundamentales. Una de ellas es que las bicapas lipídicas son impermeables a la mayoría de los solutos polares o cargados, pero son permeables a los compuestos no polares. Esto es fundamental para la fisiología de la célula y para el mantenimiento de condiciones intracelulares adecuadas y también está relacionado con el equilibrio osmótico que mantiene la célula con su medio externo, lo que lleva a considerar distintos fenómenos de transporte que se llevan a cabo en la MP. Energéticamente, los sistemas de transporte se clasifican en aquellos de transporte pasivo y los de transporte activo con sus distintas modalidades. El potencial de membrana o  $\Delta\Psi$ , que se origina cuando existe una diferencia de potencial o carga eléctrica en ambos lados de la membrana, también promueve movimientos electroforéticos o electrogénicos, debido a que hay un pequeño exceso de cargas de un lado y un leve déficit en el otro. La magnitud de la diferencia de potencial de la membrana plasmática de una célula varía ligeramente, dependiendo del tipo celular y del tipo de organismo [Zagoya y Hicks 1995]. La MP tiene un potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) negativo en el lado citoplásmico, con valores entre 10 y 100 mV o aún más, el cual está generado principalmente por la bomba de  $H^+$  en la MP de plantas [Gutiérrez *et. al.* 2001]. Las membranas plasmáticas de plantas también tienen propiedades eléctricas comunes a cualquier membrana biológica, su carga de superficie es de 8 a 30 mV conferida por los grupos polares de sus lípidos y por las porciones hidrofílicas cargadas de las proteínas transmembranales.

#### II. La ATPasa de $H^+$ de la membrana plasmática de plantas.

Entre una gran familia de proteínas membranales encontramos el grupo de las proteínas translocadoras de iones, en cuyas subclases están las proteínas acarreadoras, las bombas y los canales. Las dos primeras transportan solutos activamente y los últimos transportan solutos pasivamente. De los transportadores primarios o bombas de ATPasas del tipo P, que acoplan la

hidrólisis de ATP al transporte activo de distintos iones, podemos ubicar a la ATPasa de  $H^+$  [Palmgren 1991, Sze *et al.* 1999, Gutiérrez *et al.* 2001].

La ATPasa de  $H^+$  fue detectada por primera vez al final de la década de los setentas, aunque su existencia fue predicha antes por mediciones electrofisiológicas del potencial de membrana en *Neurospora crassa*. La ATPasa de  $H^+$  en plantas, acopla la hidrólisis de ATP (reacción exergónica) al transporte de protones a través de la MP (reacción endergónica, pues los protones se mueven en dirección contraria a su gradiente de concentración). Así, se crea una diferencia de pH ( $\Delta pH$ ) y de potencial eléctrico ( $\Delta \Psi$ ) en la MP. Ambos son requeridos para el funcionamiento de transportadores secundarios, cuya actividad por tanto es directamente dependiente de la fuerza protomotriz (Fig. 4) [Baudouin y Boutry 1995, Morsomme y Boutry 2000].



**Fig. 4. Transportadores primarios y secundarios en la MP. [tomado de Morsomme y Boutry 2000].** El gradiente electroquímico creado por la ATPasa de  $H^+$  es usado por transportadores secundarios (canales y acarreadores) para mover iones y moléculas orgánicas a través de la MP.

La ATPasa de  $H^+$  se sintetiza en el retículo endoplásmico, para posteriormente ser “empaquetada” en vesículas COP II y transportada a la MP a partir del aparato de Golgi en la levadura [Sze *et al.* 1999, Ferreira *et al.* 2001, Lefebvre 2004].

En plantas, la ATPasa de  $H^+$  participa en procesos esenciales para el crecimiento normal de la planta, como son la tolerancia a la salinidad, la regulación del pH, la expansión celular y recientemente se le ha asociado a la defensa contra patógenos [Morsomme y Boutry 2000].

### 1. Estructura

La ATPasa de  $H^+$  comprende una subunidad catalítica de aproximadamente 100 kDa, cuya secuencia de aminoácidos ha sido deducida del gen correspondiente. El análisis de la estructura secundaria predice que el polipéptido contiene de 10 a 12 cruces transmembranales.

Si bien la ATPasa de  $H^+$  de plantas no ha sido cristalizada, la información de su estructura terciaria se ha inferido gracias a la estructura cristalográfica de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  con una resolución de 2.6 Å en cristales de dos dimensiones [Toyoshima *et al.* 2000] y la de *Neurospora crassa* [Auer *et al.* 1988] con una resolución de 8 Å. Recientemente, se cristalizó la isoforma AHA2 de *A. thaliana*, con una resolución de 8 Å [Palmgren 2001]. Estos datos en acuerdo con evidencias bioquímicas, sugieren que la ATPasa de  $H^+$  de plantas tiene fracciones expuestas a ambos lados de la MP y que alrededor de un 70% está en la región citoplasmática, por tanto, una reducida parte de la proteína está expuesta a la región extracelular. La parte citosólica está dividida en 4 dominios: el dominio de activación (A) comprende la región amino terminal y la pequeña región citoplasmática entre los cruces transmembranales denominados M1 y M2; se ha propuesto que este dominio tiene una función de fosfatasa al momento de la liberación de  $PO_4^{3-}$  del residuo Asp329 (ver sección siguiente) [Serrano 1989]; el dominio de fosforilación (P), que está unido a los cruces transmembranales denominados M4 y M5 y que tiene un residuo de aspártico que se fosforila durante la catálisis; el dominio donde se une el nucleótido ATP (N) que está unido directamente al dominio P y contiene al sitio de unión a ATP (ambos dominios están comprendidos en la gran asa citosólica) y finalmente, está el dominio de regulación (R), que comprende al carboxilo terminal (se trata con detalle más adelante).

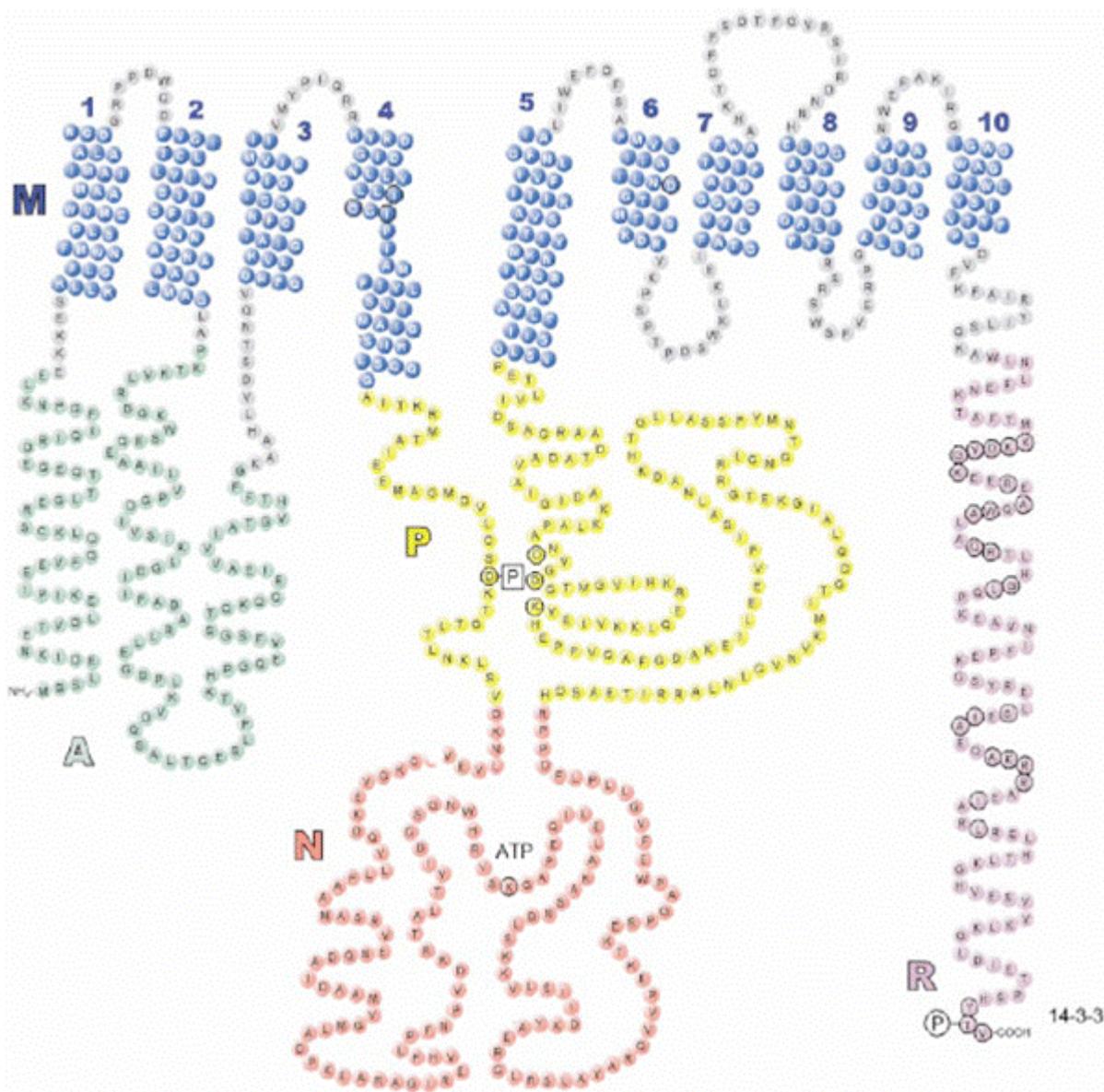
La Fig. 5 muestra la topología predicha hasta el momento para la ATPasa de  $H^+$  de la MP a partir de datos de varias especies de levaduras y una de plantas [Ambesi *et al.* 2000, Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Este modelo representa el modelo más ampliamente aceptado y está basado en los resultados de experimentos de modificación química, genética y datos cristalográficos.

La estructura cuaternaria de la ATPasa de  $H^+$  se trata con más detalle en la parte de oligomerización.

## 2. Catálisis, transporte de protones e hidrólisis de ATP.

El ciclo catalítico propuesto para la ATPasa de  $H^+$  está basado en comparaciones realizadas con las ATPasas de  $Na^+K^+$  y la de  $Ca^{2+}$  en mamíferos y en plantas se ha comparado con las dehalogenasas haloácidas. El ciclo catalítico describe la unión del protón citoplasmático y el ATP a la forma E1 de la enzima. La fosforilación del residuo Asp329 lleva a un intermediario fosforilado con el grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP. En este complejo, las cargas negativas en exceso son estabilizadas por el residuo básico Lys569 y el  $Mg^{2+}$ . Esto lleva al intermediario fosforilado altamente energético denominado E1~P; subsecuentemente una molécula de ADP es liberada junto con el  $Mg^{2+}$ . Entonces ocurre un cambio conformacional, cambiando la enzima de la conformación E1-P a la E2-P, seguida de la liberación de un protón al exterior causado por una menor afinidad de este estado fosforilado por el protón. Finalmente, el  $P_i$  es liberado por hidrólisis del enlace Asp329-P y la enzima regresa al estado E1. El proceso de transición entre el estado E2 y E1, ha sido sugerido como el paso limitante (Figs. 6 y 7), además de ser el estado E2 el que

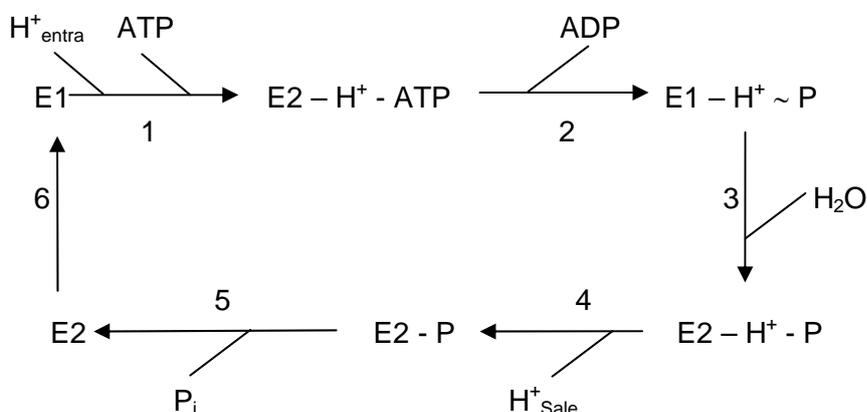
tiene una baja afinidad por el ATP y  $H^+$ , pero una alta afinidad por el inhibidor  $VO_4^{3-}$  [Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001].



**Fig. 5. Modelo de la topología de la ATPasa de  $H^+$  de la MP [modificado de Palmgren 2001].** A = Región de activación, M = Región de hélices transmembrales, N = Región de unión al nucleótido, P = Región de fosforilación, R = Región de regulación (COO<sup>-</sup> Terminal). Ver texto para más detalles.

Como se sugirió en la descripción del ciclo catalítico, el sustrato de la ATPasa de  $H^+$  es el complejo MgATP. En plantas, la  $K_m$  para el MgATP varía entre 0.3 y 1.4 mM y el pH óptimo está alrededor de 6.6. Ésto también sugiere que el pH tiene una influencia marcada en la actividad enzimática y se ha sugerido que la unión de los protones estabiliza a la forma E1 [Regenberg *et al.* 1995]. La actividad específica de la ATPasa en membranas purificadas está usualmente alrededor de 1-2  $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$  [Morsomme y Boutry 2000]. La remoción de 38 residuos del carboxilo terminal de la isoforma AHA2 de *A. thaliana*, produce una elevación en la afinidad de la

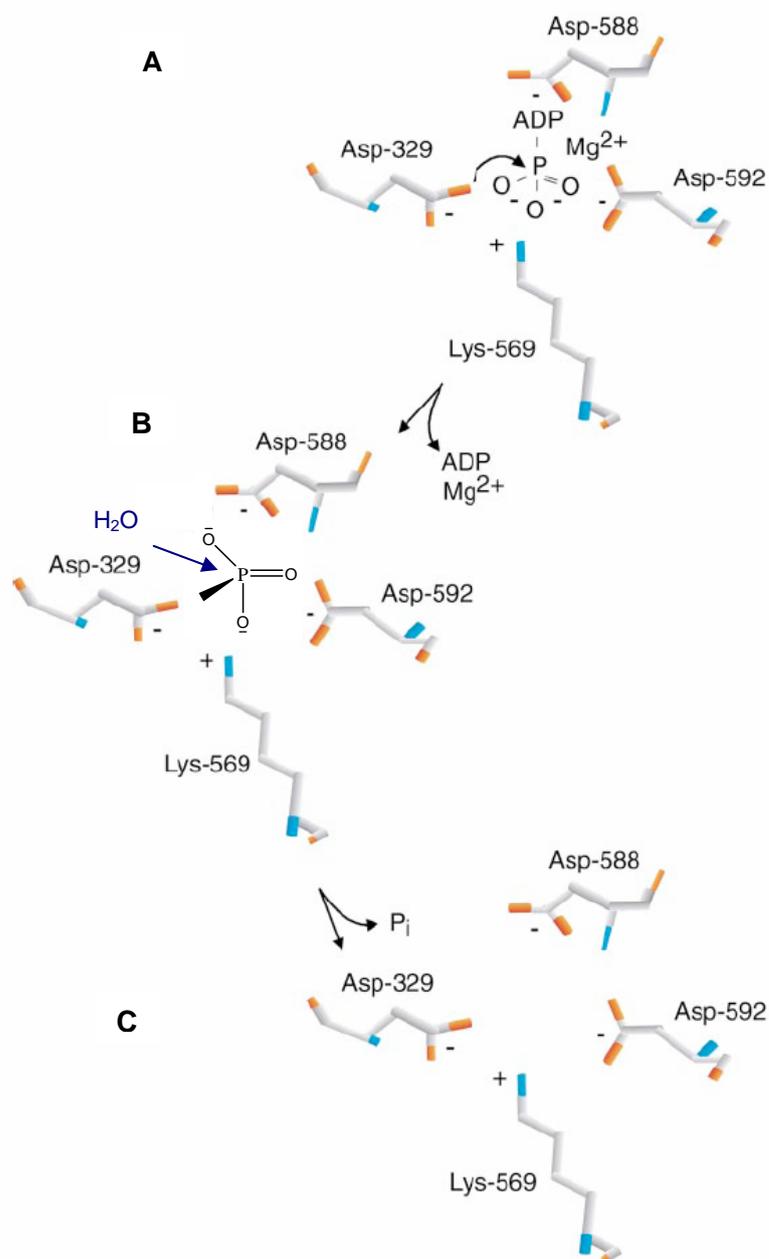
enzima por su sustrato. Este cambio se caracteriza por un cambio en el pH óptimo de 6.5 a 7.0 (a 3 mM de MgATP) y la disminución de la  $K_m$  por el ATP. Estos cambios fueron más pronunciados a pH neutro. También se reportó que la pérdida de estos 38 residuos del carboxilo terminal hacen insensible a la enzima a una activación por lisofosfatidilcolina [Regenberg *et al.* 1995].



**Fig. 6. Ciclo catalítico de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP [tomado de Morsomme y Boutry 2000].** Ciclo catalítico propuesto originalmente para la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> y que ha sido extendido a la ATPasa de H<sup>+</sup> de acuerdo al esquema de Post-Albers. E1 = Estado conformacional 1 en ciclo catalítico de la ATPasa, E2 = Estado conformacional 2 en ciclo catalítico de la ATPasa, E1-P = Estado conformacional 1 fosforilado, E2-P = Estado conformacional 2 fosforilado. Ver texto para más detalles.

En cuanto a la forma en que los protones son transportados a través de la MP, al menos dos tipos de mecanismos pueden ser descritos. Un mecanismo puede ser la conducción de protones a lo largo de un llamado "cable de protones". De acuerdo con este modelo, los protones son transportados en varios pasos discretos por una transferencia secuencial de un grupo protonable de la proteína a otro, a lo largo de toda la ruta. Una característica de este tipo de bomba de protones es que, en un ciclo catalítico de la ATPasa de H<sup>+</sup>, el protón que entra no es el mismo que sale. En general, en las bombas de protones, el transporte unidireccional a lo largo de los cables de protones ocurre por cambios conformacionales de la proteína, que se induce por cambios en los pKa de los grupos protonables [Pomes y Roux 2002, Palmgren *et al.* 2003]. El otro mecanismo propuesto propone que varios grupos se coordinan con el ión en una cavidad, con lo cual se contribuye a una especificidad por cada ión. Como resultado, sucede un cambio conformacional y el sitio es expuesto a ambos lados de la membrana debido a la formación de semicanales y, por comparación con las ATPasas de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, cuando se genera el estado E2-P, el ión es liberado [Jorgensen y Andersen 1988, Palmgren *et al.* 2003].

En la actualidad, se ha establecido la presencia de sitios de unión para los cationes en varios grupos de coordinación situados en los cruces transmembranales denominados M4, M5, M6 y M8, pero los determinantes moleculares de la especificidad iónica en la ATPasa de H<sup>+</sup> no han sido identificados [Palmgren *et al.* 2003].



**Fig. 7. Esquema propuesto para la reacción de fosforilación durante la catálisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP [tomado de Palmgren 2001]. A: Formación del intermediario aspartilfosfato. B: Hidrólisis del intermediario aspartilfosfato. C: Liberación de fosfato inorgánico.**

### 3. Papel fisiológico.

La ATPasa de H<sup>+</sup> se encuentra en todos los tejidos celulares de las plantas, sólo que no se encuentra en las mismas cantidades. Esto es debido a la función específica de cada grupo celular y su compromiso en la fisiología de la célula.

Una de las principales funciones es la elongación celular, la cual es una función fisiológica básica para el crecimiento y desarrollo de las semillas. En este caso, la ATPasa de H<sup>+</sup> provoca una acidificación del medio extracelular, incrementando la extensibilidad de la pared celular, permitiendo la entrada de agua y aumentando el volumen celular [Antipova *et al.* 2003].

Otras funciones de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la célula están relacionadas con la activación de transportadores secundarios debido a que esta enzima mantiene un  $\Delta\text{pH}$  y un  $\Delta\Psi$  entre el interior y el exterior de la MP.

El floema, que sirve para transportar nutrientes a través de grandes distancias en el interior de la planta, se ha reportado con una alta concentración de la enzima por medio de inmunodetección con anticuerpos específicos contra la ATPasa [Villalba *et al.* 1991]. Una supresión de la isoforma Pma4 en *Nicotiana plumbaginifolia*, resultó en una incapacidad para exportar azúcares de las hojas a las raíces y hojas en desarrollo [Zhao *et al.* 2000]. Gracias al bombeo de protones, la ATPasa de H<sup>+</sup> ayuda al cierre y apertura de estomas [Becker *et al.* 1993, Kinoshita y Shimazaki 1999] y a absorber nutrientes en las raíces [Parets-Soler *et al.* 1990].

Se ha demostrado que las plantas sometidas a un estrés osmótico alto responden activando a la ATPasa de H<sup>+</sup> para mediar la salida de protones y tomar del medio K<sup>+</sup>, lo que trae en consecuencia la adaptación osmótica. Así, es claro que la ATPasa de H<sup>+</sup> está implicada en varios fenómenos que tienen que ver con la turgencia de la célula [Baudouin y Boutry 1995, Sondergaard *et al.* 2004].

#### 4. Regulación

Debido a la importancia de la ATPasa de H<sup>+</sup> en el crecimiento, desarrollo, defensa y mantenimiento de la homeostasis de la célula, esta enzima está muy regulada por varios mecanismos, dependiendo del tipo de estímulo, tejido y requerimientos celulares. La actividad celular de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP de plantas se puede modificar por varios mecanismos:

##### A. Expresión de los genes de la enzima

La regulación empieza desde la transcripción. A pesar del rápido progreso en el conocimiento de las secuencias génicas de ATPasas de plantas y hongos, todavía hay muy poco conocido sobre la región promotora y los mecanismos que median la expresión a nivel genético de la ATPasa de H<sup>+</sup>. La ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP de plantas está codificada por una familia multigénica de 5 subfamilias [Palmgren 2001, Arango 2003]. En la actualidad, con el conocimiento del genoma completo de *A. thaliana*, se sabe que en esta planta hay 12 genes que contienen a la ATPasa de H<sup>+</sup> (Tabla II), cinco de los cuales han sido caracterizados a varios niveles. En *N. plumbaginifolia* se han identificado nueve genes [Perez *et al.* 1992, Moriau *et al.* 1993, Oufattole *et al.* 2000] y en *Oriza sativa* se han identificado 10 genes, de los cuales 3 han sido caracterizados [Wada *et al.* 1992, Ookura *et al.* 1994, Zhang *et al.* 1999].

El mapeo de varios transcritos de ATPasa de H<sup>+</sup> en varias especies ha revelado la presencia de 128 a 358 nucleótidos que preceden al codón de inicio AUG. Normalmente el promedio de nucleótidos antes del codón de inicio es de 40 a 80 nucleótidos en los genes de plantas. Además, un pequeño marco de lectura abierto de 3-13 codones se ha encontrado corriente arriba de la secuencia que codifica la ATPasa de H<sup>+</sup>, esta región es llamada uORF por sus siglas en inglés (upstream open reading frame). Este uORF es traducido por los ribosomas

siendo algunos de estos capaces de reiniciar el marco de lectura de la ATPasa de H<sup>+</sup> a una distancia intercistronica [Lukaszewicz *et al.* 1998]. Se sugiere que este mecanismo traduccional es responsable de las cantidades de enzima que van a ser sintetizadas [Arango *et al.* 2003].

Se tiene bien caracterizado el promotor del gen Pma1 de *Sacharomyces cerevisiae*, aunque también se han realizado amplios estudios de los genes de *A. thaliana* AHA1 y AHA2, tanto en ATPasas silvestres como en ATPasas mutantes [Portillo 2000, Jahn *et al.* 2001].

La expresión de los distintos genes no depende de la subfamilia a la cual pertenezcan, e inclusive se ha visto que dos distintos genes de ATPasa de H<sup>+</sup> se expresan en el mismo tejido. Actualmente se puede conocer información acerca de la regulación en la expresión de los genes por factores ambientales, ya sean bióticos o abióticos [<http://www.arabidopsis.org/>, <https://www.geneinvestigator.ethz.ch/>]. Se estima que la expresión de los genes aumenta cuando se requiere una gran actividad de transporte. Este es el caso cuando se somete a la planta a un estrés salino [Niu *et al.* 1993, Binzel 1995], mecánico [Oufattole *et al.* 2000] o de pH [Yan *et al.* 1998]. La regulación de los genes al nivel de transcripción soporta la hipótesis de diferentes promotores inducibles, que en consecuencia lleva a una respuesta más adaptada para el desarrollo de la planta o por el cambio en el ambiente [Arango *et al.* 2003].

### **B. Expresión diferencial de isoformas**

Se ha visto que la biogénesis de algunas isoformas de la ATPasa de H<sup>+</sup> (Pma1) es dependiente de lípidos de cadena larga [Gaigg *et al.* 2005]. Ensayos inmunológicos y de hibridación *in situ* de los RNAm indican que las isoformas de ATPasa de H<sup>+</sup> se acumulan diferencialmente en tejidos de la planta como la raíz, la epidermis y el floema, expresando diferencias en la actividad catalítica y en la regulación [Portillo 2000, Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Por ejemplo, en tabaco se ha reportado que la isoforma Pma1 se expresa en múltiples tejidos dentro de los que se encuentran incluso las células guarda de la epidermis [Sze *et al.* 1999]. Las propiedades funcionales de isoformas individuales han sido determinadas expresando genes AHA en levadura. En general, las propiedades cinéticas son similares, pero varían en su afinidad por el ATP. Las isoformas AHA1 y AHA2 tienen una afinidad diez veces mayor por el ATP (Km = 0.15 mM) que la isoforma AHA3 (Km = 1.5 mM) [Palmgren y Christensen 1994].

### **C. Región auto-inhibitoria del COO<sup>-</sup> terminal.**

El concepto de la región auto-inhibitoria del COO<sup>-</sup> terminal, surgió del estudio del efecto de la glucosa en la ATPasa de H<sup>+</sup> de levadura. Cuando las células de levadura eran incubadas en glucosa, la Km para el ATP disminuía, la V<sub>max</sub> se incrementaba, el pH óptimo cambiaba a uno más alcalino y la sensibilidad al vanadato se incrementaba. Estos efectos eran minimizados quitando los 11 residuos en la región del carboxilo terminal [Morsomme y Boutry 2000]. También, se ha reportado que en la secuencia de aminoácidos del carboxilo terminal de la levadura *S. cerevisiae*, hay dos puntos de regulación en este dominio. Uno, definido por los aminoácidos Arg-909 y Thr-

912, que son esenciales para el cambio de  $V_{\max}$  producido por la activación de la ATPasa, mientras que el otro sitio está definido por Ser-899 y Glu-901 y es necesario para el cambio de la  $K_m$  [Olsson *et al.* 1995, Portillo 2000]. Por tanto, bajo situaciones basales, el carboxilo terminal interactúa con el sitio catalítico de la enzima inhibiendo la actividad de la enzima. La actividad de la enzima se restablece cuando hay una fosforilación por una cinasa de serina o de treonina en el aminoácido Thr-948 [Olsson *et al.* 1998]. Se ha reportado también que la luz azul activa la fosforilación de la ATPasa por una cinasa de serina/treonina activando el bombeo de protones induciendo la apertura de las células guarda [Kinoshita y Shimazaki 1999].

La fosforilación es la señal para que la proteína 14-3-3 se una al carboxilo terminal y éste se separe del sitio catalítico, aumentando la actividad de la ATPasa de  $H^+$  [Sze *et al.* 1999].

Así, la región carboxilo terminal de la ATPasa de  $H^+$  tiene un efecto regulatorio negativo (Fig. 8), lo cual se ha determinado truncando sistemáticamente la región [Regenberg *et al.* 1995]. Pero como se mencionó con anterioridad, éste no es el único lugar donde se regula la enzima, se han descubierto también puntos de regulación en la región del amino terminal, en el primero de los cuatro puntos que están embebidos en la MP y en el dominio más grande que se encuentra en el citosol [Portillo 2000].

#### **D. Asociación con la proteína 14-3-3.**

En años recientes se ha encontrado que las proteínas 14-3-3, un grupo de proteínas altamente conservadas en organismos eucariontes, regulan muchos blancos celulares. Las proteínas 14-3-3 fueron inicialmente descritas como proteínas ácidas y abundantes en cerebro. Su denominación se deriva del número de fracción en cromatografía DEAE en celulosa y su migración en una subsiguiente electroforesis en geles de almidón. Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia grande de proteínas homólogas codificadas por genes separados. Las proteínas 14-3-3 existen en su mayoría como dímeros cuyos monómeros tienen un peso de 30 kDa [Fu *et al.* 2000]. Cada monómero contiene dominios que pueden unir a una  $\alpha$ -hélice de una proteína blanco. Un requerimiento para que las proteínas 14-3-3 se unan es por medio de una fosforilación previa de la proteína blanco [Morsomme y Boutry 2000].

Debido a que las proteínas 14-3-3 están involucradas en interacciones proteína-proteína, se ha sugerido que están involucradas en respuestas de estrés en plantas. Este papel se ha inferido del potencial para regular tanto rutas de señalización como proteínas involucradas en respuestas finales. Las proteínas 14-3-3 pueden operar en respuesta a estrés a través de muchos mecanismos. Por tanto, ellas pueden regular la actividad de proteínas individuales que tengan funciones de señalización o de defensa. Alternativamente, pueden participar en la formación de complejos multiproteicos por su habilidad de actuar como adaptadores. También pueden regular la expresión de genes inducidos por el estrés, modificando la actividad y/o localización de factores de transcripción. Como las proteínas 14-3-3 requieren de una fosforilación previa en una secuencia específica de unión, las interacciones reguladoras están mediadas en muchos casos

por la activación de rutas de señalización que resultan en una fosforilación de proteínas [Fu *et al.* 2000].

**Tabla II. Familia génica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP en *Arabidopsis thaliana* [tomado de Palmgren 2001].**

Número de acceso	Nombre del gen	Localización cromosomal (Centimorgans) <sup>a</sup>	Peso molecular <sup>b</sup>	pl	Tamaño (no. aminoácidos)
P20649 <sup>c</sup> /AC003673 <sup>d</sup>	AHA1/At2g18960	2; 35	104313	6.3	949
P19456/AL161576	AHA2/At4g30190	4; 81	104401	6.5	948
P20431/AB019233	AHA3/At5g57350	5; 114	104449	6.7	949
Q9SU58/AL049658	AHA4/At3g47950	3; 65	105679	6.1	960
Q9SJB3/AC006954	AHA5/At2g24520	2; 39	104739	6.8	949
Q9SH76/AC007662	AHA6/At2g07560	2; 19	105012	5.8	949
Q9LY32/AL163852	AHA7/At3g60330	3; 78	105520	6.4	961
Q9M2A0/AL138640	AHA8/At3g42640	3; 53	104131	5.5	948
Q42556/AC011713	AHA9/At1g80660	1; 124	105208	6.0	954
Q43128/S74033 <sup>e</sup>	AHA10/At1g17260	1; 23	104815	6.0	947
Q9LV11/AB020751	AHA11/At5g62670	5; 119	105123	6.1	956
Q9T0E0/AL049500 <sup>f</sup>	AHA12/At4g11730	4; 40	90439	6.4	813

<sup>a</sup> Distancia genética al marcador más cercano en el mapa genético de *A. thaliana* [<http://www.arabidopsis.org>]

<sup>b</sup> Peso molecular calculado

<sup>c</sup> Número de acceso de la base de datos SWISS-PROT

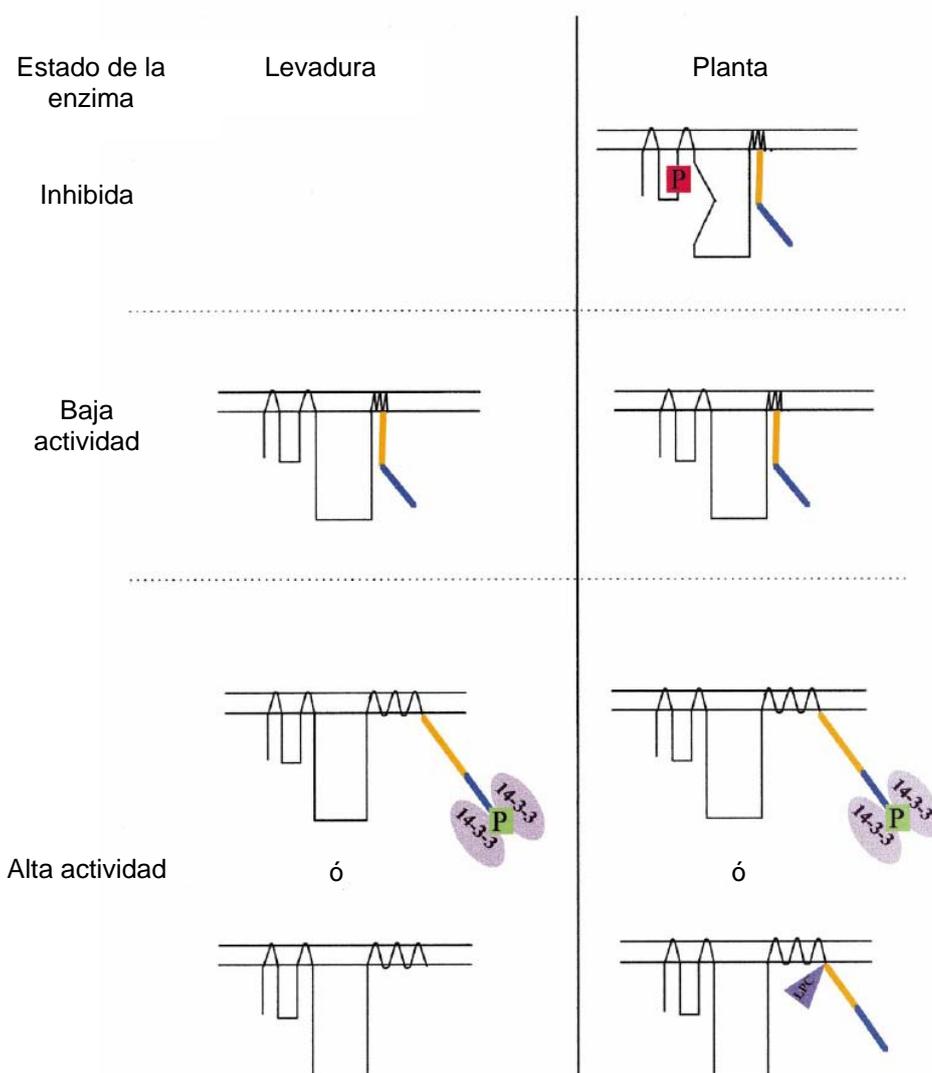
<sup>d</sup> Número de acceso de la base de datos de EMBL/GenBank/DDBJ

<sup>e</sup> La secuencia original de la proteína está derivada parcialmente de datos de DNA genómico

<sup>f</sup> Esta secuencia no es típica y están perdidos 100 aminoácidos de un área conservada y el carboxilo terminal parece estar perdido también. En su forma actual no puede ser una ATPasa activa, pero puede ser un pseudo gene o tener otra función en la célula.

La proteína 14-3-3 activa la ATPasa de H<sup>+</sup> por medio de su interacción con el dominio carboxilo terminal en los motivos arginina-serina-x-Pserina-x-prolina (donde x puede ser cualquier otro aminoácido y Pserina es una serina fosforilada) y tirosina-treonina-valina de la ATPasa [Fuglsang *et al.* 2003]. Un ejemplo de este fenómeno es el de plantas sometidas a un estrés abiótico y en donde a condiciones de baja temperatura y alta osmolaridad, las proteínas 14-3-3 interactúan con el sitio auto-inhibitorio del carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, activando el bombeo de protones que es crucial en el sistema protector que las plantas han desarrollado contra las influencias adversas provenientes del exterior [Borch *et al.* 2002, Roberts *et al.* 2002]

Se ha visto también que el tratamiento de tejidos de plantas con la toxina fusicoccina producida por el hongo *Fusicoccum amygdali*, la cual produce una gran estimulación en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , trae concomitantemente un marcado incremento en la asociación de las proteínas 14-3-3 con la ATPasa de  $H^+$ . Se ha descrito que la fusicoccina estabiliza el complejo ATPasa de  $H^+$ /14-3-3 [Olsson *et al.* 1998, Schaller y Oecking 1999, Morsomme y Boutry 2000]. En la Fig. 8 se muestran las distintas formas de regulación para la ATPasa tanto de plantas como de levaduras [Morsomme y Boutry 2000].



**Fig.8. Modelo de regulación para la ATPasa de  $H^+$  de la MP. [tomado de Morsomme y Boutry 2000].**

La barra anaranjada representa una región del carboxilo terminal con un dominio que se une al resto de la enzima y la inhibe. Dominio al cual se une la proteína 14-3-3 después de la fosforilación (barra azul). El cuadro verde representa la penúltima treonina que es fosforilada. El cuadro rojo representa un sitio de fosforilación que no ha sido bien localizado, pero cuya existencia se supone por varios experimentos en plantas. El triángulo representa la unión de la lisofosfatidilcolina.

### E. Influencia de los lípidos membranales

En décadas pasadas, los lípidos se consideraban impurezas a ser removidas para poder estudiar una proteína membranal de interés en un ambiente bioquímico homogéneo. Sin embargo, este criterio ha cambiado, ya que se ha establecido que las proteínas membranales tienen un óptimo desempeño cuando están inmersas en su ambiente lipídico nativo [Gouaux y White 2001].

Además, en los últimos años, se ha sugerido que los cambios locales o temporales en la composición lipídica son potentes reguladores de los procesos celulares. Por tanto, la composición lipídica de la MP afecta claramente la estructura y la función de sus proteínas [Dowhan *et al.* 2004]. En la actualidad, hay varios ejemplos en la literatura sobre la relación de las proteínas membranales con su entorno lipídico, y que tan necesario es éste para la función correcta de las proteínas. Por ejemplo, la permeasa del ácido  $\gamma$ -aminobutírico de la MP de *E. coli*, se afecta tanto en su topología como en su cinética, por perturbaciones en los lípidos aledaños. Los lípidos que están involucrados en la organización de los dominios transmembranales de la permeasa del ácido  $\gamma$ -aminobutírico son la fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol [Zhang *et al.* 2005]. Por tanto, las proteínas membranales dependen de lípidos específicos desde su formación en el retículo endoplásmico, su ensamblaje correcto y envío posterior a su destino final, hasta su función y desempeño óptimo en el ambiente membranal. Resulta lógico que cualquier alteración en el ambiente lipídico va en detrimento de la actividad que realice la proteína [Chung *et al.* 2003, Barrantes 2004, Cohen *et al.* 2005].

Así, se ha acumulado la evidencia acerca de la interacción de lípidos con proteínas en los ambientes membranales y ha sugerido el concepto de que los lípidos son componentes integrales en la estructura de las proteínas, que ayudan en su conformación, su función e inclusión en balsas lipídicas, entre otros [Fantini 2003].

La ATPasa de  $H^+$  de la MP de plantas existe *in situ* en un ambiente lipídico consistente en glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides. Por tanto, se ha asumido que un ambiente específico de lípidos es requerido para su óptimo desempeño. Se han hecho varias pruebas para determinar los requerimientos lipídicos de la enzima [Cocucci y Marrè 1984, Brauer y Tu 1989], varios de los cuales van desde deslipidar selectivamente la enzima [Sandstrom y Cleland 1989], modificar el ambiente lipídico realizando una purificación de la enzima y reconstituyéndola nuevamente de manera selectiva para ver como cada uno de los componentes del ambiente influye en su actividad [Brauer y Tu 1989], o modificando el ambiente sometiendo a la enzima a varios detergentes los cuales restauran su actividad [Briskin y Poole 1983, Briskin y Niesman-Reynolds 1989]. En la mayoría de los casos se ha encontrado que los fosfolípidos restauran parcialmente la actividad de la enzima. La lisofosfatidilcolina estimula a la ATPasa de  $H^+$  uniéndose a sitios diferentes provocando cambios conformacionales que llevan a estados de alta o baja afinidad por el ATP [Gomès *et al.* 1996].

El estigmasterol estimula positivamente a la enzima, mientras que los demás esteroides muestran inhibición a cualquier concentración. En ambientes reconstituídos, la enzima purificada y sometida al detergente tritón X-100 presenta un aumento en la actividad de la enzima [Sandstrom y Cleland 1989, Ryyppö *et al.* 1994, Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997].

### **5. Oligomerización**

Como se mencionó en la sección de estructura de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP, ésta se compone de un polipéptido de 100 kDa. Se desconoce con certeza si la proteína puede formar algún tipo de arreglo oligomérico en la membrana. Se han utilizado estrategias diferentes para determinar el arreglo de la enzima. En uno de ellos se irradió a la enzima con diferentes dosis de rayos  $\gamma$  de alta energía y después se analizó el decremento en la actividad de la ATPasa al aumentar la dosis de irradiación total. El peso molecular estimado para la ATPasa de raíces de betabel fue de 225 kDa, sugiriendo que la enzima puede ser un dímero. Por otro lado, se añadieron agentes entrecruzadores a la enzima y se determinó un peso molecular de 336 kDa, lo que supone un probable arreglo trimérico de ésta [Briskin *et al.* 1985, Briskin y Niesman-Reynolds 1989].

Los diferentes estados de asociación pueden relacionarse con diferentes niveles de actividad de la enzima. Estas evidencias se derivan de estudios cinéticos. Aunque la mayoría de los estudios sobre la actividad de la enzima reportan una cinética michaeliana, se ha reportado que la cinética puede presentar curvas de actividad con cooperatividad positiva o negativa [Gutierrez *et al.* 2005]. Sin embargo, es probable que los detergentes y los lípidos que se utilizan en la solubilización y reconstitución de la ATPasa de H<sup>+</sup> puedan propiciar su oligomerización y, por tanto, resulta difícil determinar si fisiológicamente la ATPasa presenta un arreglo oligomérico, de qué tipo es éste, y a qué grado de actividad corresponde [Ramos *et al.* 1994, Roberts *et al.* 1995, Roberts y Beaugé 1997]. En años recientes, se ha determinado que la ATPasa de H<sup>+</sup> presenta un arreglo de hexámero cuando se fosforila [Kanczewska *et al.* 2005] y también se ha determinado que la biosíntesis de ceramida es necesaria para formar complejos oligoméricos de la ATPasa de H<sup>+</sup>, cuando es sintetizada en el retículo endoplásmico de levadura [Lee *et al.* 2002].

### **6. Compuestos que afectan la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>**

La actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP de plantas se puede modificar por diferentes factores químicos, entre ellos se encuentran los fitoreguladores y ciertas sustancias secretadas por microorganismos. Algunos factores y compuestos que tienen acción sobre la ATPasa de H<sup>+</sup>, son:

#### **A. Fitorreguladores.**

La comunicación intracelular en las plantas superiores está mediada por mensajeros químicos llamados fitorreguladores. Existen diferentes sustancias reguladoras de las plantas que son:

a) Auxinas. Fueron las primeras en ser descubiertas. Son sintetizadas en el tallo y las raíces. Se caracterizan por su capacidad de estimular la elongación celular, pero también tienen influencia sobre diferenciación vascular, desarrollo de flores y frutas entre otros. Las auxinas estimulan a la ATPasa de  $H^+$  acidificando el medio externo, provocando expansión celular, toma de nutrientes, activación de transportadores secundarios dependientes del flujo de protones, entre otros [Hopkins 1995, Tanimoto 2005].

b) Giberelinas: Son producidas por plantas y hongos. La aplicación exógena de giberelinas causa la hiperelongación de los de tallos intactos. Las giberelinas también se ven involucradas en la germinación de semillas y la movilización de las reservas del endospermo durante los primeros estadios de crecimiento embrionario. También se relacionan con el desarrollo de flores y frutos. Se considera que las giberelinas regulan positivamente a la ATPasa de  $H^+$ , pero no de manera directa, más bien es en consecuencia de las auxinas que intervienen en su acción con esta enzima [Hopkins 1995, Frías *et al.* 1996, Tanimoto 2005].

c) Ácido abscísico. Está involucrado en la regulación de la germinación de semillas, induciendo la síntesis de proteínas y modulando el estrés por agua [Hopkins 1995]. Se ha reportado que el ácido abscísico tiene una influencia negativa sobre la actividad de la ATPasa de  $H^+$  previniendo la toma de agua en ejes de semillas de *Aesculus hippocastanum* L. [Obroucheva y Antipova 2004].

### **B. Evocadores.**

Son moléculas producidas por el ataque de un patógeno y que pueden provenir de éste o de la planta. El reconocimiento de estos compuestos va seguido de una cascada de transducción de señales que resulta en la activación de genes de defensa y en la expresión de la resistencia a la enfermedad en el huésped. Un ejemplo es el hongo patógeno *Cladosporium fulvum*, el cual produce compuestos que actúan sobre cinasas que fosforilan a la ATPasa de  $H^+$  incrementando la actividad de la enzima y un subsecuente cambio en la acidificación extracelular, lo cual podría contribuir a la infección de la planta [Vera-Estrella *et al.* 1994]. Otros compuestos reportados que tienen algún efecto sobre la ATPasa de  $H^+$  son: la siringomicina, que estimula su fosforilación en betabel [Suzuki *et al.* 1992] y el omeprazol, que es un fungicida que inhibe la actividad de esta enzima provocando muerte celular [Monk *et al.* 1995, Seto-Young *et al.* 1997].

### **C. Toxinas fúngicas.**

Hay varias toxinas producidas por hongos que afectan la actividad de la enzima. Se mencionan las más importantes a continuación:

a) La beticolina 1 es producida por *Cercospora beticola* y que produce un aumento en la elongación de las raíces de maíz. Esta toxina inhibe el bombeo de  $H^+$  y despolariza el potencial de membrana. La beticolina 1 afecta a la ATPasa de  $H^+$  a través de la inhibición de la formación del intermediario fosforilado de una manera competitiva, si bien este mecanismo puede cambiar dependiendo del entorno lipídico [Simón-Plas *et al.* 1996].

b) La toxina más estudiada en la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática es la fusicoccina. Esta toxina, producida por el hongo *F. amygdali*, que es un hongo específico del árbol de almendras y de duraznos, afecta la fisiología y la bioquímica de la célula de plantas, estimula la elongación celular, la apertura de estomas, y afecta al transporte de solutos y la regulación del pH intracelular [Marrè 1979]. Esta toxina se ha utilizado ampliamente en la caracterización de la ATPasa de  $H^+$  y, sobre todo, gracias a esta toxina se encontró la interacción entre la ATPasa de  $H^+$  y la proteína que la regula, que es la proteína 14-3-3 [Marra *et al.* 1994]. La activación de la ATPasa de  $H^+$  por la fusicoccina se ha estudiado muy bien por su interacción con la proteína 14-3-3, la cual aparentemente contribuye a la estabilización del complejo ATPasa de  $H^+$ /14-3-3 [Fuglsang *et al.* 2003].

c) Una toxina muy importante para este estudio en particular es la FB1. La FB1 es una toxina producida por el hongo *F. verticillioides* y otras especies de *Fusarium*, las cuales son patógenos del maíz. Esta toxina produce blanqueamiento de las hojas, pérdida de electrolitos y autólisis celular en hojas de *Datura stramonium* y en *Lemna pausicostata* [Abbas *et al.* 1992, Abbas *et al.* 1998], además causa disminución en el crecimiento del callo de maíz. La FB1 es un potente inhibidor de la enzima SAT, una enzima que se encuentra en el retículo endoplásmico, por lo que se inhibe la biosíntesis de ceramida y se acumulan bases esfingoides como esfinganina y fitoesfingosina. Por su naturaleza anfipática, la FB1 promueve cambios en la fluidez y lipoperoxidación en liposomas y en células animales, donde ha sido ampliamente estudiada [Abado-Becognee *et al.* 1998, Yin *et al.* 1998, Ferrante *et al.* 2002].

## **7. Relación de la ATPasa de $H^+$ en la interacción con patógenos.**

Dada la importancia de la ATPasa de  $H^+$  MP en la fisiología de la célula, se han realizado estudios sobre el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima. La naturaleza de los compuestos producidos por los patógenos estudiados es variable, tanto en reactividad química como en estructura, por lo que los efectos sobre la enzima pueden explicarse de varias maneras:

### **A. Una unión directa del compuesto a la enzima.**

Los principales estudios relacionados con la interacción de la enzima y un compuesto proveniente de un patógeno están enfocados principalmente a la interacción de la fusicoccina y la estabilización del complejo que se forma entre la ATPasa de  $H^+$  y la proteína 14-3-3 [Marra *et al.* 1996, Fuglsang *et al.* 2003]. Como se mencionó antes, la proteína 14-3-3 interactúa con la región carboxilo terminal de ATPasa de  $H^+$  previa fosforilación del mismo. La fusicoccina entonces se une al complejo, evitando que éste se disocie y manteniendo por tanto una actividad alta y constante de la ATPasa de  $H^+$ , teniendo una gran influencia en la fisiología de la planta [Olivari *et al.* 1998, Roberts y Bowles 1999, Kanczewska *et al.* 2005].

**B. La unión del compuesto a un receptor específico localizado en la membrana o en el citoplasma, que podría directamente interactuar con la enzima o bien a través de un mecanismo de transducción de señales.**

Se ha propuesto que la fusicoccina también está involucrada en la regulación de las proteínas 14-3-3, ya que al someter a células de *Acer pseudoplatanus* L. a fusicoccina había un incremento en los niveles de 14-3-3 en el citosol [Maleaba *et al.* 2004], lo cual indica que no sólo estabiliza de manera directa el complejo, sino también interviene en los niveles de proteínas reguladoras de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>.

Por otro lado, el reconocimiento de evocadores micóticos por la MP del hospedero es considerado como uno de los primeros eventos que llevan a la activación de mecanismos de defensa. Se ha reportado que el producto del gen de avirulencia del hongo *C. fulvum* desencadena una cascada de respuesta que activa una cinasa de serina/treonina que fosforila a la ATPasa de H<sup>+</sup> de tomate provocando una respuesta de defensa [Xing *et al.* 1996]. En raíz de maíz se encontró que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP está regulada por una fosforilación dependiente de calcio, donde la fosforilación de la enzima resultó en una inhibición tanto de la actividad hidrolítica como del bombeo de protones [De-Nisi *et al.* 1999].

Por lo tanto, inmediatamente después de que suceden los procesos de reconocimiento del patógeno, las vías de transducción de señales activan enzimas asociadas a la MP. Esta evidencia sugiere que estas vías pueden implicar la activación de proteínas G heterotriméricas y fosfatasa unidas a la membrana que subsecuentemente regulan la activación de H<sup>+</sup>-ATPasas y canales de Ca<sup>2+</sup>. El incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol inicia la activación de un número de cinasas de proteína que inducen una serie de respuestas de defensa (tales como el estrés oxidativo, síntesis de callosa y activación de H<sup>+</sup>-ATPasas) y son responsables de la resolución espacial y temporal de la respuesta de defensa [Blumwald *et al.* 1998].

**C. A través de la interacción con los lípidos u otro componente de la membrana que pueden cambiar la conformación de la enzima.**

Aquí cabe señalar la importancia de la FB1, ya que es una de las toxinas más ampliamente estudiadas y que se ha empleado en años recientes como herramienta para modificar el metabolismo de esfingolípidos [Merrill *et al.* 1997]. Se encontró que cuando se inhibe la biosíntesis de esfingolípidos por la FB1 se modifica el destino proteico de la ATPasa de H<sup>+</sup> (Pma1p) de la MP de levadura [Lee *et al.* 2002, Gaigg *et al.* 2005]. Aunque no hay un reporte en plantas donde se haya visto lo mismo que en levaduras, reportes recientes en plantas han encontrado que la ATPasa de H<sup>+</sup> esta en balsas lipídicas [Mongrand *et al.* 2004, Shaollari *et al.* 2004, Borner *et al.* 2005]. En nuestro laboratorio se ha encontrado que cuando se modifica el metabolismo de esfingolípidos a través del uso de la FB1, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP de embriones de maíz se inhibe en un 30% [Gutiérrez 2005]. Esto nos lleva a suponer que existe una relación estrecha entre los esfingolípidos y la ATPasa de H<sup>+</sup>, ya que pueden estar

relacionados directamente con el ambiente lipídico de esta enzima, promoviendo cambios en su conformación.

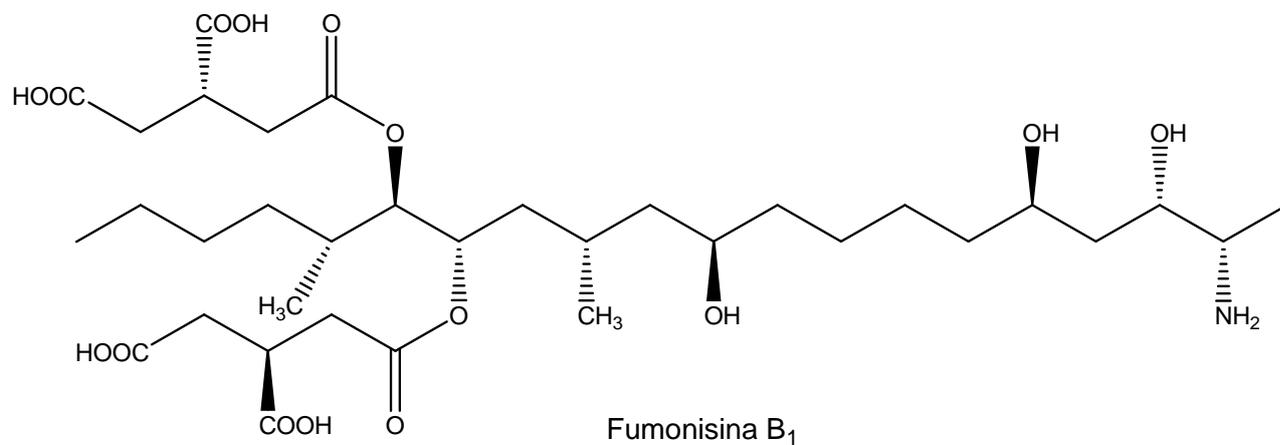


Fig. 9. Estructura de la FB1.

## HIPÓTESIS

La baja actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> por una disminución en ceramida endógena se explica por:

- a) un decremento en la incorporación de la enzima en la membrana plasmática o
- b) una disminución en la asociación de la proteína 14-3-3 a la enzima o
- c) una perturbación en la interacción esfingolípido-proteína o esfingolípido-esterol-proteína.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar varias posibles causas por las cuales la ceramida endógena se requiere para producir una ATPasa de H<sup>+</sup> con actividad completa.

### Objetivos particulares

1. Obtener membranas plasmáticas de embriones expuestos a FB1, FB1 + Ceramida C<sub>6</sub>, FB1 + Ceramida C<sub>16</sub> o Ceramida C<sub>16</sub>.
2. Determinar los niveles de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en las condiciones anteriores.
3. Establecer las condiciones necesarias para detectar a la ATPasa de H<sup>+</sup> y la proteína 14-3-3 con anticuerpos específicos.
4. Determinar los niveles de la ATPasa de H<sup>+</sup> en las membranas plasmáticas de embriones expuestos FB1, FB1 + Ceramida C<sub>6</sub>.
5. Determinar los niveles de proteína 14-3-3 en las membranas plasmáticas de embriones expuestos a FB1, FB1 + Ceramida C<sub>6</sub>.
6. Determinar el efecto del secuestro de esteroides endógenos en la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de embriones expuestos a FB1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Reactivos

Los reactivos químicos usados fueron de alto grado de pureza. Se utilizó FB1, Ceramida C<sub>6</sub> (N-hexanoil-D-esfingosina), Ceramida C<sub>16</sub> (N-palmitoil-D-esfinganina), metil-β-ciclodextrina, Anticuerpo contra la 14-3-3 isoforma β de humano (K-19, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de betabel obsequiado por el Dr. Luís E. González de la Vara (CINVESTAV, Irapuato). Membrana de PVDF Immobilon-P con tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore).

### II. Material biológico

Los embriones utilizados fueron disectados de semillas secas y maduras (*Zea mays* raza criolla Chalqueño) utilizando un bisturí o navaja y removiendo el endospermo. La integridad de los embriones se reflejó en una germinación del 95% de los embriones a las 24 h.

### III. Imbibición de los embriones de semillas de *Zea mays* (variedad criolla Chalqueño).

Los embriones fueron desinfectados con una disolución de hipoclorito de sodio (a partir de hipoclorito de sodio comercial con una concentración de cloro activo al 6% y diluyéndo 1:10) en agitación constante durante dos min y tres posteriores lavados con agua desionizada, también por un periodo de dos min cada uno. La imbibición de los embriones fue llevada a cabo en cajas petri de 10 cm de diámetro con medio de imbibición y dependiendo de la condición se agregó FB1 o Ceramida C<sub>16</sub> (CerC<sub>16</sub>) o FB1 + Ceramida C<sub>6</sub> (CerC<sub>6</sub>) o FB1 + CerC<sub>16</sub>. La composición del medio de imbibición se muestra en la Tabla III. Los embriones se incubaron posteriormente a 29 °C por un periodo de 24 h, al término del cual se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron en refrigeración a -70 °C hasta su uso.

**Tabla III. Composición de amortiguadores para la obtención y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz.**

Amortiguador	Composición
De imbibición	KCl 50 mM, Tris 50 mM pH 7.6, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, sacarosa al 2%
De homogenización	Sorbitol 250 mM, Hepes/BTP 50 mM pH 7.8, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, y cocktail de inhibidores de proteasas 1.6 mg/mL
De ajuste de peso y resuspensión	Sorbitol 620 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM, KCl 5 mM, DTT 1 mM
De lavado	Sorbitol 350 mM, Hepes/Mes 2 mM pH 7.6, DTT 1 mM, KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas 1.6 mg/mL

#### IV. Aislamiento y purificación de VMP de *Zea mays* (variedad criolla Chalqueño)

##### 1. Obtención de la fracción microsomal

Se pesaron los embriones y se añadió amortiguador de homogenización en una relación 2/1 p/v. Se molieron los embriones en licuadora durante 15 seg. Se filtró el homogenado por 4 capas de gasa y se vertió en tubos de centrifuga en los cuales se centrifugó a 3,000 rpm en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4 °C durante 10 min. Al término se tomó el sobrenadante (eliminándose la capa superior) y se vertió nuevamente en tubos para centrifuga, en los cuales se centrifugó a 11,000 rpm en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4 °C durante 10 min. Se eliminó nuevamente la capa superior y se tomó el sobrenadante, vertiéndose esta vez en tubos para ultracentrífuga. Se centrifugó el sobrenadante a 45,000 rpm ultracentrífuga Beckman utilizando el rotor 60 Ti a 4 °C durante 75 min. Una vez finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador de ajuste de peso (ver Tabla III). Una vez resuspendido el botón, se determinó la cantidad de proteína [Peterson 1977].

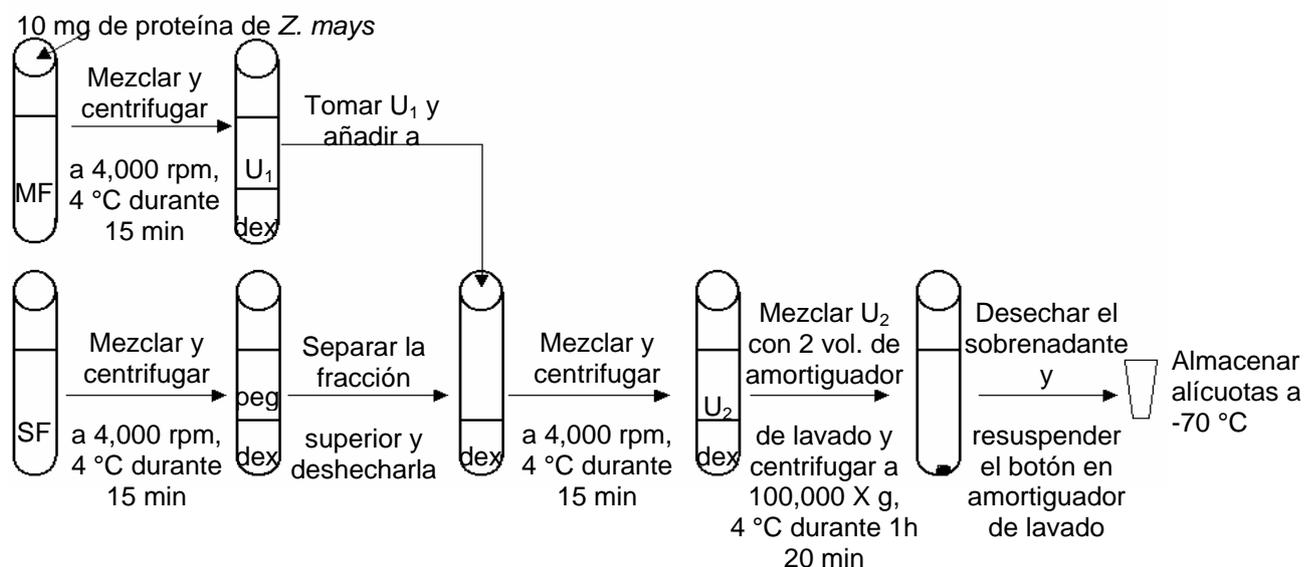
**Tabla IV. Composición de la mezcla de fases y del sistema de fases para la purificación de MP a partir de la fracción microsomal obtenida de embriones de maíz.**

Reactivo	Mezcla de fases y sistema de fases (concentración final)
Dextran	6.5%
Peg	6.5%
Sorbitol	620 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 Mm
KCL	5 mM
DTT	5 Mm
EDTA	0.1 Mm

##### 2. Obtención de VMP

Se cargaron 10 mg de proteína microsomal a cada fase de acuerdo al método de partición de fases (Briskin et al. 1987, Larsson et al. 1994). La composición tanto de la mezcla de fases como del sistema de fases se muestra en la Tabla IV. Una vez vertida la proteína a los tubos con la mezcla de fases, se mezcló por inversión 25 veces y se centrifugó a 4,000 rpm en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad a 4 °C durante 15 min. Se removió la fase superior de los tubos con sistema de fases previamente pesados. Una vez finalizada la centrifugación de los tubos con la mezcla de fases, se tomó la fase superior y se procedió a ajustar con ésta el peso de los tubos con sistema de fases al que previamente se le removió esta parte. Ajustado el peso del sistema de fases, se centrifugó a 4,000 rpm en microfuga refrigerada Jouan MR1812, utilizando el rotor para tubos de Nalgene de

50 mL de capacidad a 4 °C durante 15 min. Terminada la centrifugación se recuperó la fase superior y se vertió en tubos de ultracentrífuga. Se centrifugó entonces a 45,000 rpm ultracentrífuga Beckman utilizando el rotor 60 Ti a 4 °C durante 75 min. Finalizada la centrifugación, se procedió a decantar el sobrenadante. El botón del fondo se resuspendió en amortiguador de lavado (ver Tabla III) y se determinó la cantidad de proteína.



**Fig. 10. Procedimiento de purificación de las VMP.** MF: mezcla de fases, SF: sistema de fases, U<sub>1</sub>: fase superior uno, U<sub>2</sub>: fase superior dos, dex: dextran, peg: polietilenglicol.

#### V. Ensayo de hidrólisis de ATP [González-Romo *et al.* 1992].

La hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de plantas se midió utilizando 150 µL de medio de hidrólisis que contenía: 250 mM de sacarosa ajustada con 20 mM de PIPES a pH 6.5, 7 µM de CCCP, Brij 58 al 0.015%, ATP 10 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Se añadieron 5 µg de proteína membranal e iniciando en ese momento la incubación del medio de reacción por 30 min en un baño a 29 °C. Una vez terminada la incubación, se detuvo la hidrólisis añadiendo SDS al 24%. Después se adicionó el reactivo B/C (3.4% de ácido ascórbico en HCl 1 N y 0.6% de molibdato de amonio). Tres minutos después se adicionó el reactivo "E", cuya composición se muestra en la Tabla V. Se midieron las absorbencias a 850 nm después de 20 min de haberse desarrollado el color.

**Tabla V. Composición y concentración final del reactivo E para la hidrólisis de ATP.**

Reactivo	Concentración final
Ácido acético	0.9 %
Metarsenito de sodio	0.9 %
Citrato de sodio	0.9 %

A todas las muestras se les realizó una medición por triplicado en cada tratamiento con distintos inhibidores (ortovanadato de sodio 0.2 mM, nitrato de potasio 1 mM y molibdato de sodio 2 mM). Para poder determinar la cantidad de fosfato inorgánico liberado se preparó una curva patrón con  $K_2HPO_4$  (utilizando una disolución patrón de 1 mM).

#### **VI. Efecto de la Metil- $\beta$ -ciclodextrina (M- $\beta$ -CD).**

En los ensayos con M- $\beta$ -CD para ver efecto de este compuesto en la hidrólisis de ATP por parte de la ATPasa de  $H^+$  de MP en VMP control y distintos tratamientos a los que fueron sometidas las VMP, se utilizaron 150  $\mu$ L de medio de hidrólisis con 250 mM de sacarosa ajustada con 20 mM de PIPES a pH 6.5, 7  $\mu$ M de CCCP, Brij 58 al 0.015%, ATP 10 mM,  $MgCl_2$  10 mM y variando las concentraciones de M- $\beta$ -CD desde 0.5 mM hasta 10 mM. Se añadieron 5  $\mu$ g de proteína membranal y se inició en ese momento la incubación del medio de reacción por 25 min en un baño a 29 °C. Una vez terminada la incubación, se detuvo la hidrólisis añadiendo SDS al 24%. Después se adicionó el reactivo B/C (3.4% de ácido ascórbico en HCl 1 N y 0.6% de molibdato de amonio). Tres min después se adicionó el reactivo "E", cuya composición se muestra en la Tabla V. Se midieron las absorbencias a 850 nm después de 20 min de haberse desarrollado el color.

#### **VII. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes [Schägger y von Jagow 1987].**

##### **1. Equipo y material necesario**

- A. Equipo para electroforesis Mini-protean II de Bio-Rad para minigeles.
- B. Fuente de poder (10 – 400 mA)
- C. Guantes desechables.

##### **2. Soluciones y reactivos**

El gel constaba de dos partes, un gel separador y un gel concentrador, cuyas composiciones se indican en la Tabla VI. La composición de los amortiguadores se muestra en la Tabla VII.

##### **3. Procedimiento**

Se prepararon los geles de acrilamida-bisacrilamida con dos distintas concentraciones de entrecruzador (10 %T - 3 %C para detección de la proteína 14-3-3 por inmunoréplica, ó 10 %T - 6 %C para detección de la ATPasa de  $H^+$  por inmunoréplica)

- A. En un cassette de acrílico se ensamblaron dos placas de vidrio con su separador de 1 mm de grosor en cada extremo, sellando las esquinas inferiores con vaselina e insertándose el cassette a su vez en un soporte con base de goma, previamente forrado con parafilm.

**Tabla VI. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS según Schägger y von Jagow (1987)**

Reactivos	Gel separador (Vol. en $\mu\text{L}$ )	Gel concentrador (Vol. en $\mu\text{L}$ )
Acrilamida-bisacrilamida	1632 <sup>1</sup>	225 <sup>2</sup>
Amortiguador del gel <sup>3</sup>	1632	421
Glicerol (anhidro)	660	-
H <sub>2</sub> O bidestilada	991	1038
Persulfato de amonio <sup>4</sup>	16.5	14
TEMED <sup>5</sup>	1.65	1.4
Cantidad Total ( $\mu\text{L}$ )	4933.15	1700

<sup>1</sup> Esta parte del gel se preparó con disolución patrón de 10 %T – 3 %C para la proteína 14-3-3 como con una disolución patrón de 10 %T – 6 %C para la ATPasa de H<sup>+</sup>.

<sup>2</sup> Esta parte del gel solo se preparó con la disolución patrón de 10 %T – 3 %C.

<sup>3</sup> Ver Tabla VII.

<sup>4</sup> Solución patrón al 10%

<sup>5</sup> Disolución comercial sin diluir.

**Tabla VII. Soluciones para geles.**

Tipo de amortiguador	Reactivo	Concentración
Amortiguador del cátodo	Tris (Trizma base)	12.1 g/L
	Tricina	11.93 g/L
	SDS	1 g/L
Amortiguador del ánodo	Tris (Trizma base)	24.23 g/L
	HCl (Para ajuste pH 8.9)	1 M
Amortiguador del gel	Tris (Trizma Base)	181.71 g/500mL
	HCl	40.3 mL/500 mL
	SDS	1.5 g/500 mL
Amortiguador de digestion	Tris (Trizma Base)	100 mM
	Azul de bromofenol	0.6%
	$\beta$ -mercaptoetanol	4%
	SDS	10%

- B. Se realizó una prueba de fugas virtiendo agua desionizada y dejando reposar el sistema por un periodo de 5 a 10 min. Si al término de este lapso de tiempo no había fugas, se removió el agua y se eliminó el remanente con un papel filtro limpio y seco.
- C. Se preparó el gel separador (ver Tablas VI y VII) y se vació entre las dos placas de vidrio, añadiéndose aproximadamente 1 mL de una disolución SDS 0.3% para evitar la formación de un menisco que evite la entrada plana de las proteínas al gel.

Se verificó que la superficie sobre la cual se trabajó estuviera nivelada. Se dejó polimerizar 30 min.

- D. Al término de los 30 min, se removió la disolución de SDS 0.3% y se introdujo enseguida el peine. Posteriormente se preparó el gel concentrador, que fue vertido entre las placas de vidrio y el peine de 10 carriles, permitiéndose la polimerización entre 30 y 60 min dependiendo de la temperatura ambiente.
- E. Se retiró el peine muy despacio y se limpió el exceso de disolución que no polimerizó con tiras delgadas de papel filtro. Y por último se llenó el espacio con el amortiguador del cátodo
- F. Se montaron los soportes en la cámara y se hizo el cargado de las muestras que fueron incubadas con amortiguador de digestión (ver Tabla VII), en una relación 1/2 (v/v).
- G. Se corrió la electroforesis de las muestras a 60 V por 30 min y después a 90 V hasta que salió del gel todo el azul de bromofenol (un promedio de 2 h, dependiendo del tipo de gel empleado).
- H. Al término de la electroforesis se desmontó el soporte, se sacó el gel y se colocó en un recipiente de plástico etiquetado, el cual contenía la disolución fijadora para la tinción del gel correspondiente o bien amortiguador de transferencia.

### VIII. Tinción de geles.

1. Técnica de azul de Coomassie.

A continuación se enlistan las soluciones que se ocuparon para esta tinción:

- A. Disolución fijadora: Metanol 50 % (v/v) y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  10 % (v/v).
  - B. Disolución teñidora: Metanol 39.5 % (v/v),  $\text{CH}_3\text{COOH}$  21.1 % (v/v), 0.2 % (p/v) de azul de Coomassie (Brillant blue G-250)
  - C. Disolución desteñidora: Etanol 46 % (v/v) y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  9.1 % (v/v).
2. Procedimiento:
    - A. Después de haber terminado la electroforesis, se sacaron los geles y se colocaron en un recipiente con 20 mL de disolución fijadora y se dejaron un tiempo mínimo de 30 min en agitación rotatoria constante.
    - B. Se decantó la disolución fijadora y se añadió la disolución teñidora, dejando los geles en agitación rotatoria constante por un tiempo mínimo de 15 min.
    - C. Se decantó la disolución teñidora y se añadió 20 mL de disolución desteñidora. En un extremo del recipiente donde fue desteñado el gel, se colocó una esponja pequeña a modo de que se absorbiera el exceso de colorante liberado. Se mantuvo el gel en agitación rotatoria constante hasta que las bandas de proteína fueron visibles y hubo poco fondo de tinción.

- D. Al final se cambió la disolución desteñidora por otra que contenía 5 % (v/v) de glicerol durante 24 horas.
- E. Posteriormente se colocaron entre una capa de celofán y se secaron en un secador de geles a 80 °C por tres horas.

## **IX. Inmunoréplica de la fracción membranal.**

### **1. Equipo y material necesario:**

- A. Fuente de poder (10 – 400 mA)
- B. Cámara de electrotransferencia.
- C. Toma de agua para refrigerante.
- D. Cuchillo o navaja rectos (para el corte del gel a trasferir en caso de ser necesario).
- E. Membrana de PVDF.
- F. Rejillas de cassette.
- G. Esponjas o scotch-brite.
- H. Tijeras finas.
- I. Pinzas finas.
- J. Papel filtro grueso (dos cuadros de 10 X 10 cm).
- K. Guantes desechables.
- L. Envases o bolsas de plástico para incubar las réplicas de la membrana de PVDF.

### **2. Soluciones y reactivos.**

- A. Disolución amortiguadora de transferencia:
  - a) 1M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 (se prepara con 1M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y son 15 mL / L)
  - b) Metanol al 99% (200mL / L)
  - c) 20% de SDS (2.5mL / L)
  - d)  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada hasta 1 L
- B. Disolución amortiguadora con Tris (TBS)
  - a) 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 (2.4g / L)
  - b) 0.5 M de NaCl (29.2g / L)
- C. Disolución amortiguadora con Tris más Tween 20 (TTBS)
  - a) TBS .....995 mL.
  - b) Tween 20 al 20% v/v..... 5 mL.
- D. Disolución bloqueadora. Para el revelado con el anticuerpo Anti ATPasa de  $\text{H}^+$ , 5% de leche descremada en polvo disuelta en TBS.
- E. Disolución amortiguadora del anticuerpo
  - a) Para el primer anticuerpo, 2% de leche descremada en polvo disuelta en TBS.

- b) Para el segundo anticuerpo, 5% de leche descremada en polvo disuelta en TBS. Revelado con fosfatasa alcalina.
- F. Disolución amortiguadora de carbonatos.
- a) 0.1 M de  $\text{NaHCO}_3$  (8.4 g/L)
  - b) 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  (0.2033 g/L)
  - c) Ajustar el pH a 9.8 con NaOH.
- G. Disolución Stock de NBT para desarrollar color.
- a) Preparar 1 mL de 70% de dimetilformamida (0.7 mL de DMF más 0.3 mL de agua bidestilada).
  - b) Disolver 30 mg de NBT en la disolución de 70% de DMF.
  - c) Guardar a 4°C en un envase protegido a la luz, siendo estable por 2 meses.
- H. Disolución Stock de BCIP para desarrollar color.
- a) Disolver 15 mg de BCIP en 1 mL de dimetilformamida.
  - b) Guardar a 4 °C en un envase protegido a la luz, siendo estable por 2 meses.
- I. Mezcla para desarrollar color.
- a) Se preparó justo antes de ser usada.
  - b) Añadir 100  $\mu\text{L}$  de disolución de NBT por cada 10 mL de disolución amortiguadora de carbonatos.
  - c) Añadir 100  $\mu\text{L}$  de disolución de BCIP por cada 10 mL de disolución amortiguadora de carbonatos.
- 3. Procedimiento.**
- A. La manipulación del gel y la membrana de PVDF siempre fue con guantes. Se removió el gel de las placas de vidrio, cortando una esquina para marcar como referencia. Se transfirió el gel a un envase que contenía disolución amortiguadora de transferencia suficiente para cubrir el gel. Se mantuvo en agitación rotatoria un mínimo de 15 min a temperatura ambiente.
- B. El ensamblaje del cassette fue:
- a) Se abrieron las rejillas del cassette.
  - b) Sobre una de ellas se colocó una capa de esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia.
  - c) Sobre la esponja se colocó un cuadro de papel filtro empapado con disolución amortiguadora de transferencia.
  - d) Encima del papel filtro se colocó el gel o los carriles del gel que se transfirieron (una vez de incubado el gel en la disolución amortiguadora de transferencia).

- e) Sobre el gel se puso una hoja de PVDF previamente humedecida con metanol y disolución amortiguadora de transferencia, de un tamaño correspondiente al del gel o los carriles que se transfirieron.
  - f) Se cortó la esquina de la membrana de PVDF donde estaba la correspondiente en el gel.
  - g) Sobre la membrana de PVDF se colocó otro papel filtro también empapado con disolución amortiguadora de transferencia.
  - h) Se rodó un tubo de ensayo sobre toda la superficie del papel para suprimir las burbujas de aire que pudiera haber entre las capas del gel y el papel.
  - i) Se añadió la segunda esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia.
  - j) Sobre lo anterior se cerró la rejilla del cassette.
- C. El cassette se puso en la cámara de electrotransferencia, orientándolo de manera que el gel estuviera de cara al cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo. La cámara debe tener suficiente disolución amortiguadora de transferencia y un agitador magnético colocado en el fondo de manera suave para no romper el fondo de la cámara (la disolución amortiguadora de transferencia puede ser reusada tres veces más).
- D. Se encendió la fuente de poder y se realizó la electrotransferencia en las siguientes condiciones: 25 volts por 2 h 15 min. Los mA son variables.
- E. Al término, se apagó la fuente de poder y se removió el cassette. Se abrió el cassette y cuidadosamente se separó la membrana de PVDF. Se puso la membrana en un recipiente que contenía disolución de TTBS (se puede almacenar así hasta por 2 días a 4 °C) y se cuidó que la cara que estuvo en contacto con el gel quedase hacia arriba. Se realizaron dos lavados cambiando la disolución, cada lavado fue por un periodo de 5 min cada uno. Después se realizó un último lavado con disolución de TBS y se agitó de forma rotatoria por 5 min.
- F. Se removió el TBS y se cambió por disolución bloqueadora. Se mantuvo en agitación rotatoria por 1 h.
- G. Se removió la disolución bloqueadora y se realizaron nuevamente 2 lavados con TTBS en agitación rotatoria por 5 min cada uno y posteriormente con TBS igual por 5 min.
- H. Se removió el TBS y se añadió la disolución con el primer anticuerpo. El primer anticuerpo se añadió contra ATPasa de H<sup>+</sup> en una dilución 1:4,000 y contra la proteína 14-3-3 en una dilución 1:1,000 ó 1:500. Se incubó sin agitación a 4 °C toda la noche, por un periodo de 13 a 16 h.

- I. Se removió la disolución del primer anticuerpo y se realizaron nuevamente 2 lavados con TTBS en agitación rotatoria por 5 min cada uno y posteriormente con TBS igual por 5 min. La réplica estaba lista para ser revelada con el segundo anticuerpo.
- J. Se removió el TBS y se añadió la disolución con el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo (Goat anti-rabbit IgG H+L) se añadió en una dilución 1:1,000. Se incubó sin agitación a temperatura ambiente (por 2 h para ATPasa de H<sup>+</sup> y por 5 h para la proteína 14-3-3).
- K. Se removió la disolución con el segundo anticuerpo y se realizaron nuevamente 2 lavados con TTBS en agitación rotatoria por 5 min cada uno y posteriormente con TBS igual por 5 min.
- L. Se removió el TBS y se añadió la disolución para desarrollar color. De inmediato se puso en agitación suave. Las bandas se fueron haciendo visibles dependiendo de la cantidad de proteína presente.
- M. Al término del revelado, se lavó con agua bidestilada.

#### **X. Análisis densitométrico.**

Se digitalizó la imagen del gel o inmunoréplica deseada y se guardó en un archivo de tipo \*.tif. En las imágenes digitalizadas se cuantificó la densidad de la o las bandas deseadas en el programa Quantity one Versión 4.2.1 (Bio-Rad) de la siguiente manera:

1. En el menú de herramientas del programa, se agrandó la imagen, después se fueron seleccionando las bandas una por una con la herramienta de selección en el menú de herramientas. La selección se hizo a través de cuadros ajustados al tamaño de la parte teñida o bien bordeando la mancha.
2. Se nombró y se indicó el tipo de muestra, sí era desconocida o era de fondo. Cuando se realizó este último paso se dio doble clic en la banda seleccionada.
3. Se hizo la selección del fondo para cada mancha.
4. Se seleccionó análisis de densidad y se indicaron los parámetros que se deseban obtener, en este caso sólo se seleccionó tipo de muestra, nombre, área y densidad de la muestra. Se presionó el botón de "hacer análisis" y se obtuvo la tabla de resultados con los parámetros antes mencionados.
5. A cada tipo de muestra se le restó el valor de densidad de su fondo respectivo y entonces se hizo el análisis de comparación entre las muestras.

## RESULTADOS

Datos previos del laboratorio, indicaron que una baja en ceramida endógena promovía una disminución del 30% en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> [Gutiérrez 2005]. Sin embargo, no se establecieron los factores que determinaban esta baja actividad. En el presente trabajo se exploraron algunas posibilidades que podrían explicar el efecto de la ceramida en la actividad de la enzima. Las alternativas examinadas fueron: una disminución en la cantidad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la MP, una disminución en la cantidad de proteína 14-3-3 unida a la ATPasa de H<sup>+</sup> y un efecto de la ceramida sobre los esteroides necesarios para la actividad de la enzima.

### **I. Determinación de los niveles de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de embriones expuestos a FB1, FB1 + Ceramida C<sub>6</sub>,/Ceramida C<sub>16</sub>, o FB1 + Ceramida C<sub>16</sub>.**

Los experimentos que mostraban que la liberación de la inhibición de la FB1 por la adición de ceramida C<sub>6</sub> (CerC<sub>6</sub>) revelaron el efecto de la ceramida endógena o de esfingolípidos complejos en la actividad de ATPasa [Gutiérrez *et al.* 2005]. En el presente trabajo de tesis lo primero que se llevó a cabo, además de reproducir este efecto, fue ensayar la acción de otra ceramida de cadena más larga, la ceramida C<sub>16</sub> (CerC<sub>16</sub>).

Se midió la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de VMP aisladas de embriones de maíz embebidos en ausencia o presencia de 20 μM de FB1, ó de 20 μM FB1 + 20 μM CerC<sub>6</sub>, ó de 20 μM FB1 + 20 μM CerC<sub>16</sub> ó de 20 μM CerC<sub>16</sub>. Como se puede observar en los datos de la Tabla VIII, con respecto a los rendimientos expresados en términos de proteína recuperada en la fracción de membrana plasmática, los diferentes tratamientos en los que los embriones se expusieron a la toxina y a las ceramidas, no mostraron diferencias con respecto al control. En cuanto a la actividad enzimática total de hidrólisis de ATP en las VMP (es decir, aquella que se midió en ausencia de inhibidores), se puede apreciar que todas las condiciones que incluyeron FB1, comparadas con el control, produjeron inhibición en diferentes magnitudes a excepción del tratamiento con FB1 + CerC<sub>6</sub>.

La actividad de hidrólisis de ATP medida en presencia de molibdato y nitrato (que revelaba la actividad hidrolítica del nucleótido por fosfatasas y por la ATPasa de tonoplasto), no sufrió modificación significativa entre el control y los diferentes tratamientos de imbibición de los embriones de maíz.

La actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP (medida en presencia de ortovanadato de sodio que es un inhibidor de esta enzima) mostró un porcentaje de inhibición del  $66.8 \pm 5.9$  % entre los 5 diferentes tratamientos, lo que indicaba una buena pureza de las VMP.

Como en estas condiciones de medir la hidrólisis de ATP se inhibía a la ATPasa de H<sup>+</sup> y, considerando que las otras enzimas que contribuían a la hidrólisis de ATP son tanto fosfatasas como la ATPasa de tonoplasto, era más recomendable inhibir a estas últimas para dejar a la ATPasa de H<sup>+</sup> activa en el transcurso que dura el ensayo de hidrólisis de ATP y así poder

observar los efectos inhibitorios de otros compuestos como la FB1 sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>.

**Tabla VIII. Actividad de las tres principales enzimas que hidrolizan ATP en las preparaciones de VMP provenientes de embriones de maíz embebidos en presencia de FB1 y/o las CerC<sub>6</sub>, ó CerC<sub>16</sub>.** Los embriones se embebieron en la condición indicada y de aquí se purificaron las VMP, en las que se determinó la hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores clásicos de las enzimas señaladas. La concentración de toxina y ceramidas en todos los casos fue de 20 μM.

Vesículas de membrana plasmática	Control <sup>1</sup>	FB1 <sup>2</sup>	FB1 + Ceramida C <sub>6</sub> <sup>3</sup>	FB1 + Ceramida C <sub>16</sub> <sup>4</sup>	Ceramida C <sub>16</sub> <sup>5</sup>
Rendimiento <sup>6</sup>	0.065 ± 0.021	0.043 ± 0.013	0.061	0.039 ± 0.008	0.042 ± 0.007
Hidrólisis total de ATP <sup>7</sup>	249.9 ± 24.4	191.7 ± 21.2	236.3 ± 14.6	193.9 ± 3.7	166.5 ± 7.3
Actividad de ATPasa de H <sup>+</sup> de MP <sup>7</sup>	169.1 ± 17.9	125.6 ± 14.7	165.1 ± 5.0	109.1 ± 20.3	113.0 ± 23.4
Actividad de ATPasa de H <sup>+</sup> de tonoplasto y de fosfatasas <sup>7</sup>	100.6 ± 27.4	100.8 ± 4.4	93.5 ± 5.0	95.0 ± 16.0	84.0 ± 4.5

<sup>1</sup> Determinaciones independientes, n = 5. <sup>2</sup> Determinaciones independientes, n = 5, <sup>3</sup> Determinaciones independientes, n = 1, <sup>4</sup> Determinaciones independientes, n = 3, <sup>5</sup> Determinaciones independientes, n = 2. Se presenta el valor promedio de las determinaciones y su desviación estándar. <sup>6</sup> mg prot. / g. tejido, <sup>7</sup> nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>.

Por tanto, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP (medida en presencia de los inhibidores de fosfatasas y de ATPasa de tonoplasto) en las VMP con FB1, tuvo una disminución del 24.5 %, con respecto a las VMP control, misma que se liberó embebiendo a los embriones con FB1 + CerC<sub>6</sub> (Tabla IX). Estos resultados confirmaron los datos previos de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP por la FB1 y el efecto de la ceramida de cadena corta añadida exógenamente a los embriones de maíz [Gutiérrez 2005] y constituyeron una referencia para explorar el efecto de una ceramida de cadena más larga, buscando que reprodujera el efecto.

Para ello, los embriones fueron embebidos en presencia de FB1 + CerC<sub>16</sub>. Sin embargo, comparado con el control, hubo una disminución en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> del 31.9 % y cuando sólo se adicionó CerC<sub>16</sub> se produjo una disminución similar de la actividad (35.8 %). Lo cual indicaba que la ceramida exógena de cadena larga por sí sola estaba inhibiendo a la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP, al añadirse *in vivo* a los embriones.

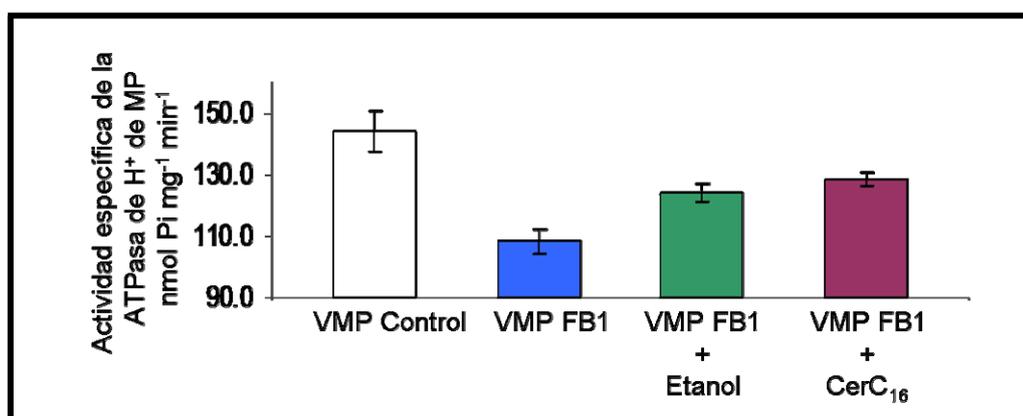
Para determinar si la CerC<sub>16</sub> por sí misma disminuía la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> o esta inhibición se debía a otros posibles blancos de la CerC<sub>16</sub> al interior de la célula que repercutieran en la actividad de la enzima, se adicionó esta ceramida *in vitro* para eliminar esta posibilidad. La adición de CerC<sub>16</sub> se hizo directamente a las VMP extraídas de embriones embebidos previamente con FB1, considerando que contenían bajos niveles de ceramida

endógena, causante de la baja actividad de la enzima [Gutiérrez 2005], efecto que podría ser revertido por la ceramida exógena. La actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> fue medida en las mismas condiciones previamente descritas en Materiales y Métodos, con la única variante de que la CerC<sub>16</sub> disuelta en etanol, se adicionó al medio de hidrólisis antes de la adición de las VMP para posteriormente incubarse durante 30 min a 29 °C y medir el fosfato inorgánico liberado. Como se ve en la Fig. 11, entre VMP control y VMP con FB1 hubo una diferencia del 24.5 % en actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, lo cual corresponde a la inhibición descrita por la FB1. Al añadirse el disolvente de la ceramida (etanol), la actividad aumentó en 14.4 % con respecto al control (VMP FB1, 108.3 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), lo que quiere decir que el disolvente por sí mismo estaba contribuyendo en mayor medida a la recuperación de la actividad. De aquí que el efecto que se vio con la CerC<sub>16</sub> que fue el de un aumento muy ligero (3.6 %) con respecto al control (comparar VMP FB1 + CerC<sub>16</sub> = 128.3, vs. VMP FB1 123.9 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) esté influenciado por el efecto del disolvente.

**Tabla IX. Actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de embriones de maíz embebidos en presencia de FB1 y/o las CerC<sub>6</sub>, ó CerC<sub>16</sub>.** La actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> presentada corresponde a la medida en presencia de los inhibidores de fosfatasa y de ATPasa de tonoplasto.

Vesículas de membrana plasmática	Control <sup>1</sup>	FB1 <sup>2</sup>	FB1 + Ceramida C <sub>6</sub> <sup>3</sup>	FB1 + Ceramida C <sub>16</sub> <sup>4</sup>	Ceramida C <sub>16</sub> <sup>5</sup>
Actividad de ATPasa de H <sup>+</sup> de MP	143.5 ± 6.6	108.3 ± 4.0	142.7 ± 5.0	97.7 ± 16.0	92.2 ± 4.5
nmol de Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	(0 %)	(24.5 %)	(0.6 %)	(31.9 %)	(35.8 %)
					(% inhibición del control)

<sup>1</sup> Determinaciones independientes, n = 6. <sup>2</sup> Determinaciones independientes, n = 5, <sup>3</sup> Determinaciones independientes, n = 1, <sup>4</sup> Determinaciones independientes, n = 3, <sup>5</sup> Determinaciones independientes, n = 2. Se presenta el valor promedio de las determinaciones y su desviación estándar.



**Fig. 11. Efecto de la adición de ceramida *in vitro* a VMP obtenidos de embriones expuestos a FB1.** Se adicionó etanol y CerC<sub>16</sub> disuelta en etanol a VMP con FB1. Determinaciones independientes por muestra n = 2. Ver texto para más detalles.

## II. Establecimiento de las condiciones para detectar a la ATPasa de H<sup>+</sup> y la proteína 14-3-3 por inmunoréplica.

Una de las posibilidades que había que explorar para explicar el efecto FB1/Cer sobre la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP, era que la FB1 estuviera disminuyendo los niveles de la enzima en la membrana o de asociación de la proteína 14-3-3 a la ATPasa. Para ello, era necesario cuantificar tanto los niveles de ATPasa de H<sup>+</sup> de MP como de la proteína 14-3-3. Los anticuerpos contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP y el anticuerpo contra la proteína 14-3-3 de que se disponía, presentaban reactividad ligera contra otras bandas diferentes a la ATPasa de H<sup>+</sup> o la proteína 14-3-3 de maíz respectivamente, por lo que se procedió a afinar las condiciones para eliminar la reactividad inespecífica de los anticuerpos a otras proteínas presentes en las preparaciones de VMP.

Para ello se modificaron las concentraciones de leche desgrasada en tres de las etapas de la técnica de inmunoréplica: en el bloqueo de sitios inespecíficos de la membrana de PVDF y en las incubaciones con el primero y segundo anticuerpos.

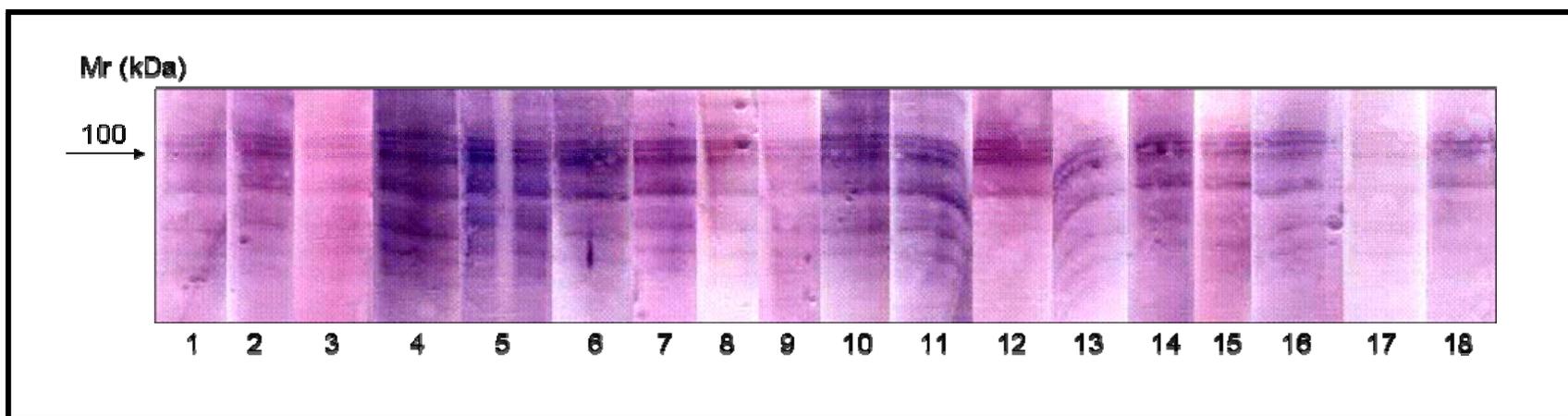
En el caso de la ATPasa de H<sup>+</sup>, el anticuerpo estaba dirigido contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de betabel (*Beta vulgaris* L.) y las mejores condiciones para eliminar las bandas inespecíficas fueron 5 % de leche desgrasada en el bloqueo, 2 % de leche desgrasada con el primer anticuerpo y 5 % de leche desgrasada con el segundo anticuerpo (Tabla X y Fig. 12).

También se modificaron las condiciones bajo las cuales se realizaba la separación electroforética de las proteínas de la membrana plasmática. Para detectar a la ATPasa de H<sup>+</sup> se aumentó el porcentaje de entrecruzador del gel para juntar bandas muy cercanas que pueden ser isoformas de la ATPasa de H<sup>+</sup>, mismas que se han reportado en maíz. En el caso de la proteína 14-3-3, también se han reportado varias isoformas en maíz, por lo cual se justificaban algunas de las bandas adicionales vistas en las inmunorélicas. Se ensayaron una serie de condiciones en el procedimiento de inmunoréplica para ver si se podían eliminar algunas bandas que no podrían ser las isoformas y así reducir la reactividad del anticuerpo hacia esas bandas.

Después de realizar las pruebas anteriores, la mejor condición para detectar a la proteína 14-3-3 fue cuando se adicionaba 2 % de leche desgrasada en los pasos de bloqueo y de incubación con el primero y segundo anticuerpos (Tabla XI y Fig. 13). Las condiciones anteriores se mantuvieron en las inmunorélicas subsecuentes.

**Tabla X. Eliminación de la reactividad inespecífica del anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP en el procedimiento de inmunoréplica.** Se probaron diferentes concentraciones de leche desgrasada en las fases de bloqueo y de incubación de los anticuerpos 1° y 2°: Los porcentajes indican la concentración de leche desgrasada usada.

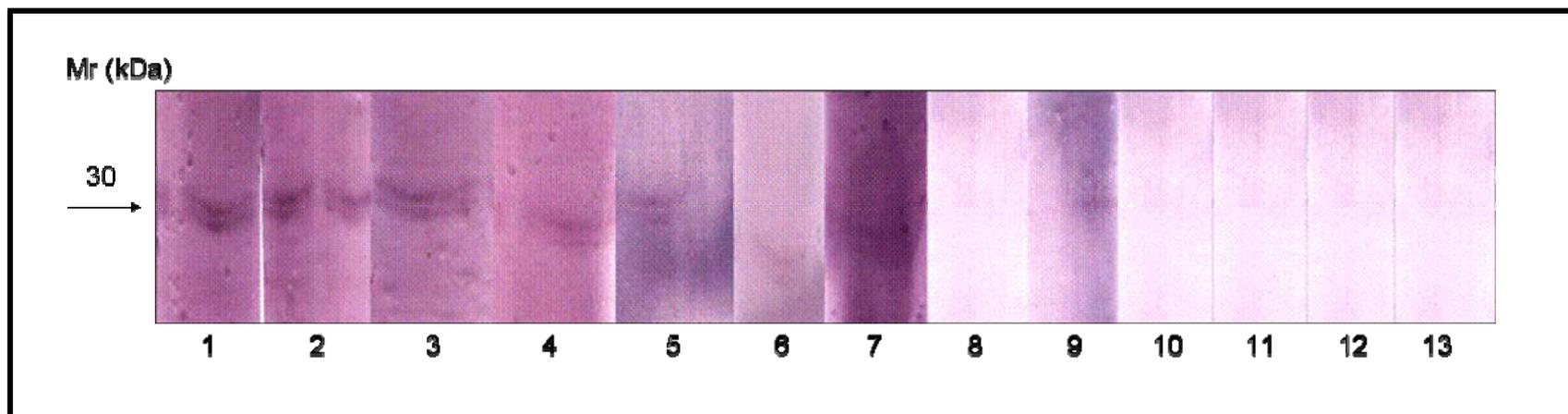
No. Condición	Bloqueo %	1er. Anticuerpo %	2do. Anticuerpo %	No. Condición	Bloqueo %	1er. Anticuerpo %	2do. Anticuerpo %	No. Condición	Bloqueo %	1er. Anticuerpo %	2do. Anticuerpo %
1	2	0	1	7	2	2	1	13	2	5	1
2	2	0	2	8	2	2	2	14	2	5	2
3	2	0	5	9	2	2	5	15	2	5	5
4	5	0	1	10	5	2	1	16	5	5	1
5	5	0	2	11	5	2	2	17	5	5	2
6	5	0	5	12	5	2	5	18	5	5	5



**Fig. 12. Efecto de la concentración de leche desgrasada en la inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de embriones de maíz en membranas de PVDF.** Las flechas en color negro indican la banda con el peso molecular de la ATPasa de H<sup>+</sup> que corresponde a 100 kDa. Se aplicaron 25 µg de proteína membranal por carril. Los números colocados en la parte inferior de la imagen corresponden a las condiciones que se mencionan en la Tabla X.

**Tabla XI. Condiciones para eliminar la reactividad inespecífica del anticuerpo contra la proteína 14-3-3 en el procedimiento de inmunoréplica.** Se probaron diferentes concentraciones de leche desgrasada en las fases de bloqueo y de incubación del 1° y 2° anticuerpos: Los porcentajes indican la concentración de leche desgrasada usada.

No. Condición	Bloqueo %	1er. Anticuerpo %	2do. Anticuerpo %	No. Condición	Bloqueo %	1er. Anticuerpo %	2do. Anticuerpo %	No. Condición	Bloqueo %	1er. Anticuerpo %	2do. Anticuerpo %
1	2	0	2	6	2	5	1	11	5	2	1
2	2	0	5	7	2	5	2	12	5	2	2
3	2	2	1	8	2	5	5	13	5	2	5
4	2	2	2	9	5	0	2				
5	2	2	5	10	5	0	5				



**Fig. 13. Efecto de la concentración de leche desgrasada en la inmunodetección de la proteína 14-3-3 en embriones de maíz en membranas de PVDF.** Las flechas en color negro indican la banda con el peso molecular de la proteína 14-3-3 (que corresponde a 100 kDa). Se aplicaron 25 µg de proteína membranal por carril. Los números colocados en la parte inferior de la imagen corresponden a las condiciones que se mencionan en la Tabla XII.

### III. Inmunodetección de ATPasa de H<sup>+</sup> en VMP.

Una vez realizada la obtención y purificación de VMP de embriones de maíz y de que se estandarizaron las condiciones para las inmunorélicas, se exploró la posibilidad de que los bajos niveles de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> tras la imbibición de los embriones en presencia o ausencia de FB1 se debieran a una disminución en los niveles de incorporación de enzima a la MP, lo que se verificó realizando la inmunodetección de la ATPasa en las VMP de embriones control, las VMP de embriones embebidos con FB1 y las VMP de embriones embebidos en presencia de FB1 + CerC<sub>6</sub> (Fig. 14).

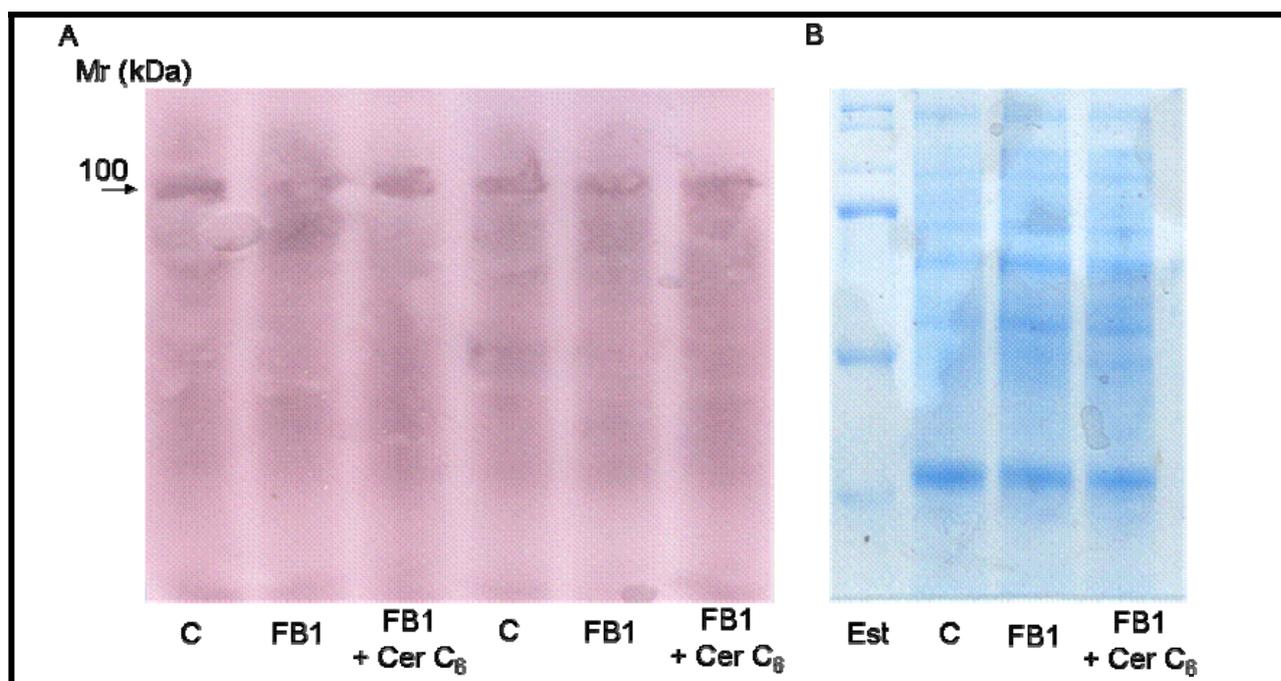
Como se puede ver en una inmunorélica representativa de varias elaboradas (Fig. 14 A), en el mismo gel se aplicaron muestras por duplicado de las tres condiciones anteriormente mencionadas. Así, entre la muestra control y la muestra con FB1 no se observó una diferencia a simple vista en las intensidades de las bandas, lo mismo se pudo ver entre las VMP control y las VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub> y lo mismo sucedió entre los dos tratamientos (VMP con FB1 y VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub>). En el control de cargado (Fig. 14 B) no se observó diferencia entre la cantidad de proteína cargada en las diferentes condiciones.

Como el análisis visual anterior fue cualitativo, se hizo un análisis semicuantitativo para verificar que no hubiera diferencia significativa entre las intensidades de las distintas condiciones en las inmunorélicas elaboradas. Por tanto, se estimó la intensidad de cada banda a través de la medición densitométrica de cada banda en todas las inmunorélicas realizadas como se describió en Materiales y Métodos (Tabla XII).

Para saber si había una diferencia significativa en los valores encontrados en las diferentes réplicas (en VMP de embriones control la n fue de 13, para VMP de embriones embebidos con FB1 la n fue de 13 y para VMP de embriones embebidos en presencia de FB1 + CerC<sub>6</sub> la n fue de 8), se realizó un análisis de varianza de una vía.

**Tabla XII. Análisis densitométrico de la banda correspondiente a la ATPasa de H<sup>+</sup> de las inmunorélicas con VMP control, VMP con FB1 y VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub>.** Los datos presentados corresponden a todas las inmunorélicas realizadas. <sup>1</sup> El número de datos pertenecientes a cada condición se menciona en el texto. <sup>2</sup> Para el cálculo de P sólo se consideraron los valores normalizados en porcentaje por gel (n = 8). I = intensidad de la banda.

VMP		Densidad de la banda de 100 kDa (intensidad mm <sup>-2</sup> ) /
Control	I <sup>1</sup>	<b>510.3, 511.1, 589.7, 566.1, 766.9, 613.9, 115.8, 131.2</b>
	% <sup>2</sup>	36.0, 37.1, 34.7, 32.5, 34.0, 34.3, 34.3, 38.2
FB1	I <sup>1</sup>	<b>447.8, 544.7, 569.1, 543.6, 737.3, 623.9, 82.3, 100.7</b>
	% <sup>2</sup>	31.6, 39.5, 33.5, 31.2, 32.7, 34.9, 24.3, 29.3
FB1 + CerC <sub>6</sub>	I <sup>1</sup>	<b>459.0, 322.9, 539.1, 631.2, 750.0, 551.5, 140.0, 111.9</b>
	% <sup>2</sup>	32.4, 23.4, 31.8, 36.3, 33.3, 30.8, 41.4, 32.5



**Fig. 14. Inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> en VMP obtenidas de embriones de maíz incubados en presencia y ausencia de FB1.** A: Detección de la ATPasa de H<sup>+</sup> con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de betabel en membrana de PVDF. En la Tabla XII se incluyen los valores del análisis densitométrico correspondientes a esta inmunoréplica. B: Réplica del gel transferido a la membrana de PVDF teñido con azul de coomassie. Las flechas indican la masa molecular de 100 kDa. Se aplicaron 25 µg de proteína membranal por condición. Experimento representativo de 13 inmunorélicas realizadas con 5 preparaciones membranales diferentes. Est = estándar, C = control, FB1 = fumonisina B1, FB1 + CerC<sub>6</sub> = Fumonisina B1 + ceramida C<sub>6</sub>.

En éste análisis se comparó la banda de 100 kDa perteneciente a la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP entre la muestra control y la muestra con FB1, entre las VMP control y las VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub> y entre los dos tratamientos (Tabla XIII). Para el análisis de varianza se consideró un  $\alpha = 0.05$  y después del proceso estadístico, se encontró un valor de P = 0.3 en las muestras analizadas. Lo que indicaba que no había diferencia significativa entre las intensidades de las bandas analizadas entre el control y las otras dos condiciones.

**Tabla XIII. Representación tabular de la comparación de los datos provenientes del análisis densitométrico de la banda de la ATPasa de H<sup>+</sup> y sometidos al análisis de varianza.** ✓ = Indicación de que muestras se compararon.

	VMP Control	VMP con FB1	VMP con FB1 + CerC <sub>6</sub>
VMP control		✓	✓
VMP con FB1	✓		✓
VMP con FB1 + CerC <sub>6</sub>	✓	✓	

#### IV. Detección de la proteína 14-3-3 por inmunoréplica.

Como una de las formas de regulación de la ATPasa  $H^+$  es por medio de la unión de la proteína 14-3-3 al carboxilo terminal fosforilado, la disminución en la actividad inducida por FB1 y en donde había menos ceramida endógena, podía deberse a una menor fosforilación de la enzima y por tanto, a una menor cantidad de la proteína 14-3-3 asociada a la enzima.

Al igual que en el caso de las inmunorélicas contra la ATPasa de  $H^+$ , una vez que se determinaron las condiciones óptimas para disminuir la reactividad por otras bandas que no fueran la banda correspondiente a 30 kDa, peso reportado para la proteína 14-3-3 en maíz, se procedió a comparar si había diferencias entre las VMP de embriones control, las VMP de embriones embebidos con FB1 y de las VMP de embriones embebidos con FB1 + CerC<sub>6</sub>.

El proceso de comparación entre las muestras se realizó igual que como se describió en la sección anterior, y como se puede ver en la Fig. 15 A, no se detectó una diferencia entre las muestras de los diferentes tratamientos y no hubo diferencias en la cantidad de proteína cargada según el control de cargado (Fig. 15 B). Para confirmar esta apreciación, se realizó la determinación de densidad a la banda de 30 kDa en las inmunorélicas de proteína 14-3-3 (Tabla XIV). A los valores de densidad de las bandas de cada uno de los tratamientos (para VMP de embriones control la n fue de 16, para VMP de embriones embebidos con FB1 la n fue de 16 y para VMP de embriones embebidos en presencia de FB1 + CerC<sub>6</sub> la n fue de 10), se les aplicó un análisis de varianza en la misma forma que se hizo a los datos de la sección anterior (Tabla XIII). Se consideró un  $\alpha = 0.05$  y una vez realizado el tratamiento estadístico, se obtuvo un valor  $P = 0.3$  por lo cual no se encontró una diferencia significativa en la cantidad de proteína presente entre el control y los dos tratamientos.

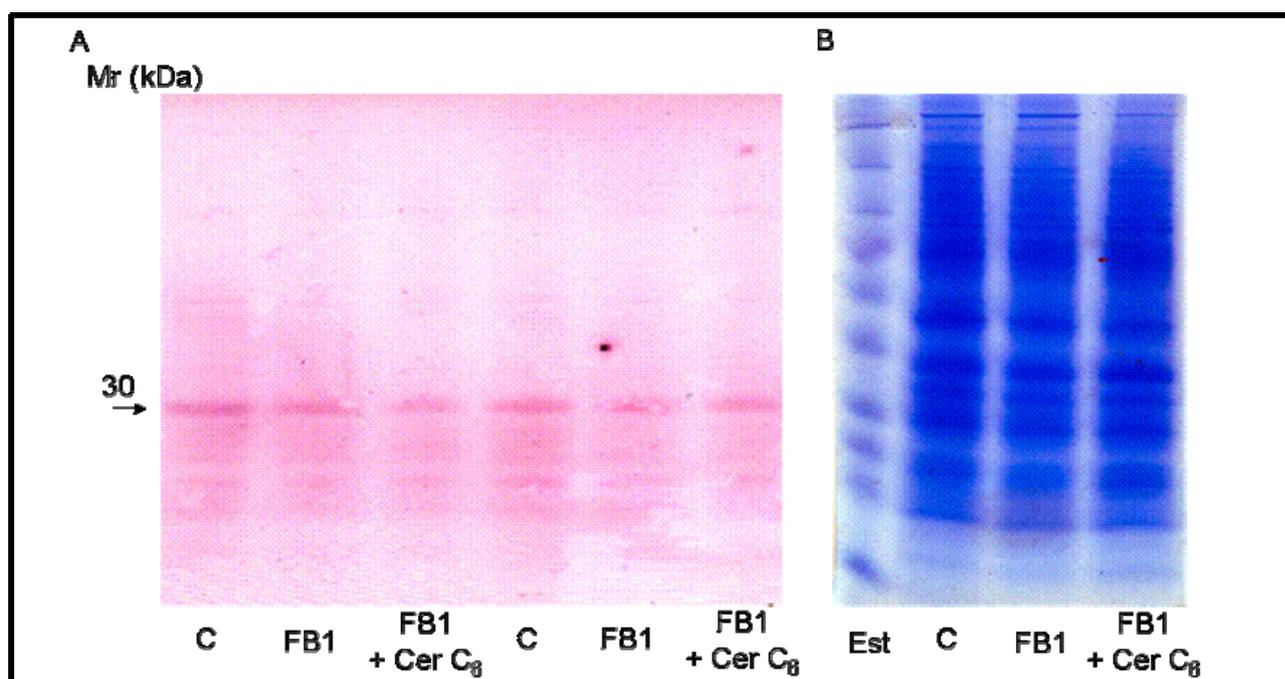
Ya que la FB1 promovía una disminución del 20% de la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , se procedió a establecer si el ensayo de inmunoréplica era capaz de detectar una disminución del 20 % en la cantidad de proteína. Así, siguiendo las condiciones ya establecidas para eliminar la reactividad inespecífica de las bandas que aparecían tanto en la inmunoréplica para la ATPasa de  $H^+$  como para la inmunoréplica para la proteína 14-3-3, se aplicaron cantidades de proteína membranal a los geles en un intervalo de 10-25  $\mu$ g. En la Fig. 16 se muestran los ensayos tanto para la ATPasa de  $H^+$  (Fig. 16 A) como para la proteína 14-3-3 (Fig. 16 B), en donde se estableció la relación entre la densidad de la banda de 100 kDa y de 30 kDa y la cantidad de proteína aplicada.

Se puede ver en la Fig. 16 (A y B), que a menor cantidad de proteína presente en la inmunoréplica, menor es la densidad de la banda reactiva al anticuerpo. Este comportamiento se observó tanto en la banda de 100 kDa como en la banda de 30 kDa y se hizo patente en la Fig. 16 C, donde, al cargarse 4 diferentes cantidades de proteína partiendo de 25  $\mu$ g y disminuyendo progresivamente en 20 % la cantidad de proteína cargada (pues, la actividad se redujo en un 20 % aprox. cuando se adicionó FB1), se observó una relación proporcional entre la cantidad de

proteína aplicada y la intensidad de la banda. Por tanto, si la baja de actividad se debiera a una disminución de la cantidad de ATPasa de H<sup>+</sup>, se tendría que haber visto comparado con el control (25 µg), una cantidad equivalente a 20 µg en la condición con FB1.

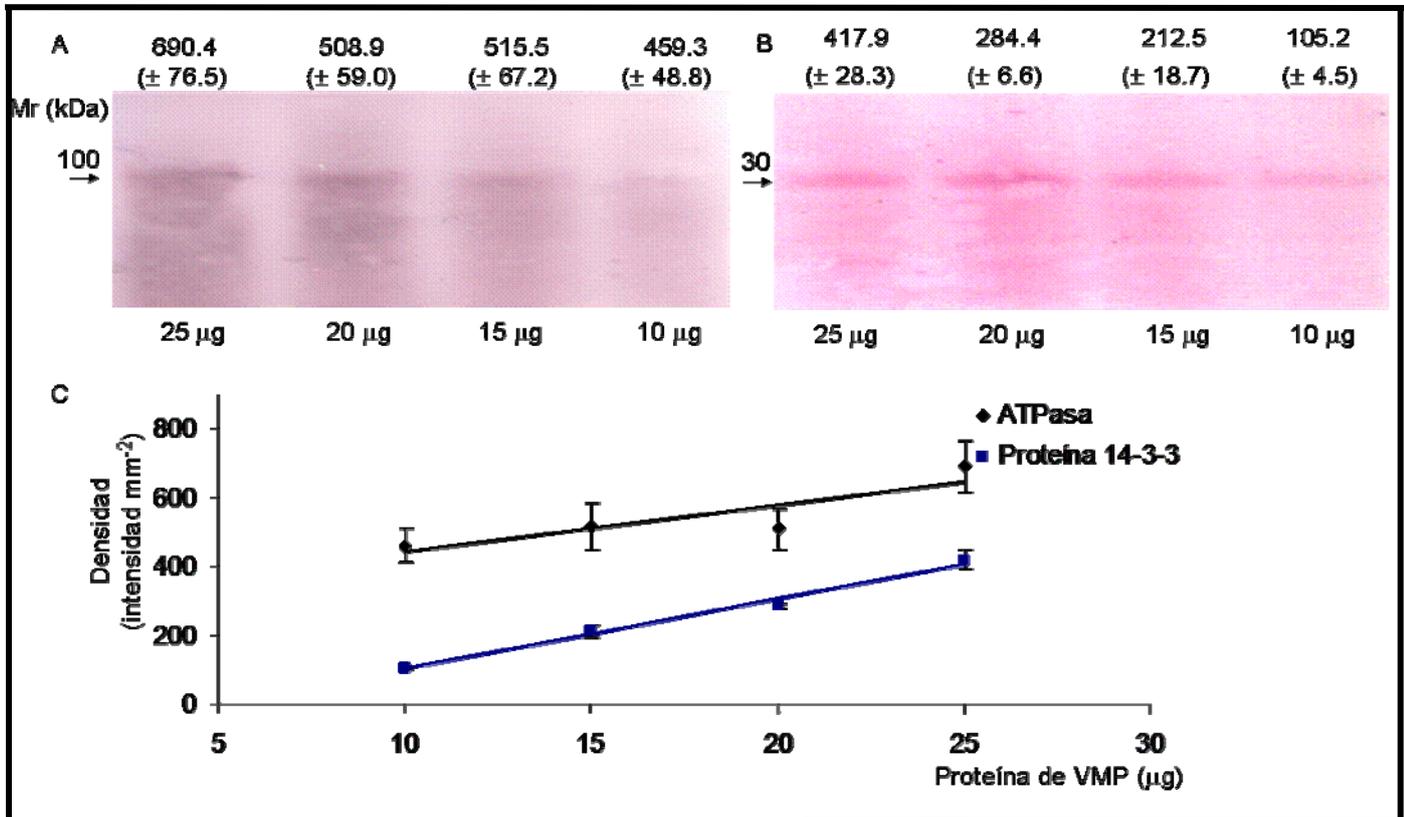
**Tabla XIV. Análisis densitométrico de la banda correspondiente a la proteína 14-3-3 de las inmunorélicas con VMP control, VMP con FB1 y VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub>.** Los datos presentados corresponden a todas las inmunorélicas realizadas. <sup>1</sup> El número de datos pertenecientes a cada condición se menciona en el texto. <sup>2</sup> Para el cálculo de P sólo se consideraron los valores normalizados en porcentaje pertenecientes a un mismo gel (n = 10). I = intensidad de la banda.

VMP		Densidad de la banda de 30 kDa (intensidad mm <sup>-2</sup> )									
Control	I <sup>1</sup>	389.5	356.8	381.7	301.6	137.5	140.6	166.7	126.2	264.9	313.0
	% <sup>2</sup>	47.2	42.5	40.3	39.5	31.2	28.5	26.6	30.0	36.6	39.3
FB1	I <sup>1</sup>	279.0	311.4	326.0	208.2	135.9	120.2	233.3	122.8	218.3	232.4
	% <sup>2</sup>	33.8	37.1	34.4	27.2	30.8	24.3	37.2	29.2	30.2	29.2
FB1 + CerC <sub>6</sub>	I <sup>1</sup>	155.9	171.0	240.5	254.3	167.7	233.3	227.2	171.4	240.2	251.8
	% <sup>2</sup>	18.9	20.4	25.4	33.3	38.0	47.2	36.2	40.8	33.2	31.6



**Fig. 15. Inmunodetección de la proteína 14-3-3 en VMP obtenidas de embriones de maíz incubados en presencia y ausencia de FB1.** A: Detección de la proteína 14-3-3 con el anticuerpo contra la proteína 14-3-3 isoforma β de humano en membrana de PVDF. En la Tabla XIV se incluyen los valores del análisis densitométrico correspondiente a esta inmunoréplica. B: Réplica del gel transferido a la membrana de PVDF teñido con azul de coomassie. La flecha indica la masa molecular de 30 kDa. Se aplicaron 25 µg de proteína membranal por condición. Experimento representativo de 16 inmunorélicas realizadas con 5 preparaciones membranales diferentes. Est = estándar, C = control, FB1 = fumonisina B1, FB1 + CerC<sub>6</sub> = Fumonisina B1 más ceramida C<sub>6</sub>.

Así, si hubiera habido una disminución en la cantidad de proteína tanto para la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP como para la proteína 14-3-3 de alrededor del 20% debida a un efecto de la FB1, se podría haber detectado por la técnica de inmunoréplica.



**Fig. 16. Sensibilidad del ensayo de detección de la ATPasa de H<sup>+</sup> y contra la proteína 14-3-3 a una disminución de proteína.** A: inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup>. B: inmunodetección de la proteína 14-3-3. En la parte superior de cada inmunodetección se presentan los valores densitométricos de cada banda (entre paréntesis está la desviación estándar). C: cuantificación de la densidad de cada banda en función de la cantidad de proteína contenida en las VMP. Los valores corresponden a dos muestras independientes de VMP control. Las dos inmunorélicas son representativas de varias otras.

**V. Determinación del efecto del secuestro de esteroides endógenos en la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de MP de embriones control y expuestos a FB1 o FB1 + CerC<sub>6</sub>.**

Se exploró la posibilidad de que la inhibición de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP producida por la FB1 y relacionada con la falta de ceramida endógena estuviera relacionada con una interacción de la ceramida con esteroides membranales, ya que ha sido reportada la necesidad de estos compuestos cíclicos en la actividad de la enzima [Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997]. Para ello, se utilizó M-β-CD que remueve esteroides endógenos de la MP con una gran eficiencia (ver Apéndice I).

El experimento se diseñó añadiendo la M-β-CD a las VMP y determinando en ellas tanto la hidrólisis de ATP total, como la hidrólisis de ATP producida de manera específica por la ATPasa

de  $H^+$ . En el ensayo de hidrólisis total de ATP, primero se añadió el medio de hidrólisis (descrito en Materiales y Métodos) y después la M- $\beta$ -CD en dos concentraciones diferentes que fueron 0.5 mM y 5 mM. El ensayo se inició al adicionar 5  $\mu$ g de proteína de VMP de embriones control. Cuando se midió la hidrólisis de ATP producida por la ATPasa de  $H^+$  de MP, se adicionaron al medio de hidrólisis dos inhibidores, uno contra la ATPasa de  $H^+$  de tonoplasto y el otro contra las fosfatasa que estaban presentes en bajas cantidades en las VMP, dejando así a la ATPasa de  $H^+$  de MP activa. En ambos casos, una vez adicionada la proteína, se procedió a incubar a 29 °C por espacio de 3, 15, 35 y 60 min.

La disminución en la hidrólisis total de ATP, comparada con el control (Fig. 17 A línea azul punteada), creció a medida que fue aumentando la concentración de M- $\beta$ -CD y se ve claramente que dependió de su concentración en los tiempos de 35 y 60 min. Esto es, si se compara entre el control (Fig. 17 A línea azul punteada) y cuando se añadió 0.5 mM de M- $\beta$ -CD (Fig. 17 A línea verde punteada), la disminución no fue tan pronunciada como la producida por la concentración de 5 mM de M- $\beta$ -CD (Fig. 17 A línea roja punteada).

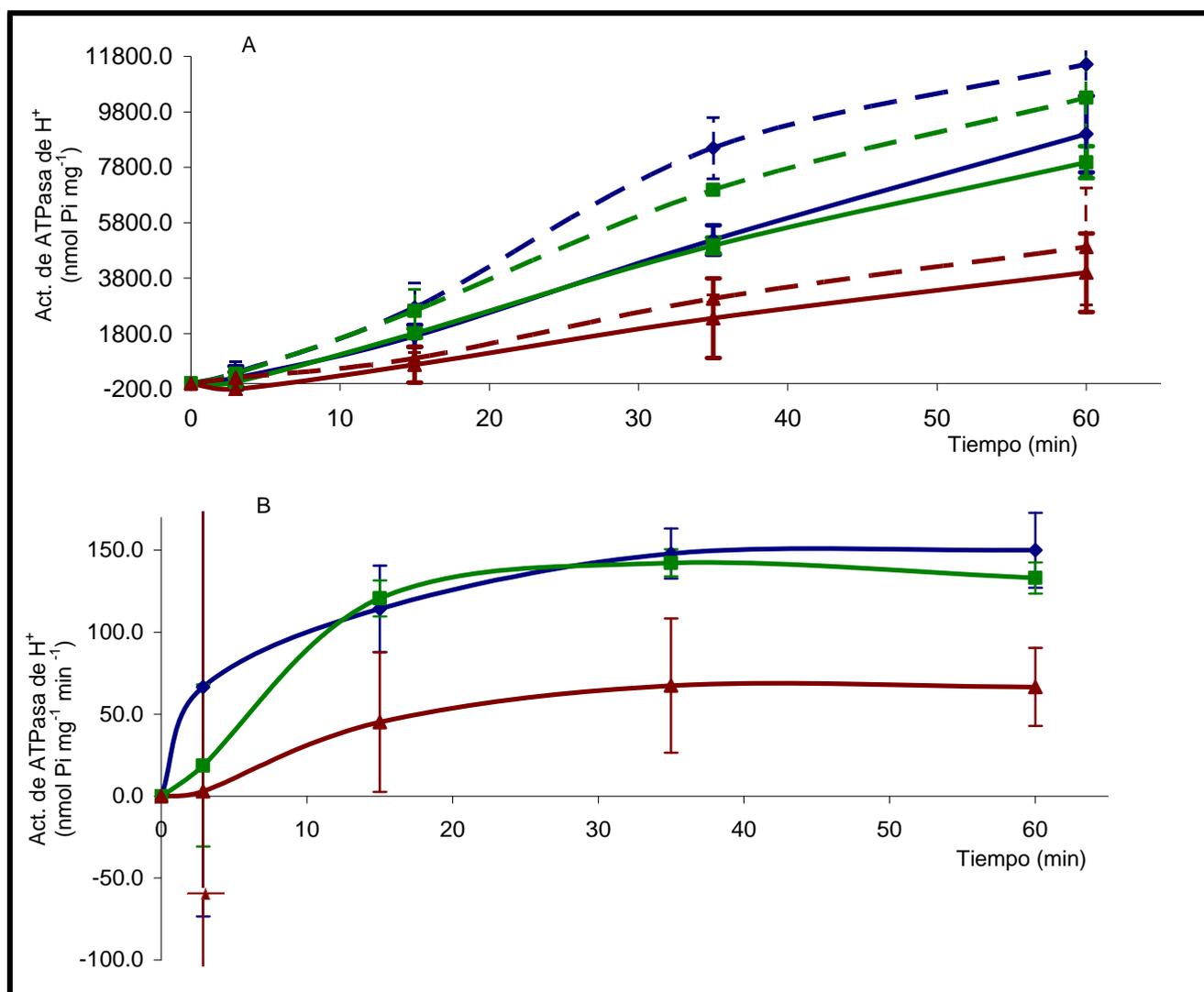
En la actividad específica de la ATPasa de  $H^+$ , se observó una tendencia diferente a la de la hidrólisis total de ATP. Comparadas con el control (Fig. 17 A línea sólida azul), sólo la concentración de 5 mM de M- $\beta$ -CD (Fig. 17 A línea sólida roja) disminuyó la actividad de la enzima. Este efecto se apreció mejor a los 35 y 60 min de estar presente la M- $\beta$ -CD (Fig. 17 B).

En la Fig. 17 B en la que se representa el efecto de la M- $\beta$ -CD sobre la actividad específica de la ATPasa de  $H^+$  a cada tiempo de exposición comparado con el control (Fig. 17 B línea sólida azul), cuando hubo 0.5 mM de M- $\beta$ -CD (Fig. 17 B línea sólida verde), la disminución de la actividad no fue significativa a ningún tiempo. Pero cuando la concentración fue de 5 mM de M- $\beta$ -CD (Fig. 17 B línea sólida roja) después de los 15 min y hasta los 60 min se tuvo un promedio de inhibición del 56.9 %.

Una vez que vimos que la M- $\beta$ -CD disminuía la actividad de la ATPasa de  $H^+$  en VMP control y considerando que sería más fácil extraer los esteroides en VMP con FB1 por la falta de ceramida endógena comparado con las VMP control, si es que la ceramista estaba facilitando de alguna manera la interacción ATPasa-esteroides, se procedió a medir la actividad de la enzima con distintas concentraciones de M- $\beta$ -CD.

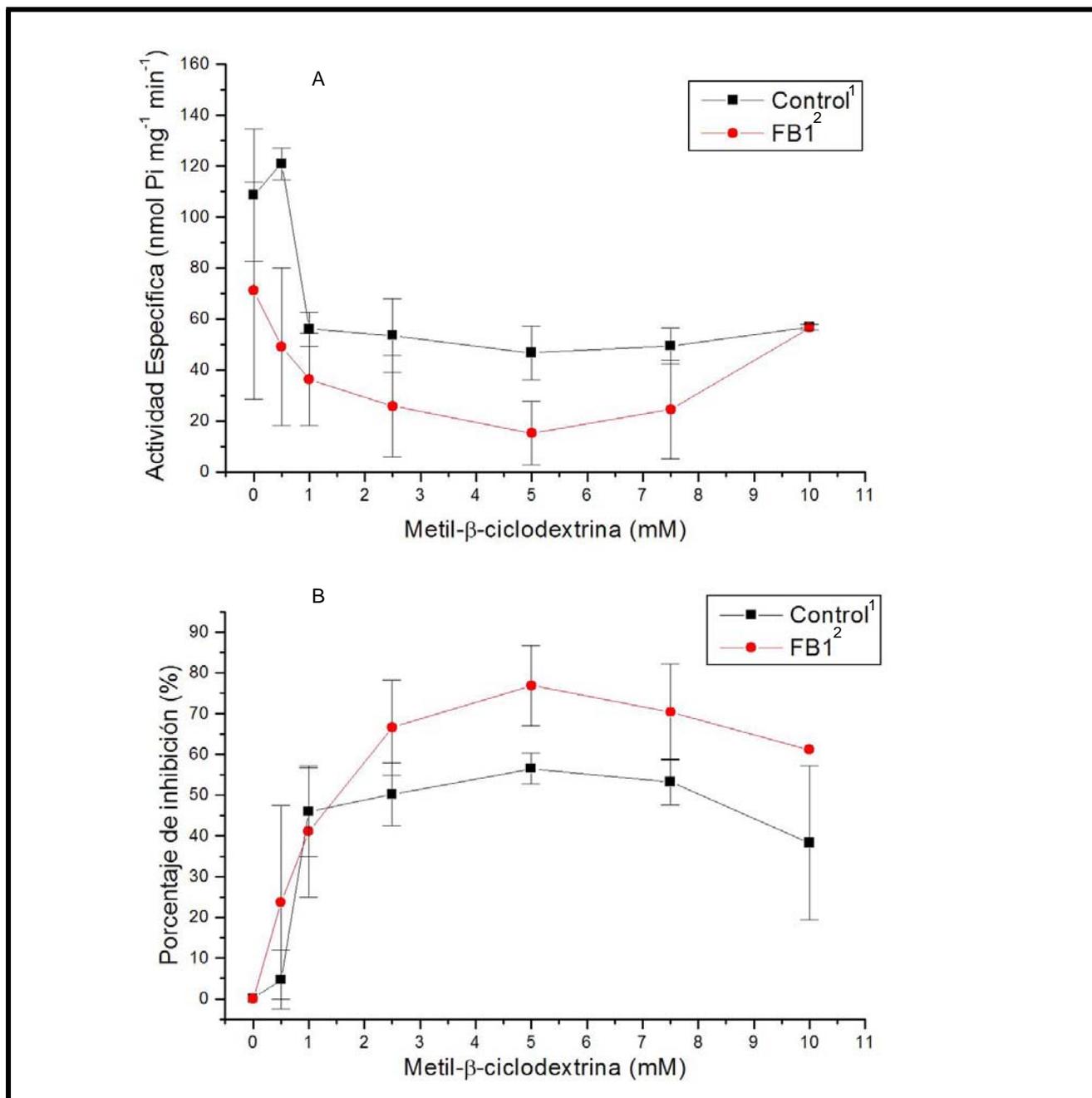
Así, se midió el efecto de diferentes concentraciones de M- $\beta$ -CD sobre VMP control y VMP con FB1 a un tiempo de 30 min. Como se puede ver (Fig 18 A) en las VMP control, a medida que aumentó la concentración de M- $\beta$ -CD, la actividad de la ATPasa de  $H^+$  fue disminuyendo, en un patrón bifásico, alcanzándose un mínimo de actividad cuando la concentración de M- $\beta$ -CD fue de 1 mM. Cuando se comparó con el control, el comportamiento que siguieron las VMP de embriones tratados con FB1 en presencia de concentraciones crecientes de M- $\beta$ -CD, fue muy parecido al control, pero el efecto de la M- $\beta$ -CD fue de disminuir más la actividad de la ATPasa de

H<sup>+</sup> (Fig. 18 A). Si bien las desviaciones estándar fueron amplias en estos experimentos, se puede observar una diferencia en el efecto de la M-β-CD sobre la actividad de la enzima de embriones expuestos a la FB1, con respecto al control.



**Fig. 17. Efecto de la M-β-CD sobre la hidrólisis total de ATP y sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>.** A: actividad de hidrólisis de ATP acumulada en cada tiempo. B: actividad específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> en cada tiempo. Las curvas de hidrólisis acumulada a cada tiempo se representan con líneas punteadas y las de la ATPasa de H<sup>+</sup> con líneas sólidas. Control de la hidrólisis total sin M-β-CD (---◆---), hidrólisis total con M-β-CD 0.5 mM (---■---) e hidrólisis total con M-β-CD 5 mM (---▲---). Control de la actividad específica la ATPasa de H<sup>+</sup> (—◆—), actividad específica la ATPasa de H<sup>+</sup> con 0.5 mM de M-β-CD (—■—), o actividad específica la ATPasa de H<sup>+</sup> con 5 mM de M-β-CD (—▲—). Éste gráfico presenta valores de 3 experimentos independientes con 3 muestras membranales diferentes.

Cuando se graficó el porcentaje de inhibición vs la concentración de M-β-CD (Fig. 18 B) se apreció mejor como se dio la baja en la actividad. En este gráfico se vio que las VMP control alcanzaron un máximo de inhibición a 5 mM de M-β-CD y si se observa la línea correspondiente a las VMP con FB1, también se alcanzó el máximo de inhibición en 5 mM de M-β-CD.



**Fig. 18. Efecto de distintas concentraciones de M-β-CD sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en VMP control y en VMP tratadas con FB1.** A: Actividad específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de VMP control y de VMP con FB1 en presencia de concentraciones crecientes de M-β-CD, B: Porcentaje de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de VMP control y de VMP con FB1 en presencia de concentraciones crecientes de M-β-CD.

<sup>1</sup> determinaciones independientes n = 3. <sup>2</sup> determinaciones independientes n = 6.

## DISCUSIÓN

La ATPasa de H<sup>+</sup> (EC 3.6.3.6) es una enzima de la MP que es fundamental en la fisiología de la célula vegetal, ya que de ella dependen los procesos de elongación celular, transporte de nutrientes, apertura y cierre de estomas y regulación del pH intra y extracelular [Morsomme y Boutry 2000, Palmgren 2001]. Siendo una enzima membranal, su actividad está influenciada por el entorno lipídico. Al respecto, hay varios reportes en la literatura que indican que diferentes glicerolípidos y esteroides membranales, así como detergentes, modifican positiva o negativamente su actividad [Brauer y Tu 1989, Sandstrom y Cleland 1989, Cooke *et al* 1994, Gomès *et al.* 1996, Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997]. No hay ningún registro que indique que la ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas requiera de esfingolípidos para su función, si bien los resultados que la ubican consistentemente en las membranas resistentes a la solubilización por detergente, podrían constituir un indicio de la asociación física de esta enzima con los esfingolípidos, lo cuales, junto con los esteroides, están enriquecidos en estas preparaciones [Mongrand *et al.* 2004, Shaollari *et al.* 2004, Borner *et al.* 2005].

En el laboratorio se ha encontrado que la adición de FB1 a los embriones de maíz produce una inhibición del 20 al 30 % de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> [Gutiérrez 2005]. La toxina también produce un aumento en los niveles de esfinganina en la MP, debido a la inhibición de la SAT [Wang *et al.* 1991, Merrill *et al.* 2001, Soriano *et al.* 2005]. Sin embargo, la inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> no es producida por el aumento de esfinganina y sí es revertida por la adición de ceramida, sugiriendo que la disminución observada en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> por la FB1 está relacionada con una disminución en los niveles endógenos de ceramida [Gutiérrez 2005].

En esta tesis trató de dilucidarse el mecanismo por el cual la ceramida (o esfingolípidos complejos) es requerida para la actividad completa de la enzima, explorándose varias posibilidades: incorporación adecuada de la enzima en la membrana plasmática, mayor nivel de fosforilación de la enzima, conformación más activa de la enzima por requerimiento estructural del lípido o por una interacción de éste con esteroides membranales.

### **I. Efecto de la FB1 y las ceramidas sobre los niveles de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de MP.**

Al reproducir el efecto que ejercía la FB1 y la CerC<sub>6</sub> sobre la ATPasa de H<sup>+</sup>, los rendimientos similares en todas las preparaciones de los embriones expuestos a los diferentes tratamientos indicaron que se podía descartar una posible influencia de los diferentes compuestos en los que fueron embebidos los embriones de maíz sobre la extractibilidad de las VMP expresada en términos de proteína total.

Con respecto a las actividades obtenidas en las preparaciones de VMP entre la condición control y las de embriones embebidos con FB1 o con FB1 + CerC<sub>6</sub> (Tabla VIII y IX) confirmamos

la inhibición por FB1 (24.5 %) y la FB1 junto a la CerC<sub>6</sub> restauraron los niveles de actividad de la enzima, como había sido ya reportado [Gutiérrez 2005]. Como la CerC<sub>6</sub> es una ceramida artificial, que no se encontraba endógenamente en los embriones de maíz, se exploró el efecto de una ceramida de cadena más larga (CerC<sub>16</sub>).

Contrariamente a lo esperado, en los experimentos de adición de FB1 junto con la ceramida de cadena larga *in vivo*, encontramos que la actividad específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> en presencia de FB1 + CerC<sub>16</sub> disminuyó aún más que la condición con FB1 sola, en donde se encontró la inhibición esperada y también se determinó una inhibición con CerC<sub>16</sub>. Algo que también observamos es que los embriones se desarrollaban menos (datos no mostrados).

Como se mencionó en la sección de Resultados, parte de estas inhibiciones en presencia de la ceramida de cadena larga se podría deber al efecto del solvente mismo del lípido. Si bien la cantidad de etanol fue mínima, los controles indicaron que era suficiente para aumentar la actividad. Una forma de eliminar este problema hubiera sido añadir la CerC<sub>16</sub> disuelta en un disolvente inocuo para evitar alguna posible interferencia de éste y medir la hidrólisis *in vitro* eliminando otros efectos indeseables dentro de la célula. Sin embargo, es posible que haya un efecto de la CerC<sub>16</sub> que también contribuya a la inhibición encontrada y que esté relacionada con la acción que esté ejerciendo la ceramida al interior de la célula por ser un lípido bioactivo [Hannun y Obeid 2002]. Aún cuando no esté totalmente entendido su papel de segundo mensajero en varios procesos celulares *in vivo* [Van-Blitterswijk *et al* 2003], sí está clara su intervención en procesos como apoptosis, supresión del crecimiento, diferenciación y senescencia [Hannun y Obeid 2002, Liang *et al.* 2003]. Por lo anterior, se podría sugerir que la ceramida de cadena larga podría, a tiempos como el del 24h de imbibición, estar participando en procesos apoptóticos, lo cual se expresaba en el desarrollo menguado del embrión. Tampoco se puede descartar un efecto detergente de la ceramida. Esto podría corroborarse con un experimento de medición de permeabilidad membranal.

Considerando reportes recientes que mencionan por una parte a una proteína fosfatasa 2A que compite con la proteína 14-3-3 por el carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> (isoforma 2 de *Arabidopsis thaliana*) [Camoni *et al.* 2000, Fuglsang *et al.* 2006] y, por otra parte, el resultado de que la ceramida C<sub>18</sub> aumenta en un 580 % *in vitro* la actividad basal de la proteína fosfatasa 2A (de mamífero) [Chalfant *et al.* 1999], es posible que la CerC<sub>16</sub> (que muy probablemente esté siendo añadida a concentraciones muy por arriba de los niveles endógenos), estuviera estimulando una fosfatasa muy similar a la proteína fosfatasa 2A (PF2A), en los embriones de maíz que compitiera y desplazara del carboxilo terminal a la proteína 14-3-3 induciendo una baja actividad en la ATPasa de H<sup>+</sup>, de ahí que no se recuperaran los niveles de actividad de la enzima como se recuperaron cuando se añadió la CerC<sub>6</sub>, que quizás no sea capaz de activar a la fosfatasa.

Con respecto a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de tonoplasto y de fosfatasa presentes, en las VMP, el hecho de que ni la FB1 y las ceramidas modificaran la actividad de estas enzimas, implica que los efectos de la FB1 y las ceramidas observados son específicos para la ATPasa de H<sup>+</sup>. Cabe señalar que la PF2A no es inhibida por molibdato de sodio. Esta enzima es inhibida por el ácido okadaico con una IC<sub>50</sub> de 1-10 nM [Dobrowsky y Hannun 1992] y hasta el momento no hay ningún reporte en el que se mencione que esta fosfatasa sea inhibida por el otro inhibidor de fosfatasa usado en esta tesis.

## II. Incorporación de la ATPasa de H<sup>+</sup> a la MP

Desde los primeros reportes donde se sugería que la ATPasa de H<sup>+</sup> era una enzima integral de la MP que requería de lípidos para mantener su actividad [DuPont y Leonard 1980], hasta los reportes en los que se incluye a la ATPasa de H<sup>+</sup> como una enzima contenida en balsas lipídicas [Bagnat *et al.* 2001, Mongrand *et al.* 2004, Borner *et al.* 2005], resulta claro que es de capital importancia el ambiente lipídico de la ATPasa de H<sup>+</sup>. En nuestro sistema, por la evidencia utilizando a la FB1 para promover el desbalance de esfingolípidos y que resultó en una menor actividad de la enzima [Gutiérrez 2005], se exploró si la modificación del ambiente lipídico, que se tradujo en una menor disponibilidad de ceramida en la célula, estaba limitando la incorporación de la ATPasa de H<sup>+</sup> a la MP y por eso hubiera una menor actividad. Esto fue contemplado gracias a los trabajos con la ATPasa de H<sup>+</sup> de la MP de la levadura, en los que si la biosíntesis de ceramida se interrumpe, la exportación desde el retículo endoplásmico o el estado oligomérico de la ATPasa de H<sup>+</sup> (sintetizada de *novo*) en la MP, no se ven afectados [Lee *et al.* 2002]. Sin embargo, sí es necesaria la presencia de esfingolípidos con cadenas de ácidos grasos muy largas (26 átomos de carbono), para el envío, transporte estable y asociación de la ATPasa de H<sup>+</sup> recién sintetizada a las balsas lipídicas en la MP de la levadura [Gaigg *et al.* 2005, Gaigg *et al.* 2006].

En nuestro sistema, al estimar la cantidad de ATPasa en la MP por inmunoréplica, se obtuvo un valor de P = 0.3 después del análisis estadístico de los datos que indicaba que, la probabilidad de encontrar una diferencia entre el control y los tratamientos era poco probable con las condiciones establecidas, por lo cual se puede afirmar que no se encontró una diferencia significativa entre los niveles de la banda de 100 kDa analizadas por densitometría en los diferentes tratamientos que incluyeron a las MP de embriones expuestos a la FB1 y a la toxina más la Ceramida C<sub>6</sub>. En levadura, la permanencia y el recambio de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la MP depende de la presencia de CerC<sub>26</sub> endógena [Gaigg *et al.* 2006]. Por lo que sabemos en nuestro sistema, en el que hay ATPasa de H<sup>+</sup> presente en el embrión desde antes de empezar el periodo de imbibición [Sánchez-Nieto *et al.* 1998], quizás mucha de la ATPasa a las 24 h de imbibición apenas comience su recambio y el efecto estabilizador de la ceramida sería más bien en la permanencia en la MP, de la enzima sintetizada en el período de formación de la semilla. En futuros ensayos, se podría probar la obtención de VMP a tiempos después de las 24 h y ver si empieza a disminuir la cantidad de proteína cuando se adicionara FB1.

Lo que si podemos decir con nuestros datos es que a este tiempo de germinación (24 h), se está incorporando la misma cantidad de proteína a la MP tanto en las VMP control como en las VMP con FB1 y VMP con FB1 + CerC<sub>6</sub>, por lo cual, la disminución en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> causada por la FB1, no es debida a una menor cantidad de la enzima incorporada a la membrana plasmática.

### III. Fosforilación, FB1 y asociación de la proteína 14-3-3 con la ATPasa de H<sup>+</sup>.

Una de las formas de regulación de la ATPasa de H<sup>+</sup> es por medio de la unión de la proteína 14-3-3 al carboxilo terminal fosforilado. La disminución en la actividad inducida por FB1 podría deberse a una menor fosforilación de la enzima y por tanto, a una menor cantidad de la proteína 14-3-3 asociada a la enzima. Por lo que decidimos explorar la asociación de la proteína 14-3-3 por inmunodetección. El análisis estadístico de las densitometrías de la inmunoréplica, reveló un valor de P = 0.3 y al igual que en el caso de la ATPasa de H<sup>+</sup>, la probabilidad de que haya una diferencia entre la cantidad de la proteína 14-3-3 en las VMP control y las provenientes de embriones embebidos con 20 μM de FB1, era baja.

Nuestro estudio sugiere de que la fosforilación del carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> no se ve alterada por la presencia de FB1 en el medio. Sin embargo, hay que ser cautelosos en esta afirmación, pues se asume que el estado de fosforilación está directamente relacionado con la asociación de proteínas 14-3-3 y, si bien ésta es una versión muy aceptada en la literatura [Jahn *et al.* 1997, Baunsgaard *et al.* 1998, Svennelid *et al.* 1999 Maudoux *et al.* 2000, Kinoshita y Shimazaki 2002, Fuglsang *et al.* 2003, Kanczewska *et al.* 2006], hay que considerar que, en plantas, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la señalización que determina cuándo o cómo se llevará a cabo la fosforilación o defosforilación de la enzima todavía no está muy claro y por ejemplo, se ha propuesto que la ATPasa de H<sup>+</sup> está fosforilada en varios sitios [Nuhse *et al.* 2003], sin quedar claro el significado funcional de éstos. Además, se sabe muy poco de la cinasa o cinasas que intervienen en la fosforilación de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Hasta el momento, se ha sugerido una cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> [Lino *et al.* 1998], pero no hay nada concluyente. Se ha sugerido que la defosforilación de la ATPasa de H<sup>+</sup> puede estar mediado por proteínas G ante el ataque de un patógeno [Vera-Estrella *et al.* 1993] o por la acción de PF2A [Camoni *et al.* 2000, Fuglsang *et al.* 2006], la cual, como se mencionó anteriormente, ha sido sugerida como una fosfatasa activada por ceramida en mamíferos [Chalfant *et al.* 1999]. Adicionalmente, hay que admitir que la proteína 14-3-3 pudiera estar asociada a otras proteínas en la MP y de ser así, nuestra forma de detectarla, no nos permitiría distinguir cuánta estaría unida sólo a la ATPasa de H<sup>+</sup>. Por último, el anticuerpo heterólogo que estamos usando podría reconocer sólo a alguna(s) de la(s) isoformas presentes en maíz, ya que en *A. thaliana* se han identificado los genes correspondientes a 12 isoformas [Rosenquist *et al.* 2001, Paul *et al.* 2005].

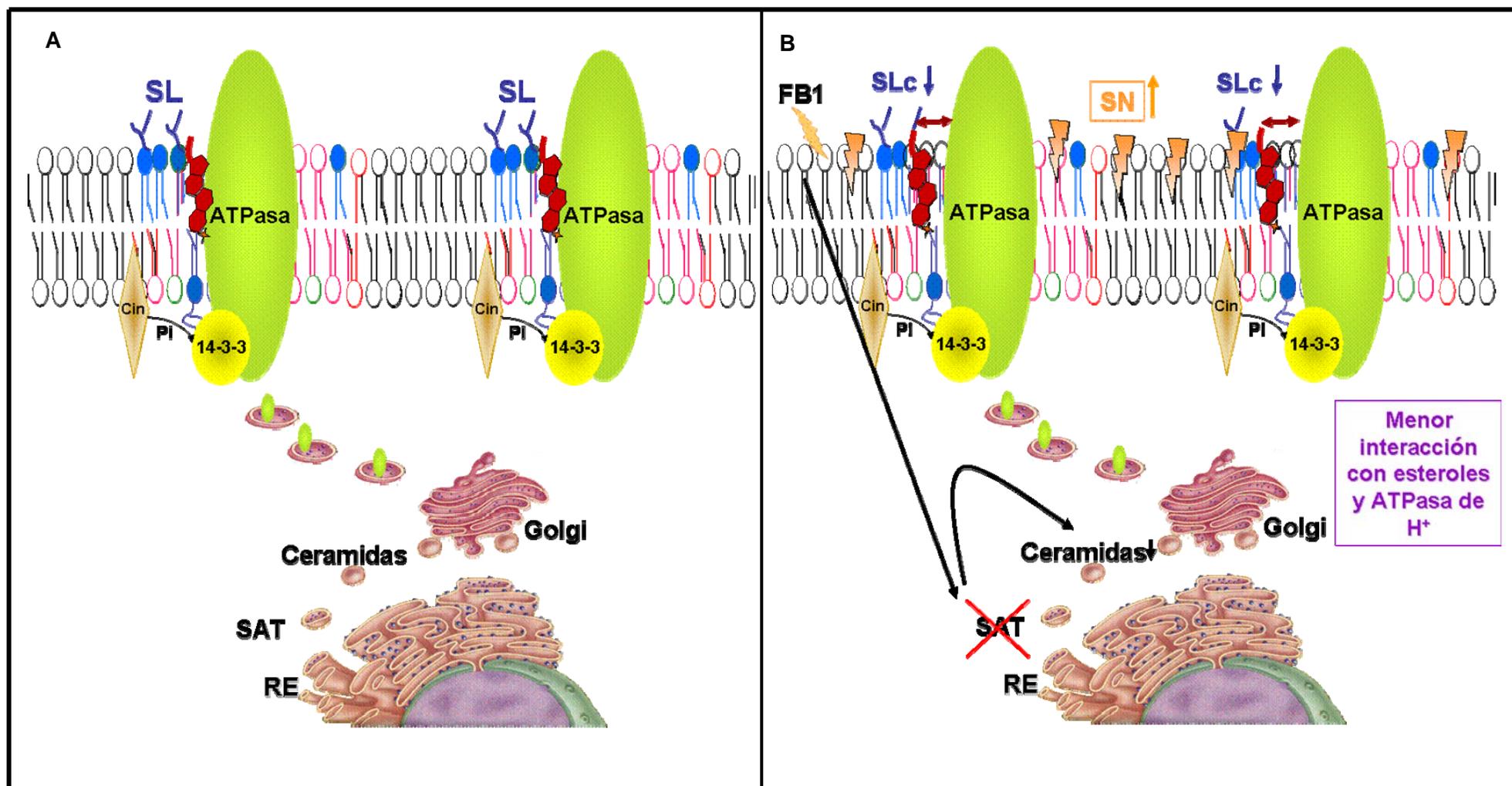
Hasta lo que nuestros datos nos dicen con el anticuerpo usado es que la disminución en la actividad de la enzima por la FB1, no está relacionada con cambios en su regulación por

fosforilación e interacción con la proteína 14-3-3. Experimentos en los que midiéramos la fosforilación de la proteína de manera directa nos podrían dar información inambigua.

#### **IV. Efecto de los esteroides endógenos sobre la actividad de la enzima**

La posibilidad de que la inhibición de la ATPasa de  $H^+$  debida a la falta de ceramida endógena estuviera relacionada con una interacción de la ceramida con los esteroides membranales que son importantes para la actividad de la enzima [Sandstrom y Cleland 1989, Cooke *et al* 1994, Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997, Hernández *et al.* 1998] se exploró removiendo los esteroides con M- $\beta$ -CD. Se encontró que la actividad de la ATPasa de  $H^+$  fue más sensible a la remoción de esteroides en las VMP de embriones tratadas con 20  $\mu$ M de FB1 en comparación con las VMP control. Estos resultados indican que aquellas MP en las que hay deficiencia de ceramida, por lo menos en aquellas regiones de la MP en las que hay ATPasa de  $H^+$ , son más susceptibles de perder a sus esteroides, lo cual se refleja en una disminución de la actividad de la enzima. Lo anterior sugiere que la ceramida contribuye a mantener a los esteroides membranales estructurados para la actividad de la enzima. Sin embargo, no se puede descartar que la ceramida membranal esté actuando directamente sobre la enzima y que esto le induzca a la proteína una mejor interacción con los esteroides. El reporte de que la ATPasa de  $H^+$  se encuentra en balsas lipídicas [Mongrand *et al.* 2004; Shaollari *et al.* 2004; Borner *et al.* 2005] que son estructuras lipídicas ricas en esteroides y esfingolípidos complejos [Simons e Ikonen 1997], apoya la interpretación de la asociación estructo-funcional entre la enzima, la ceramida y los esteroides. Por último, hay que tener en cuenta que los efectos que se ven asociados a ceramida, pueden estarse debiendo a esfingolípidos complejos, ya que la adición de FB1 conlleva a la disminución de estos lípidos, además de la ceramida.

En resumen, como se muestra en el modelo de la Fig. 19, el desbalance en los niveles de ceramida/esfingolípidos complejos causado por la acción de la FB1 sobre la SAT y que llevó a una inhibición del 25 % en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , no alteró los niveles de la enzima en la MP, ni parece haber afectado la asociación de la proteína 14-3-3 a la ATPasa. Sin embargo, este desbalance de ceramida/esfingolípidos complejos, facilitó la extractibilidad de los esteroides de la MP, lo cual sugiere que se modificó la interacción de estos lípidos con la enzima, afectando su actividad.



**Fig. 19 Modelo del efecto de la FB1 sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en embriones de maíz.** A: Sin la presencia de FB1 en el sistema. B: Con la presencia de FB1 en el sistema. Cin = cinasa, SN = esfinganina, SLC = esfingolípido complejo, RE = retículo endoplásmico, Pi = fósforo inorgánico, ↓ = disminución, ↑ = aumento, ↔ = movilidad.

## OBSERVACIONES

1. Se establecieron las condiciones experimentales para inmunodetectar a la ATPasa de H<sup>+</sup> y la proteína 14-3-3.
2. Se encontró que la disminución en ceramidas/esfingolípidos complejos endógenos no afectó la cantidad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la MP.

## CONCLUSIONES PARTICULARES

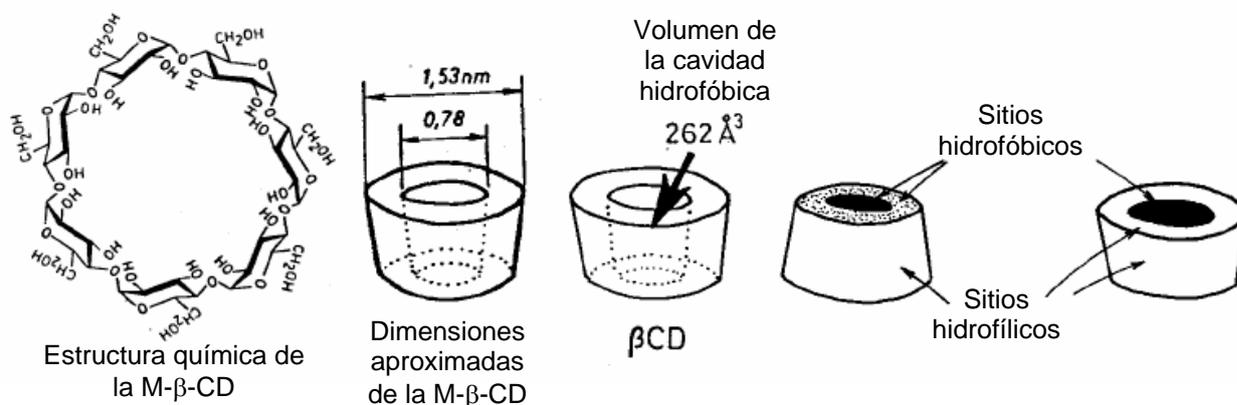
1. Se encontró que la disminución en ceramidas/esfingolípidos complejos no afectó los niveles de la proteína 14-3-3 en la membrana plasmática, por lo cual el estado de fosforilación de la ATPasa de H<sup>+</sup> no parece estar afectado.
2. Se encontró que la disminución en ceramidas/esfingolípidos complejos endógenos está relacionada con una mayor extractibilidad de los esteroides a la M-β-CD, lo cual sugiere que éstos pierden su distribución membranal, reflejándose en un cambio en la interacción con la ATPasa de H<sup>+</sup>, afectando su actividad.

## CONCLUSIÓN GENERAL

La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática aparentemente requiere de ceramida/esfingolípidos complejos para su función a través de una interacción de este lípido con la enzima y los esteroides.

## Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son sacáridos cíclicos formados por unidades de glucopiranosas en enlaces  $\beta(1,4)$ . Estos compuestos solubles contienen un núcleo hidrofóbico capaz de solubilizar sustancias no polares. Las  $\beta$ -ciclodextrinas, comparadas con las  $\alpha$ -ciclodextrinas (6 unidades de glucosa) y las  $\gamma$ -ciclodextrinas (8 unidades de glucosa) tienen alta afinidad por encapsular esteroides, en particular el colesterol. El máximo valor de asimilación (apagamiento) del colesterol por las  $\beta$ -ciclodextrinas, va desde 3.5 hasta 70 veces más que las reportadas con HDL<sub>3</sub> [Kilsdonk *et al.* 1995]. La M- $\beta$ -CD tiene un peso molecular de 1135 g/mol y como se muestra en la Fig. 10, tiene tanto propiedades hidrofílicas como hidrofóbicas. El mecanismo por el cual la M- $\beta$ -CD puede remover el esteroide de las membranas celulares está relacionado con la reducción de la energía de activación de 20 kcal/mol para la extracción del esteroide, requerida para remover el esteroide a los fosfolípidos aceptores, a un valor de 7-9 kcal/mol; esto se explica por el hecho de que para la transferencia del esteroide a los lípidos aceptores se necesita que el esteroide salga de la membrana para poder ser transferido posteriormente al lípido. En cambio en la M- $\beta$ -CD no se requiere de tal paso, ya que el esteroide se transfiere de manera directa sin que tenga que pasar por un ambiente hidrofílico [Yancey *et al.* 1996, Szejtli 1998], haciendo a las ciclodextrinas excelentes aceptores.



**Fig. 20 Representación de la M- $\beta$ -CD y algunas de sus propiedades físicas.**

Las ciclodextrinas en general tienen por tanto un excelente valor experimental para manipular la cantidad de esteroides membranales.

Se ha reportado que la M- $\beta$ -CD es preferible para los estudios de esteroides celulares, debido a que es menos susceptible a la precipitación del colesterol, es más efectiva en el secuestro de esteroides en un periodo de tiempo corto (8-24 h) y es efectiva para enriquecer y quitar esteroides a menores concentraciones que otras ciclodextrinas [Christian *et al.* 1997, Jouni *et al.* 2002].

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Abado-Becogne, K., Mobio, T.A., Ennamany, R., Fleurat-Lessard, F., Shier, W.T., Badria, F. y Creppy, E.E. Cytotoxicity of FB<sub>1</sub>: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. *Arch. Toxicol.* 72 (1998) 233-236
2. Abbas, H.K., Paul, R.N., Boyette, C.D., Duke, S.O. y Vesonder, R.F. Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* 70 (1992) 1824-1833
3. Abbas, H.K., Tanaka, T., Duke, S.O., Porter, J.K., Wray, E.M., Hodges, I., Sessions, A.E., Wang, E., Merrill, A.HJr. y Riley, R. Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 106 (1994) 1085-1093
4. Abbas, H.K., Duke, S.O., Merrill, A.HJr., Wang, E. y Shier, W.T. Phytotoxicity of Australifungin, AAL-toxins and FB<sub>1</sub> to *Lemna paucicostata*. *Phytochemistry* 8 (1998) 1509-1514
5. Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V.V. y Slayman, C.W. Biogenesis and function of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203 (2000) 155-160
6. Antipova, O.V., Bartova, L.M., Kalashnikova, T.S., Obroucheva, N.V., Voblikova, V.D. y Muromtsev, G.S. Fusicochin-induced cell elongation and endogenous fusicochin-like ligands in germinating seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 41 (2003) 157-164
7. Arango, M., Gévaudant, F., Oufattole, M. y Boutry, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of the gene subfamilies. *Planta* 216 (2003) 355-365
8. Auer, M., Scarborough, G.A. y Kuhlbrandt, W. Three-dimensional map of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the open conformation. *Nature* 392 (1988) 840-843
9. Bagnat, M., Chang, A. y Simons, K. Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 4129-4138
10. Barrantes, F. J. Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res. Rev.* 47 (2004) 71-95
11. Baudouin, M. y Boutry, M. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108 (1995) 1-6
12. Baunsgaard, L., Fuglsang, A.T., Jahn, T., Korthout, H.A.A.J., Boer, A.H. y Palmgren, M.G. The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to generate a fusicochin binding complex and a fusicochin responsive system. *Plant J.* 13 (1998) 661-671

13. Becker, D., Zeilinger, C., Lohse, G., Depta, H. y Hedrich, R. Identification and biochemical characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 190 (1993) 44-50
14. Bhat, R.A. y Panstruga, R. Lipid rafts in plants. *Planta* 223 (2005) 5-19
15. Binzel, M.L. NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase message in tomato. *Physiol. Plant.* 94 (1995) 722-728
16. Blumwald, E., Aharon, G.S. y Lam, B.C-H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 342-346
17. Bohn, M., Heinz, E. y Lüthje, S. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 387 (2001) 35-40
18. Borch, J., Bych, K., Roepstorff, P., Palmgren, M.G., y Fuglsang, A.T. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 411-415
19. Borner, G.H.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., MacAskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H. Lilley, K.S. y Dupree, P. Analysis of detergent resistant membranes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137 (2005) 104-116
20. Brauer, D. y Tu, S.I. Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol.* 89 (1989) 867-874
21. Briskin, D.P., Leonard, R.T., y Hodges, T.K. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148 (1987) 542-568
22. Briskin, D.P. y Niesman-Reynolds, I. Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.* 90 (1989) 394-397
23. Briskin, D.P. y Poole, R.J. Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate. *Plant Physiol.* 71 (1983) 507-512
24. Briskin, D.P., Thornely, W.R. y Rotti-Rotti, J.L. Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol.* 78 (1985) 642-644
25. Camoni, L., Iori, V., Marra, M. y Aducci, P. Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9919-9923
26. Chalfant, C.E., Kishikawa, K., Mumby, M.C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. y Hannun, Y.A. Long chain ceramides activated protein phosphatase-1 and protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20313-20317
27. Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C. y Rothblat, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* 38 (1997) 2264-2272
28. Chung, J.H., Lester, R.L. y Dickson, R.C. Sphingolipid requirement for generation of a functional V<sub>1</sub> component of the vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 28872-28881

29. Cocucci, M.C. y Marrè, E. Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate-inhibited,  $Mg^{2+}$ -ATPase from radish microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 771 (1984) 42-52
30. Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D.M., Ebel, C., le-Maire, M. y Karlish, S.J.D. Purification of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16610-16618
31. Cooke, D.T., Burden, R.S., James, C.S., Seco, T. y Sierra B. Influence of sterol on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (1994) 769-773
32. Cowan, D.S.C., Cooke, D.T., Clarkson, D.T. y Hall, J.L. Lipid and sterol composition of plasma membranes isolated from stele and cortex of maize roots. *J. Exp. Bot.* 44 (1993) 991-994
33. De-Nisi, P., Dell'Orto, M., Pirovano, L. y Zocchi, G. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane  $H^+$ -ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 209 (1999) 187-194
34. Dobrowsky, R.T. y Hannun, Y.A. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5048-5051
35. Dowhan, W., Mileykovskaya, E. y Bogdanov, M. Diversity and versatility of lipid-protein interaction revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 19-39
36. DuPont, F.M. y Leonard, R.T. Solubilization and partial purification of the adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. *Plant Physiol.* 65 (1980) 931-938
37. Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 414-418
38. Enríquez-Arredondo C., Sánchez-Nieto, S., Rendón-Huerta, E., González-Halphen, D., Gavilanes-Ruiz, M. y Díaz-Pontones, D. The plasma membrane  $H^+$ -ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Sci.* 169 (2005) 11-19
39. Ephritikhine, G., Ferro, M. y Rolland, N. Plant membrane proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42 (2004) 943-962
40. Fantini, J. How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *Cell Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1027-1032
41. Ferrante, M.C., Meli, R., Mattace-Raso, G., Esposito, E., Severino, L., Di-Carlo, G. y Lucisano, A. Effect of fumonisin B1 on structure and function of macrophage plasma membranes. *Toxicol. Lett.* 129 (2002) 181-187

42. Ferreira, T., Brett-Mason, A. y Slayman, C.W. The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29613-29616
43. Frías, I., Caldeira, M.T., Pérez-Castiñeira, J.R., Navarro-Aviñó, J.P., Culiñez-Maciá, F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pagés, M., Hager, A. y Serrano, R. A mayor isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8 (1996) 1533-1544
44. Fu, H., Subramanian, R. y Masters, S.C. 14-3-3 Proteins: Structure function and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40 (2000) 617-647
45. Fuglsang, A.T., Borch, J., Bych, K., Jahn, T.P., Roepstorff, P. y Palmgren, M.G. The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42266-42272
46. Fuglsang, A.T., Tulinius, G., Cui, N. y Palmgren, M.G. Protein phosphatase 2A scaffolding subunit A interacts with plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase C-terminus in the same region as 14-3-3 protein. *Physiol. Plant.* 128 (2006) 334-340
47. Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L y Schneiter, R. Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase of the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22515-22522
48. Gaigg, B., Toulmay, A. y Schneiter, R. Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids *per se* are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 34135-34145
49. Gomès, E., Venema, K., Simon-Plas, F., Milat, M.L., Palmgren, M.G. y Blein, J.P. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS* 398 (1996) 48-52
50. González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. y Gavilanes-Ruíz, M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal. Biochem.* 200 (1992) 235-238
51. Gouaux, E. y White, S.H. Membranes. Lipids lost, lipids regained. *Struc. Biol.* 11 (2001) 393-396
52. Grandmougin-Ferjani, A., Schuller-Muller, I. y Hartmann, M.A. Sterol modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol.* 113 (1997) 163-174
53. Grassmé, H., Jendrossek, A., Riehle, G., von Kürthy, J., Berger, H., Schwarz, M., Weller, R., Kolesnick, R. y Gulbins, E. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature Med.* 9 (2003) 322-330

54. Gutiérrez, N.N. Interacción de la Fumonisina B1 con la membrana plasmática: Efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado. (2005) Fac. Química. UNAM.
55. Gutiérrez, N.N., Enríquez-Arredondo, C., Garibay, F.J., Palacios-Bahena, S. y Gavilanes-Ruíz, M. La membrana plasmática y su importancia durante la patogénesis en plantas. En *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas* (I. Bernal-Lugo y H. Loza-Tavera, eds), (2001) pp. 55-73. Facultad de Química, UNAM, México
56. Gutiérrez, N.N., Muñoz-Clares, R.A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J. y Gavilanes-Ruíz, M. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 221 (2005) 589-596
57. Hannun, Y.A. y Obeid, L.M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25847-25850
58. Hernández, A., Cooke, D.T. y Clarkson, D.T. Effects of abnormal-sterol accumulation on *Ustilago maydis* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase stoichiometry and polypeptide pattern. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 412-415
59. Holthuis, J.C.M. y Levine, J.P. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 209-220
60. Hopkins, W. G. *Introduction to Plant Physiology*. 1ª edición. (1995) John Wiley & Sons. New York. pp. 1-20, 285-309
61. <http://www.arabidopsis.org/>
62. <https://www.genevestigator.ethz.ch/>
63. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. y Sandhoff, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485 (2000) 63-99
64. Jahn, T., Dietrich, J., Andersen, B., Leidvik, B., Otter, C., Briving, C., Kühlbrandt, W. y Palmgren, M.G. Large scale expression, purification and 2D crystallization of recombinant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 465-476
65. Jahn, T., Fuglsang, A.T., Olsson, A., Brüntrup, I.M., Collinge, D.B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M.G. y Larsson, C. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell* 9 (1997) 1805-1814
66. Jain, M.K. y White, H. Long range order in biomembranes. *Adv. Lipid Res.* 15 (1977) 1-60
67. Jergensen, P.L. y Andersen, J.P. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J. Membr. Biol.* 103 (1988) 95-120
68. Jouni, Z.E., McGill, B. y Wells, M.A.  $\beta$ -Cyclodextrin facilitates cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body and midgut *in vitro*. *CBP part B* 132 (2002) 699-709

69. Kanczewka, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J.L. y Boutry, M. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 11675-11680
70. Kilsdonk, E.P.C., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C. y Rothblat, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17250-17256
71. Kinoshita, T. y Shimazaki, K.I. Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 18 (1999) 5548-5558
72. Kinoshita, T. y Shimazaki, K.I. Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding activation of the guard-cell plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by blue light. *Plant Cell Physiol.* 43 (2002) 1359-1365
73. Lambeth, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Rev.* 4 (2004) 181-189
74. Larsson, C., Sommarin, M. y Widell, S. Isolation of highly purified plant plasma membrane separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* 228 (1994) 451-469
75. Lee, M.C.S., Hamamoto, S. y Schekman, R. Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22395-22401
76. Lefebvre, B., Batoko, H., Duby, G. y Boutry, M. Targeting of a *Nicotiana plumbaginifolia* H<sup>+</sup>-ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. *Plant Cell* 16 (2004) 1772-1789
77. Lehninger, A., Nelson, D.L., and Cox, M.M. *Principios de Bioquímica*. 2ª edición (1993) Omega. Madrid. pp. 268-281
78. Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H. y Greenberg, J.T. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* 17 (2003) 2636-2641
79. Lino, B., Baizabal-Aguirre, V.M. y González de la Vara, L.E. The plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 204 (1998) 352-359
80. Lukaszewicz, M., Jérrouville, B. y Boutry, M. Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene. *Plant J.* 14 (1998) 413-423
81. Malerba, M., Crosti, P., Cerana, R. y Bianchetti, R. Fusaric acid affects cytochrome c leakage and cytosolic 14-3-3 accumulation independent of H<sup>+</sup>-ATPase activation. *Physiol. Plant.* 120 (2004) 386-394

82. Marra, M., Fogliano, V., Zambardi, A., Fullone, M.A., Nasta, D. y Aducci, P. The H<sup>+</sup>-ATPase purified from maize roots plasma membranes retains fusicoccin *in vivo* activation. FEBS Lett. 382 (1996) 293-296
83. Marra, M., Fullone, M.R., Fogliano, V., Pen, J., Mattei, M., Masi, S. y Aducci, P. The 30-kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3-like protein. Plant Physiol. 106 (1994) 1497-1501
84. Marrè, E. Fusicoccin: a tool in plant physiology. Annu. Rev. Plant Physiol. 30 (1979) 273-288
85. Maudoux, O., Batoko, H., Oecking, C., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Boutry, M. y Morsomme, P. A plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. J. Biol. Chem. 275 (2000) 17762-17770
86. Maxfield, F.R. y Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature 438 (2005) 612-621
87. Merrill, A.H.Jr., Cameron-Sullards, M., Wang, E., Voss, K.A. y Riley, R.T. Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. Environ. Health Perspect. 109 (2001) 283-289
88. Merrill, A.H.Jr., Schmelz, E-M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A. y Wang, E. Symposium Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. Toxicol. Appl. Pharmacol. 142 (1997) 208-225
89. Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P. Hartmann, M.A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. y Bessoule, J.J. Lipid rafts in higher plants cells. J. Biol. Chem. 279 (2004) 36277-36286
90. Monk, B.C., Mason, A.B., Abramochkin, G., Haber, J.E., Seto-Young, D. y Perlin, D.S. Biochim. Biophys. Acta 1239 (1995) 81-90
91. Moriau, L., Bogaerts, P., Jonniaux, J.L. y Boutry, M. Identification and characterization of a second plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene subfamily in *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Mol. Biol. 21 (1993) 955-963
92. Morsomme, P. y Boutry, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. Biochim. Biophys. Acta 1465 (2000) 1-16
93. Niu, X., Narasimhan, M.L., Salzman, R.A., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. NaCl regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. Plant Physiol. 103 (1993) 713-718
94. Nuhse, T.S., Stensballe, A., Jensen, O.N. y Peck, S.C. large scales analysis of *in vivo* phosphorylated membrane proteins by immobilized ion affinity chromatography and mass spectrometry. Mol. Cell Proteomics. 2 (2003) 1234-1243

95. Obroucheva, N.V. y Antipova, O.V. The role of water uptake in the transition of recalcitrant seeds from dormancy to germination. *Russ. J. Plant Physiol.* 51 (2004) 848-856
96. Olivari, C., Meanti, C., De-Michelis, M.I. y Rasi-Caldogno, F. Fusicoccin binding to its membrane receptor and the activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 116 (1998) 529-537
97. Olsson, A., Johansson, F., Sommarin, M. y Larsson, C. Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant J.* 8 (1995) 959-962
98. Olsson, A., Svennelid, F., Ek, B., Sommarin, M. y Larsson, C. A phosphothreonin residue at the C-terminal end of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol.* 118 (1998) 551-555
99. Ookura, T., Wada, M., Sakakibara, Y., Jeong, K.H., Maruta, I., Kawamura, Y. y Kasamo, K. Identification and characterization of a family of genes of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol.* 35 (1994) 1251–1256
100. Ouffatole, M., Arango, M. y Boutry, M. Identification and expression analysis of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes encoding isoforms of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, one of which is induced by mechanical stress. *Planta* 210 (2000) 715–722
101. Palmgren, M.G. Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity. *Physiol. Plant.* 83 (1991) 314-323
102. Palmgren, M.G. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001) 817-845
103. Palmgren, M.G., Buch-Pedersen, y Møller, A.L. Mechanism of proton pumping by plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Role of residues in transmembrane segments 5 and 6. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986 (2003) 188-197
104. Palmgren, M.G. y Christensen, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3027-3033
105. Parets-Soler, A., Pardo, J.M. y Serrano, R. Immunocytolocalization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 93 (1990) 1654-1658
106. Paul, A.L., Sehnke, P.C. y Ferl, R. Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* seem to be driven by client interaction. *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 1735-1743
107. Perez, C., Michelet, B., Ferrant, V., Bogaerts, P. y Boutry, M. Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1204–1211

108. Peskan, T., Westermann, M. y Oelmüller, R. Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6989-6995
109. Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346-356
110. Petty, R.H. *Molecular Biology of Plants. Structure and Function.* 1ª edición. (1993) Plenum Press. New York. pp. 7-49
111. Pomes, R. y Roux, B. Molecular mechanism of H<sup>+</sup> conduction in the single-file water chain of the gramicidin channel. *Biophys. J.* 82 (2002) 2304-2316
112. Portillo F. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 31-42
113. Ramos, R.S., Caldeira, M.T., Arruda, P. y de-Meis, L. The two Km's for ATP of corn-root H<sup>+</sup>-ATPase and the use of glucose-6-phosphate and hexokinase as an ATP-regenerating system. *Plant Physiol.* 105 (1994) 250-253
114. Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichorn, S.E. *Biology of Plants.* 5ª edition (1992) Worth Publisher. New York. Pp. 18, 19, 55-57
115. Regenber, B., Villalba, J.M., Lanfermeijer, F.C. y Palmgren, M.G. C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plasma membrane. *Plant Cell* 7 (1995) 1655-1666
116. Robert, G. y Beaugé, L. Complex ATP-activation kinetics of plant H<sup>+</sup>-transporting ATPase may or may not require two substrate sites. *Eur. J. Biochem* 246 (1997) 228-232
117. Robert, G., Berberían, G. y Beaugé, L. Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H<sup>+</sup>-ATPase from higher plants. *Plant Physiol.* 108 (1995) 813-819
118. Roberts, M.R. y Bowles, D.J. Fusicocin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* 119 (1999) 1243-1250
119. Robertis, E.D.P. y Robertis, E.M.F. *Biología Celular y Molecular.* 10ª edición (1981) El Ateneo. Buenos Aires. pp. 129-168
120. Roberts, M.R., Salinas, S. y Collinge, D. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol. Biol.* 1031 (2002) 1031-1039
121. Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C. y Sommarin, M. Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiol.* 127 (2001) 142-149
122. Ryyppö, A., Vapaavuori, E.M., Rikala, R., y Sutinen M.L. Fatty acid composition of microsomal phospholipids and H<sup>+</sup>-ATPase activity in the roots of Scots pine seedlings grown at different root temperatures during flushing. *J. Exp. Bot.* 45 (1994) 1533-1539

123. Sánchez-Nieto, S., Gómez-Puyou, M.T., Rodríguez-Sotres, R., Carballo, A. y Gavilanes-Ruiz, M., Comparison of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 1413 (1998) 175-187
124. Sandstrom, R.P. y Cleland, R.E. Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol.* 90 (1989) 1524-1531
125. Schägger, H. y Von-Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368-379
126. Schaller, A., y Oecking, C. Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense in tomato plants. *Plant Cell* 11 (1999) 263-272
127. Serrano, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 61-94
128. Seto-Young, D., Monk, B., Mason, A.B. y Perlin, D.S. Exploring and antifungal target in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 1326 (1997) 249-256
129. Shaollari, B., Peskan-Berghöfer, T. y Oelmüller, R. Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant.* 122 (2004) 397-403
130. Shin, J.S. Gao, Z.M. y Abraham, S.N. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cell. *Science* 289 (2000) 785-788
131. Simon-Plas, F., Gomès, E., Milat, M.L., Pugin, A. y Blein, J. P. *Cercospora beticola* Toxins. X Inhibition of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by beticolin 1. *Plant Physiol.* 111 (1996) 773-779
132. Simons, K. y Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (1997) 569-572
133. Simons, K. y Toomre, D. Lipid rafts a signaling transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31-39
134. Singer, J.S. Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev. Physiol.* 66 (2004) 1-27
135. Sondergaard, T.E., Schulz, A. y Palmgren, M.G. Energization of transport processes in plants. Role of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 136 (2004) 2475-2482
136. Soriano, J.M., González, L. y Catalá, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 345-356
137. Stryer L., Berg J.M. y Tymoczko J.L., *Bioquímica* 5ª edición. (2003) Reverté. Barcelona. pp. 319-343

138. Suzuki, Y.S., Wang, Y. y Takemoto, J.Y. Syringomycin-stimulated phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from red beet storage tissue. *Plant Physiol.* 99 (1992) 1314-1320
139. Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oecking, C. y Sommarin, M. Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11 (1999) 2379-2391
140. Sze, H., Li, X. y Palmgren, M.G. Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11 (1999) 677-689
141. Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743-1753
142. Tanimoto, E. Regulation of root growth by plant hormones-Roles for auxins and gibberellin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24 (2005) 249-265
143. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. y Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405 (2000) 647-655
144. Van-Blitterswijk, W.J., Van-Der-Luit, A.H., Veldman, R.J., Verheij, M. y Borst, J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* 369 (2003) 199-211
145. Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Higgins, V.J. y Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiol.* 104 (1994) 209-215
146. Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, J., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T.A. y Damjanovich, S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 8053-8058
147. Villalba, J.M. Lützelshwab, M. y Serrano, R. Immunocytolocalization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves. *Planta* 185 (1991) 458-461
148. Wada, M., Takano, M. y Kasamo, K. Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 99 (1992) 794-795
149. Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.H., Riley, R.T. y Merrill, A.H.Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implication for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 14486-14490
150. Xing, T., Higgins, V.J. y Blumwald, E. Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell* 8 (1996) 555-564

151. Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. y London, E. Effect of the structure of natural sterol and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipids/sterol domain (raft). *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33540-33546
152. Yan, F., Feuerle, R., Schäffer, S., Fortmeier, H. y Schubert, S. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiol.* 117 (1998) 311–319
153. Yancey, P.G., Rodriguez, W.V., Kilsdonk, E.P.C., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C. y Rothblat, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 16026-16034
154. Yin, J.J., Smith, M.J., Eppley, R.M., Page, S.W. y Sphon, J.A. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1371 (1998) 134-142
155. Zagoya, J.C.D. y Hicks-G. J.J. *Bioquímica 2ª edición* (1995) Interamericana McGraw-Hill. México D.F. pp. 143-184
156. Zhang, J.S., Xie, C., Li, Z.Y. y Chen, S.Y. Expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene in response to salt stress in a rice salt-tolerant mutant and its original variety. *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 1006–1011
157. Zhang, W., Campbell, H. A., King, S. C. y Dowhan, W. Phospholipids as determinants of membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 26032-26038
158. Zhao, R., Dielen, V., Kinet, J.M. y Boutry, M. Co-suppression of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell* 12 (2000) 535-546