



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

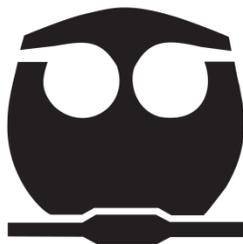
PAPEL DE LA REGIÓN DEL CARBOXILO TERMINAL EN LA  
ACTIVIDAD DE LA ATPASA DE  $H^+$  DE LA MEMBRANA  
PLASMÁTICA DE PLANTAS CON MENOR CONTENIDO DE  
ESFINGOLÍPIDOS

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FRANCISCO MORALES CEDILLO



MÉXICO, D.F. FEBRERO 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**PRESIDENTE:** Profesor: RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

**VOCAL:** Profesor: MARINA GAVILANES RUIZ

**SECRETARIO:** Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

**1er. SUPLENTE:** Profesor: REBECA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

**2° SUPLENTE:** Profesor: MARIA ELENA IBARRA RUBIO

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LAB. 101, CONJUNTO E, DPTO. DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. MARINA GAVILANES RUÍZ**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE (S):**

**FRANCISCO MORALES CEDILLO**

\_\_\_\_\_

RECONOCIMIENTOS

A la Q.F.B. Ma. del consuelo Enríquez Arredondo por la obtención de las vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E.U.) por proporcionarnos las semillas de *Arabidopsis thaliana* usadas en este trabajo.

\*\*\*\*\*

Francisco Morales Cedillo realizó esta tesis de licenciatura gracias a una beca de la DGAPA, dentro del programa PAPIIT (No. IN211409) y al apoyo otorgado por el Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química a través del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”

\*\*\*\*\*

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de CONACYT a través del proyecto 101521, y de la DGAPA (UNAM), a los proyectos PAPIIT IN211409 e IN2108.

AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero agradecer a Dios por permitirme llegar hasta este punto de mi vida.*

*Le agradezco también a mis padres, Catalina Cedillo Cárdenas y Félix Morales Martínez, por su cariño y apoyo incondicional, pero en especial a mi mamá por sus consejos, sus desvelos y por todo el esfuerzo que ha hecho para ayudarme llegar a ser lo que soy.*

*A mis hermanos, mi abuelito Daniel, tíos y primos por creer siempre en mí y en lo que soy capaz de hacer.*

*A mis AMIGOS: Dora, Kuky, Dani, Rubén, Claudia, Cinthya Rocío, Titina y Atzin, gracias por todos los momentos que pasamos y que pasaremos juntos, por su apoyo incondicional, pero sobre todo por estar conmigo en estos años, simplemente muchas Gracias.*

*A mis amigos de primer semestre: Citlalli, Paty, Aldo, Saúl, Edna, Thalia, por su valiosa amistad, por su apoyo y su confianza en mí, Gracias.*

*También quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio 101: Fernanda, Doris, Arturo, Lupita y Ari, por su compañía, su ayuda, sus consejos y por hacer entretenida la estancia en el laboratorio. Así como a la QFB Ma. Consuelo Enríquez por su infinita paciencia, por sus consejos y enseñanza.*

*De manera muy especial agradezco a la Dra. Marina Gavilanes, por su apoyo, sus consejos, la confianza que me ha brindado, por la formación académica que de ella he recibido hasta este punto de mi vida.*

*Por último agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de ella y de esta maravillosa Facultad de Química, gracias por todas las oportunidades brindadas.*

ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. Estructura de la membrana plasmática de plantas.....	2
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Lípidos de la Membrana Plasmática.....	3
1.2.1 Glicerofosfolípidos.....	4
1.2.2 Esfingolípidos.....	4
1.2.2.1 Biosíntesis de <i>novo</i> de esfingolípidos.....	4
1.2.2.2 Funciones de los esfingolípidos en plantas.....	5
1.2.3 Esteroles.....	6
2. ATPasa de H <sup>+</sup> de la Membrana Plasmática.....	6
2.1 Estructura.....	7
2.2 Función catalítica.....	9
2.3 Papel fisiológico en las plantas.....	9
2.4 Regulación de la actividad de la ATPasa de H <sup>+</sup> .....	11
2.4.1 Por expresión diferencial de isoformas.....	11
2.4.2 Regulación por fosforilación.....	11
2.4.3 Regulación por oligomerización.....	12
2.4.4 Regulación por lípidos membranales.....	12
3. Interacción lípidos membranales-ATPasa de H <sup>+</sup> .....	13
3.1 Efecto de detergentes.....	14
3.2 Efecto de glicerolípidos.....	15
3.3 Efecto de esteroles.....	15
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	18
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	18
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
1. Material biológico.....	19
2. Metodología general.....	20
3. Germinación y crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
3.1 Crecimiento hasta plantas adultas.....	21

4. silenciamiento génico del gene de la subunidad LCB2b de la SPT.....	23
5. Obtención de parte aérea de plántulas y preparación de homogenado para la obtención de su fracción microsomal.....	23
6. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
6.1 Obtención de fracción microsomal.....	25
6.2 Obtención de vesículas de membrana plasmática.....	25
7. Determinación de proteína por el método de Lowry.....	25
8. Determinación de hidrólisis de ATP.....	25
9. Determinación de fostato inorgánico por el método de Chifflet modificado.....	26
10. Determinación del efecto de la lisofosfatidilcolina (LPC) en la hidrólisis de ATP de la ATPasa de H <sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
11. Proteólisis controlada de vesículas de membrana plasmática por diferentes tiempos....	27
11.1 Determinación de hidrólisis de ATP en las muestras digeridas con tripsina.....	28
11.2 Determinación del patrón de digestión de proteínas por electroforesis en geles de acrilamida.....	28
12. Preparación de geles de acrilamida.....	28
13. Tinción de geles con plata (Método de Vorum).....	30
14. Secado de geles.....	31
15. Inmunoréplica.....	31
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	33
1. Efectos fenotípicos del silenciamiento de la subunidad LCB2b en plantas adultas de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> .....	33
2. Optimización de las condiciones de medición de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H <sup>+</sup> .....	35
3. Reproducción de los resultados de medición de actividad de hidrólisis de ATP de las líneas silvestre, <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> .....	37
4. Establecimiento de las condiciones óptimas para medir la activación de la ATPasa de H <sup>+</sup> de MP por LPC.....	41
5. Determinación de la activación de la ATPasa de H <sup>+</sup> de membrana plasmática por LPC.....	42
6. Establecimiento de las condiciones óptimas para medir la activación de la ATPasa de H <sup>+</sup> de membrana plasmática por digestión con tripsina.....	45

7. Proteólisis de la ATPasa de H <sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática de las líneas silvestre, <i>Atlcb2a-1</i> y de la línea mutante silenciable <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> con o sin inducción.....	48
8. Medición de la activación de la ATPasa de H <sup>+</sup> de membrana plasmática por proteólisis con tripsina.....	50
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	54
1. Efecto fenotípicos del silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b en plantas adultas de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> .....	55
2. Actividad de ATPasa de H <sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con diferente contenido de esfingolípidos.....	56
3. Papel de la región del carboxilo terminal en la activación de la ATPasa de H <sup>+</sup> de membrana plasmática de una línea con menor contenido de esfingolípidos.....	57
<b>X CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>XI. PERSPECTIVAS</b> .....	66
<b>XII. APÉNDICE</b> .....	67
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	69

**RESUMEN**

La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas es una enzima que es esencial para el funcionamiento vegetal, ya que participa en todas las fases del desarrollo de las plantas. Por ello, es una enzima que está sujeta a muchas formas de regulación, entre las que se hallan mecanismos transcripcionales y traduccionales, post-traduccionales (fosforilación-desfosforilación), interacción con proteínas específicas, con toxinas de patógenos y con lípidos membranales. Una de las regiones de la estructura terciaria de la enzima que parece tener más importancia en la regulación de su actividad es la parte del carboxilo terminal misma que tiene un efecto autoinhibitorio en la catálisis de la enzima.

En nuestro laboratorio se ha encontrado que en la línea de *Arabidopsis thaliana* *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (que tiene un contenido 34% menor de esfingolípidos totales en comparación con la silvestre), la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> está aumentada alrededor de un 100% con respecto a la actividad de la enzima de las plantas controles y tiene una  $V_{max}$  mayor que la de la enzima control. Se desconoce si hay desplazamiento de la región del carboxilo terminal durante esta activación. Por ello, el objetivo de este trabajo es determinar si en estas plantas con la enzima de actividad aumentada, la región carboxilo terminal está involucrada. Para cumplir el objetivo, utilizamos plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0), tanto del genotipo silvestre, como de la línea mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Se obtuvieron las vesículas de membrana plasmática de estas plantas y en ellas se evaluaron los efectos de agentes que perturban a la región del carboxilo terminal como la lisofosfatidilcolina y la tripsina. Se midió la actividad enzimática posteriormente, midiendo la hidrólisis de ATP.

Los resultados obtenidos revelan que en las plantas de las líneas control la actividad enzimática se incrementa alrededor de un 50% al ser expuestas a la lisofosfatidilcolina o un 100% al ser tratadas con tripsina, mientras que en la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, la actividad ya no se estimula, indicando que la región del carboxilo terminal de la enzima está involucrada en el aumento de la actividad de la enzima.

**INTRODUCCIÓN****1. Estructura de la membrana plasmática de plantas****1.1 Generalidades**

Las membranas biológicas son barreras de permeabilidad muy selectivas, que crean compartimentos cerrados que definen el interior y exterior de una célula completa (membrana plasmática o membrana externa) o de orgánulos intracelulares. La composición química de la membrana plasmática como cualquier otra membrana biológica es diversa y depende de la especie y de la célula, pero principalmente está compuesta de lípidos, proteínas y carbohidratos [Stryer y col., 2004]

La estructura de la membrana plasmática se basa en dos monocapas de lípidos contrapuestas entre sí, formando una estructura laminar continua (bicapa lipídica), el centro de la bicapa es de naturaleza hidrofóbica y las superficies de sus dos caras son hidrofílicas, las dos caras de la membrana son asimétricas entre sí, es decir, su composición es diferente cuantitativa y cualitativamente. La bicapa es estable, mantenida por las interacciones hidrofóbicas cooperativas entre los lípidos. Las proteínas membranales, tienen organización y orientación muy precisas en la bicapa, y contribuyen a regular las composiciones moleculares e iónicas de los compartimentos que delimitan. Los carbohidratos contenidos en la membrana están unidos covalentemente a lípidos (glicolípidos) o a proteínas (glicoproteínas), dichos carbohidratos se encuentran localizados en la cara no citosólica de la bicapa en el caso de la membrana plasmática [Alberts y col., 1994; Callen, 2000; Stryer y col., 2004].

**1.2 Lípidos de la Membrana Plasmática**

Los principales lípidos membranales son glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides y terpenos. Estos se pueden clasificar de acuerdo a su contenido de ácidos grasos: saponificables o lípidos complejos (contienen ácidos grasos en su estructura) que es el caso de los glicerofosfolípidos y esfingolípidos, y no saponificables o lípidos simples (no tienen ácidos grasos en su estructura) en el cual se encuentran los esteroides y terpenos. Todos los lípidos membranales son anfipáticos, es decir, tienen una parte polar o hidrofílica y otra no polar que están muy delimitadas espacialmente en la estructura del lípido.

### **1.2.1 Glicerofosfolípidos**

Un glicerofosfolípido está constituido por un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y un alcohol fosforilado. Los grupos hidroxilo en los átomos C1 y C2 del glicerol están esterificados por los grupos carboxilo de las cadenas de los ácidos grasos. El grupo hidroxilo del C3 del glicerol se esterifica con ácido fosfórico. El compuesto resultante se denomina fosfatidato o diacilglicerol 3-fostato, que es el glicerofosfolípido más simple y que en las membranas sólo se encuentra en pequeñas cantidades. Sin embargo, el fosfatidato es un intermediario clave en la biosíntesis de otros glicerofosfolípidos. El grupo fosfato del fosfatidato se esterifica con el grupo hidroxilo de uno o varios alcoholes, como puede ser la etanolamina, la colina, el glicerol o el inositol, dando lugar a la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina, el difosfatidilglicerol y el fosfatidilinositol, respectivamente [Stryer y col., 2004].

Los ácidos grasos suministran la barrera hidrofóbica, mientras que el resto de la molécula tiene propiedades hidrofílicas que le permiten a la membrana interactuar con el entorno. En algunos glicerofosfolípidos de la membrana, las cadenas de ácidos grasos que se encuentran en el C1 están saturadas conteniendo de 16 a 18 carbonos, mientras que las cadenas que se ubican en el C2 frecuentemente están insaturadas. Su grado de insaturación contribuye a la fluidez de la membrana, influyendo en la inserción y degradación de proteínas [Luckey, 2008].

### **1.2.2 Esfingolípidos**

Los esfingolípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi (incorporación del fosfatidilinositol a la ceramida). En el caso de los mamíferos, la esfingomielina es el principal esfingolípidos presente en la célula, mientras que en tejidos vegetales, las glicosil-inositol-fosfoceramidas (GIPCs) y las glicosilceramidas (GlcCer) son los esfingolípidos complejos de mayor proporción en la célula. Los esfingolípidos vegetales basan su complejidad y diversidad en numerosas combinaciones posibles de ácidos grasos (pudiendo variar su longitud o características de hidroxilación o insaturación tanto en número y posición de la modificación), bases esfingoideas y el grupo polar (cabeza).

Los esfingolípidos tienen como esqueleto base a la esfingosina, un alcohol aminado de cadena larga o base de cadena larga (BCL) o base esfingoidea formado predominantemente por 18 átomos de carbono, la cual presenta un grupo amino en el C2 y

un grupo hidroxilo en el C1 y C3. Las BCL pueden llegar a presentar dobles enlaces en los carbonos en posición 4 u 8. El grupo amino de la BCL es acilado con un ácido graso de entre 14 a 26 átomos de carbono, formando así la ceramida, un esfingolípido intermedio entre la BCL y esfingolípido complejo [Markham y col., 2006; Pata y col., 2010]. Al grupo hidroxilo terminal de la BCL se le une un grupo polar que puede estar formado por uno o varios residuos de carbohidrato y un grupo fosfato (Figura 1).

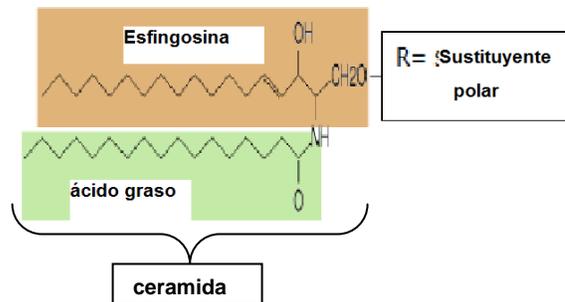


Figura 1. Estructura básica de los esfingolípido, formada por una parte hidrofóbica (ceramida, que es la base de cadena larga acilada) y una cabeza polar (R), la cual puede ser un grupo fosfato, un azúcar o un grupo fosfato unido a uno o más residuos de azúcar.

### 1.2.2.1 Biosíntesis de *nov*o de esfingolípido

La biosíntesis de los esfingolípido inicia en el RE con la condensación de *L*-serina y la palmitoil-CoA para formar 3-ceto esfingina. Esta reacción es catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT), heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2. En la segunda etapa de la síntesis, la 3-ceto esfingina es reducida a la forma esfingina, mediante la 3-ceto esfingina reductasa utilizando NADPH. En una reacción subsecuente, la esfingina puede ser fosforilada mediante la esfingina cinasa para dar lugar a la formación de esfingina-1-fosfato. Para la formación de la ceramida, el grupo amino de la esfingina es acilado mediante un enlace amida, catalizado por la esfingina *N*-aciltransferasa o también conocida como ceramida sintasa. Posteriormente, a las ceramidas se le incorporan enzimáticamente diversos grupos polares para la formación de los esfingolípido complejos, como son GIPCs y GlcCer (Figura 2) [Chen y col., 2006].

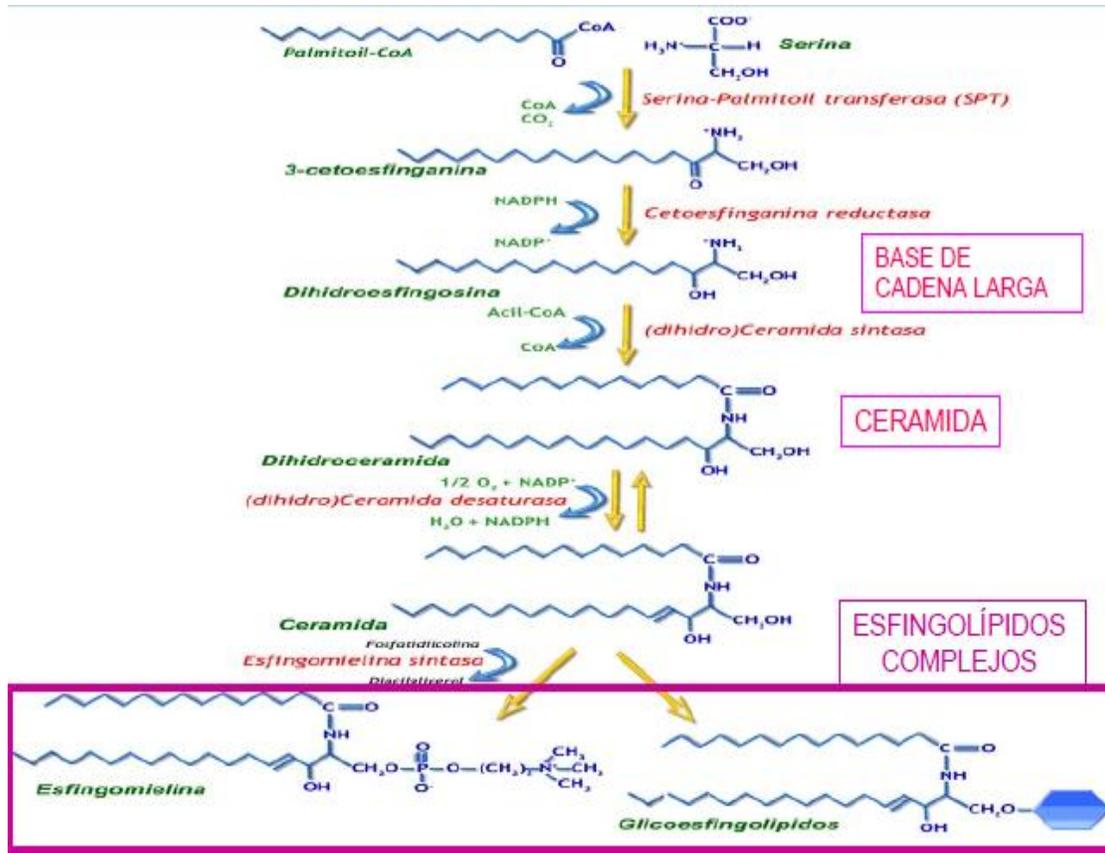


Figura 2. Esquema de la secuencia de reacciones de la biosíntesis de *novo* de los esfingolípidos en plantas (modificada de Sterin-Speziale y Leocata-Nieto, 2007)

### 1.2.2.2 Funciones de los esfingolípidos en plantas

Las BCL fosforiladas y no fosforiladas son especies que están en muy bajas concentraciones en la célula. Se ha encontrado que las BCL intervienen como segundos mensajeros en plantas: en la muerte celular programada y desempeñan un papel en la señalización en células vegetales mediando el cierre de estomas (poros en la epidermis de las hojas y tallos, importantes para la absorción del CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis y para la reducción de la pérdida de agua por transpiración). Las células regulan la apertura y cierre de los estomas respondiendo a diversas señales ambientales y químicas como son la intensidad de la luz, temperatura, estado del agua, niveles de CO<sub>2</sub> y señales hormonales [Chen y col., 2009, Pata y col., 2010]. Se ha demostrado que la esfingosina 1-fosfato (S1P) promueve el cierre de estomas al inducir un incremento en la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup>.

Las GlcCer se encuentran en la monocapa apoplástica de la bicapa lipídica, se les ha atribuido numerosas funciones en la patogénesis, la estabilidad y permeabilidad de la membrana, así como en la tolerancia al enfriamiento y congelación, mediante un mecanismo de crioestabilidad de la membrana. También se han implicado en la tolerancia a la sequía, ya que se han encontrado altas concentraciones de GlcCer en la membrana vacuolar al estar la planta en un proceso de adaptación a la sequía.

### 1.2.3 Esteroles

Los esteroides son otra clase de lípidos que se pueden encontrar en la membrana, los cuales son compuestos que contienen un núcleo de cicloperihidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el C3 y un enlace doble en el carbono 5. Los esteroides son sintetizados en el RE a partir del cicloartenol y distribuidos a otros organelos por tráfico vesicular y no vesicular [Max Fiel y Tabas, 2005]. La mayoría de los esteroides se encuentran libres. De éstos, los más comunes de la membrana plasmática son el campesterol ( $C_{28}$ ), el sitoesterol ( $C_{29}$ ) y el estigmasterol ( $C_{29}$ ). El sitoesterol es el más abundante representando del 50% al 80% de los esteroides totales contenidos en algunas plantas [Buchanan y col., 2000]. Los ésteres de esteroles, los glicósidos de esteroides acilados y no acilados son más abundantes en plantas que en animales.

## 2. ATPasa de $H^+$ de la Membrana Plasmática

Las distintas proteínas presentes en la membrana facilitan diferentes funciones en la célula como son el transporte, la comunicación y la transducción de energía. La forma en la que están asociadas las proteínas a la membrana con los lípidos de la bicapa generalmente reflejan la función de las proteínas [Alberts y col., 1994]. Se ha evidenciado la presencia de dos tipos de proteínas que se encuentran asociadas a las membranas: a) proteínas periféricas (extrínsecas) y b) proteínas integrales o transmembranales (intrínsecas).

Las primeras se encuentran unidas mediante enlaces débiles con las partes polares de las proteínas integrales o bien con las partes polares de los lípidos, que en su conjunto forman una red de asociaciones estables con la membrana. En el caso de las proteínas integrales, estas se unen a la membrana por interacciones hidrofóbicas con los lípidos, estas proteínas atraviesan la bicapa y pueden presentar dominios que incluyen ambas partes de ella, por lo que se dice que son transmembranales (que es el caso de la ATPasa de  $H^+$ ). En

algunos casos, un dominio atraviesa sólo uno u otro lado de la bicapa, por lo que se les llaman intrínsecas, externas o internas [Callen, 2000].

## 2.1 Estructura

La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática es una proteína transmembranal de 948 a 957 aminoácidos, según la isoforma y la especie de planta, lo que corresponde a un peso molecular aproximado de 100 kDa; pertenece a la familia de ATPasas transductoras de energía del tipo P [Pedersen y Carafoli, 1987], ya que al obtener la energía del ATP forma un intermediario fosforilado covalentemente en un residuo de ácido aspártico (Asp 329) y es inhibida por vanadato. Esta ATPasa tiene las siguientes características generales [Kasamo, 2003] (Figura 3):

- Aproximadamente el 70% de la estructura de la proteína es de carácter hidrofílico y está expuesta al citoplasma.
- Consta de diez  $\alpha$ -hélices transmembranales (M1 a M10), cada una de éstas cuentan con un total de entre 15 y 30 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica.
- Sólo el 5% de su estructura está expuesta hacia la cara extracelular.
- Tanto el amino como el carboxilo terminal se encuentran localizados en el espacio citosólico de la célula.
- El sitio activo en el que se lleva a cabo la hidrólisis de ATP está localizado en el asa hidrofílica más grande que está entre los dominios M4 y M5.

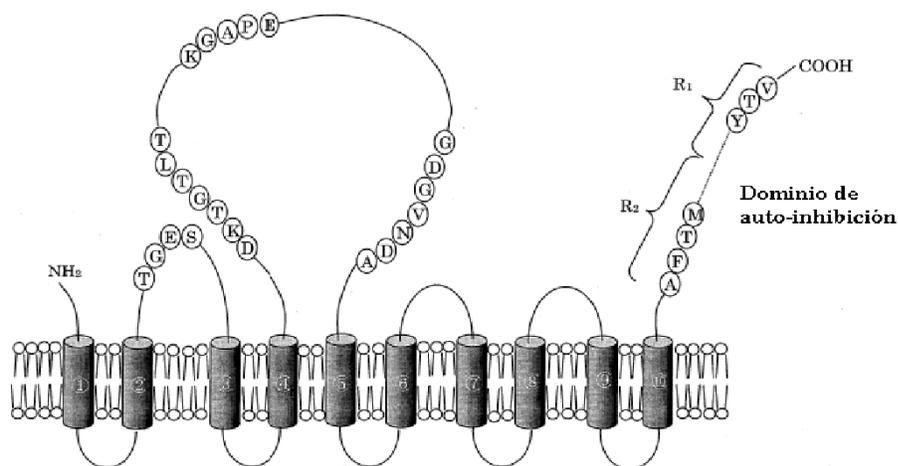
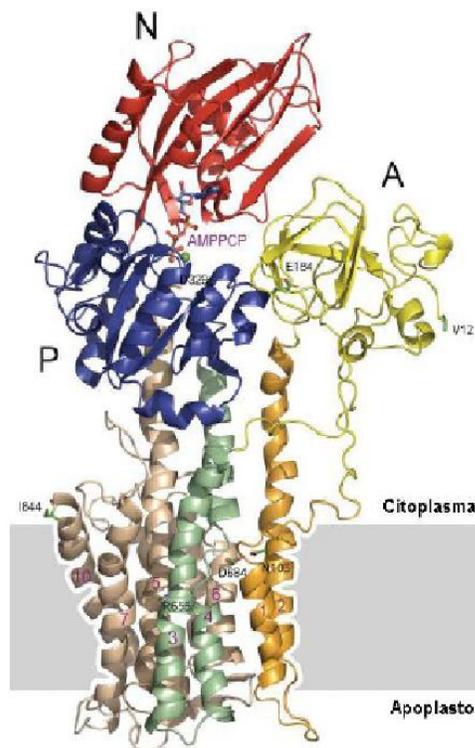


Figura 3: Modelo estructural bidimensional de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, representando los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos. La parte superior corresponde al citoplasma (modificada de Kasamo, 2003).

En la estructura cristalográfica pueden identificarse cuatro dominios bien definidos [Pedersen y col., 2007]:

1. Un dominio transmembranal de diez  $\alpha$ -hélices (denominadas M1 a M10), involucradas en la formación del canal transmembranal por donde los  $H^+$  son transportados del citoplasma al espacio apoplástico.
2. El dominio de fosforilación (residuos 308-337 y 489-625), en el que se encuentra el aminoácido que se fosforila covalentemente durante la catálisis.
3. El dominio N (dominio de unión del nucleótido; residuos 338-488).
4. El dominio A (dominio actuador; residuos 12-57 y 120-233) sitio que estimula la desfosforilación de la enzima, el cual incluye a la región del amino terminal y la porción de la molécula formada por el asa entre M2 y M3. Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias específicas de aminoácidos de la proteína, se han obtenido evidencias de la presencia de un dominio autoinhibitorio denominado R, el cual se ha postulado estar formado por 100 aminoácidos localizados en la región del C-terminal [Kasamo, 2003].



## **2.2 Función catalítica.**

La ATPasa de la membrana plasmática de células vegetales y hongos lleva a cabo una reacción escalar que es la hidrólisis de ATP y simultáneamente el transporte de  $H^+$  desde el compartimento del citosol, el cual está a un pH 7.0 =  $1 \times 10^{-7}$  M de  $H_3O^+$ , hacia el espacio extracelular o apoplástico, que está a un pH 5.0 =  $1 \times 10^{-5}$  M de  $H_3O^+$ , venciendo una diferencia de concentración de  $H^+$  de 100 veces, es decir, la enzima transporta a los  $H^+$  de un compartimento a otro en contra de su gradiente de concentración. La característica de convertir la energía proveniente de la reacción química que cataliza, en el establecimiento de un gradiente transmembranal de  $H^+$ , define a la ATPasa de  $H^+$  como una ATPasa transductora de energía [Gavilanes y col., 1995]. Esta reacción es muy exergónica, liberando entre 60 y 65 kJ/mol dependiendo de la concentración de ATP que hay en la célula [Nelson y Cox, 2006].

La estequiometría entre las dos reacciones ha sido definida experimentalmente como 1:1 (un  $H^+$  conducido por un ATP hidrolizado). Estas reacciones tienen una cinética michaeliana clásica y requieren de lípidos o de un entorno anfipático para llevarse a cabo [Serrano y col., 1988].

La ATPasa funciona como bomba primaria, pues facilita energéticamente el transporte de solutos (iones, aminoácidos, azúcares, etc.) a través de acarreadores y canales, ya que la apertura de éstos últimos es sensible al potencial electroquímico de  $H^+$  generado por la enzima, pues la ATPasa al bombear  $H^+$  al exterior de la célula, genera un gradiente de concentración de  $H^+$  ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) a ambos lados de la membrana plasmática. Este  $\Delta\mu_{H^+}$  tiene dos componentes: la diferencia de potencial eléctrico transmembranal ( $\Delta\psi$ ) y la diferencia de pH a ambos lados de la membrana ( $\Delta pH$ ), ambos constituyen la fuerza impulsora energética necesaria para llevar a cabo diferentes transportes a través de la membrana plasmática (transporte secundario).

## **2.3 Papel fisiológico en las plantas**

Los gradientes electroquímicos de  $H^+$  generados por la ATPasa de la membrana plasmática, pueden ser utilizados por cualquier célula o por células especializadas para diferentes funciones en la planta como son: el transporte secundario que abastece de

nutrientes a cualquier célula, el alargamiento celular en tejidos en crecimiento y el flujo de iones en las células guardia que forman los estomas [Gavilanes y col., 1995]. A continuación se describen aquellos procesos celulares en los que la ATPasa de  $H^+$  participa de una manera activa:

- A. Apertura de estomas. Las dos células guardia que forman al estoma, experimentan cambios en la forma y el volumen para cerrar o formar el poro por el que se realiza el intercambio gaseoso entre la epidermis de la planta y del medio. La apertura del poro se inicia con una señal ambiental, por ejemplo el nivel de  $CO_2$ , la humedad, algunas fitohormonas o la luz; las dos últimas aumentan la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática que se encuentran en las células guardia. La activación de la ATPasa aumenta el transporte de  $H^+$  hacia el exterior de la célula, lo que a su vez hiperpolariza la membrana plasmática, favoreciendo la entrada de  $K^+$  por canales membranales específicos. La acumulación interna de osmolitos, como el  $K^+$  y el malato, inducen la entrada de agua a la célula para equilibrar las concentraciones internas y externas de soluto, provocando que las células se hinchen y generen cambios en la curvatura de la pared celular. Esto, finalmente, lleva a la apertura del poro estomático [Gavilanes y col., 1995].
- B. Nutrición celular. El movimiento de los sacáridos y aminoácidos a través de la membrana plasmática se realiza por sistemas de simporte sacárido / $H^+$  o aminoácido / $H^+$ , que requieren de una diferencia de potencial eléctrico o un  $\Delta pH$ . La fuerza impulsora de este transporte está dada por la acción de la ATPasa como bomba primaria. El suministro de hexosas es fundamental para los procesos oxidativos celulares que producen energía, mientras que la sacarosa constituye el fotosintato más importante producido por la planta que debe ser distribuido a los tejidos no autótrofos. Los aminoácidos también son requeridos para el crecimiento y desarrollo de los tejidos de la planta. Su transporte se lleva a cabo a través de 4 tipos de acarreadores: dos para grupos diferentes de aminoácidos neutros, uno para aminoácidos ácidos y uno para aminoácidos básicos. Todos ellos son acarreadores en simporte aminoácido / $H^+$ , altamente dependientes del pH. Estas modalidades de transporte se denominan transporte secundario porque utiliza como ión co-transportado a los  $H^+$  del apoplasto que fueron primariamente removidos desde el interior celular por la ATPasa de  $H^+$ , que constituye la bomba primaria [Felle y Johannes, 1990; Chang Li y Bush, 1991;

Bush, 1993; Gavilanes y col., 1995].

- C. Elongación celular. Cuando una célula crece, la pared celular tiene que aflojarse, relajando las mallas de polímeros de carbohidratos que la componen para que la célula que encierra pueda aumentar su tamaño. El aumento de  $H^+$  al exterior de la célula vegetal contribuye a la relajación y debilidad de la pared celular. Esta acidificación es inducida por las auxinas a través de la síntesis e incorporación masiva de la ATPasa a la membrana plasmática y se conoce como la Teoría del Crecimiento Ácido [Hager y col., 1991; Gavilanes y col., 1995].

### **2.4 Regulación de la actividad de la ATPasa de $H^+$**

#### **2.4.1 Por expresión diferencial de isoformas.**

Una forma de modificar la actividad de una enzima consiste en modificar a la enzima misma, sin que cambie su función catalítica básica, es decir sigue reconociendo el mismo sustrato y llevando a cabo la misma reacción. Esto se logra promoviendo la expresión diferencial de distintas isoformas. En el caso de la ATPasa de  $H^+$  se han identificado varios genes que codifican, cada uno, para diferentes isoenzimas. Para el género *Arabidopsis* se sabe que existen 12 genes que codifican para la síntesis de variantes de la ATPasa de  $H^+$  que han sido denominadas como AHA1-AHA12 [Gavilanes y col., 1995; Palmgren, 2001]. Dos de estas isoformas, AHA1 y AHA2 se expresan en todos los tejidos y órganos, indicando que estas isoformas parecen funcionar en el mantenimiento continuo de la homeostasis celular de iones. Se ha encontrado más el transcrito de AHA1 en plántulas, y AHA2 predomina en raíces y especialmente en los pelos radiculares [Gaxiola y col., 2007] y se ha reportado que las mutaciones en los genes que codifican para estas dos isoformas AHA1 y AHA2 resultan letales para la planta [Haruta y col., 2010].

#### **2.4.2 Regulación por fosforilación**

Se ha demostrado un mecanismo de regulación de la ATPasa de  $H^+$  a nivel molecular es la modulación de la actividad por un dominio de auto-inhibición localizado en la parte del C-terminal de la proteína [Gomes y col., 1996]. La interacción inhibitoria entre este dominio y el sitio de unión al ATP y/o al  $H^+$  puede estar modulada por la unión de moléculas efectoras, fosforilación, proteólisis parcial o por ablación a nivel genético [Palmgren, 1991]. El C-terminal está altamente conservado en la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática de

plantas, que contiene varios sitios de fosforilación y una región conservada que interactúa directamente con la proteína 14-3-3, que es una proteína reguladora que se une a una proteína blanco, localizada en todas las células eucariotas. La fosforilación de una treonina, serina o tirosina por una cinasa de la membrana resulta en la formación del sitio de unión de la proteína 14-3-3, cuya unión aumenta la actividad de la enzima y aparentemente estabiliza esta asociación [Kasamo, 2003]. La proteína 14-3-3 se disocia de la ATPasa tras desfosforilación en esa región del carboxilo terminal.

### **2.4.3 Regulación por oligomerización**

Independientemente de la metodología que se ha empleado para la determinación del arreglo oligomérico que la ATPasa de  $H^+$  puede presentar, se le ha encontrado en arreglos diméricos y triméricos. Estos diferentes estados de asociación pueden estar relacionados con diferentes niveles de actividad de la enzima, sin embargo, esto no ha podido ser probado experimentalmente. Mediante la solubilización de la ATPasa de  $H^+$  con el detergente Zwittergent 3-14, la enzima tiene un tamaño de 129 kDa, correspondiente a la masa de un monómero. En esta forma, la enzima solubilizada mantiene su actividad, indicando que la unidad mínima funcional de la ATPasa de  $H^+$  es un monómero [Palmgren, 2001]. Se ha reportado que la ATPasa de  $H^+$  presenta un arreglo de hexámero cuando se fosforila [Kanczewska y col., 2005].

### **2.4.4 Regulación por lípidos membranales.**

La estructura y organización de los lípidos membranales juegan un papel importante en la conformación de la ATPasa de  $H^+$  y por tanto en la modulación de la actividad. La regulación de una enzima por los lípidos membranales que la rodean, se ha explicado por dos mecanismos: la teoría de los lípidos en conjunto y la teoría de los lípidos frontera (anulares) [Kasamo y Sakakibara, 1995].

La teoría de los lípidos de conjunto (bulk) establece que los cambios en la composición de la membrana alteran la fluidez de ésta, lo cual provoca un cambio conformacional en la enzima, y por lo tanto en su actividad. Hay que mencionar que las membranas tienen una gran movilidad lateral de sus componentes, por ello, los lípidos de conjunto podrían estar afectando la conformación de la enzima.

La fluidez es un concepto dinámico relacionado con el orden estructural de las

membranas y depende de la relación molecular esteroides-lípidos complejos presentes en la membrana, de la temperatura y de la composición de los lípidos (ya sea por la longitud de las cadenas acílicas o la presencia de dobles ligaduras en ellas). La parte polar de los lípidos membranales también puede influir en la fluidez, dado que algunos lípidos tienen cabezas hidrofílicas muy voluminosas. Los grupos acilo de cadena larga en los lípidos incrementan la actividad de la ATPasa pero afectan también la fluidez de la membrana; haciendo que ésta disminuya [Gutiérrez-Nájera y col., 2005].

La teoría de los lípidos frontera o anulares establece que algunas moléculas lipídicas de la membrana están unidas estrechamente a la proteína y se recambian poco con los lípidos de conjunto. Las interacciones entre estos lípidos anulares y las proteínas en la membrana son causa de la modificación de la actividad de la proteína. Se ha propuesto que la composición de los fosfolípidos anulares alrededor de la proteína podría diferir de la composición del resto del conjunto de los fosfolípidos que integran la bicapa, lo cual ofrece una explicación más lógica sobre la especificidad de las interacciones y uniones entre los lípidos y la proteínas de membrana [Kasamo, 2003].

Lo que se ignora es qué partes de la ATPasa de  $H^+$  se pueden unir al lípido anular. Una posibilidad es que los lípidos anulares se combinen con el dominio autoinhibitorio, de esta manera, los lípidos anulares activarían a la ATPasa enmascarando o desplazando el dominio autoinhibitorio. Otra alternativa es que el dominio autoinhibitorio interactúe con el sitio activo de la ATPasa de  $H^+$  siendo éste accesible a tales lípidos anulares [Kasamo, 2003]. Otra posibilidad es que los lípidos anulares interaccionen con regiones del canal de  $H^+$  que estarían en contacto indirecto, pero real, con el sitio catalítico.

### **3. Interacción lípidos membranales-ATPasa de $H^+$**

La interacción de las proteínas de membrana con los lípidos de la bicapa permite rearrreglos estructurales de la proteína pero preservando la integridad estructural de la membrana. Esto es especialmente importante porque muchas proteínas de membrana sufren cambios conformacionales en la región transmembranal, los cuales son esenciales para su actividad. La movilidad y flexibilidad de los lípidos permiten mantener la integridad funcional de la membrana, ya que los lípidos pueden adherirse a la superficie de las proteínas integrales y su composición puede ajustarse a cambios ambientales [Reyes-Mateo y col., 2006]. Como se ha mencionado anteriormente, la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática de plantas se encuentra 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, ya que hay evidencias experimentales que han demostrado la acción de glicerolípidos, esteroides y detergentes, en la actividad de la enzima [Kasamo y col., 1987; Serrano y col., 1988; Kasamo, 1990; Palmgren, 1991; Cooke y col., 1994].

### **3.1 Efecto de detergentes.**

El medio ambiente hidrofóbico e hidrofílico en torno a las proteínas de membrana es importante para su función. Los detergentes son moléculas anfífilas que pueden tener dos efectos en las proteínas membranales dependiendo de la concentración en la que se usen, ya que a altas concentraciones pueden solubilizar a las proteínas de la membrana y a bajas concentraciones pueden insertarse en la membrana como un lípido.

Los detergentes influyen profundamente en el entorno membranal mediante la interacción con los lípidos de membrana, así como en el dominio hidrofóbico de la proteína. La lisofosfatidilcolina (LPC) es un detergente de tipo zwitteriónico (*del alemán "zwitter" "híbrido"*). Los compuestos zwitteriónicos son compuestos químicos que son eléctricamente neutros, pero que tienen cargas formales positivas y negativas en átomos diferentes). La LPC y otros detergentes zwitteriónicos (zwittergent 3-8, zwittergent 3-10 y zwittergent 3-12) estimulan a la ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas, ocasionando un incremento de la  $V_{max}$ , decremento de la  $K_m$  aparente y desplazamiento del pH óptimo [Palmgren y col., 1990]. Se ha visto que deleciones en la región del C-terminal o el tratamiento con fusicoccina generan una ATPasa de H<sup>+</sup> que ya no es estimulada con estos detergentes, sugiriendo que la estimulación de la ATPasa de H<sup>+</sup> puede ser por un posible desplazamiento del dominio autoinhibitorio (el C-terminal) de su sitio de interacción con la enzima [Morsomme y col., 1998].

Los detergentes no iónicos tales como el Tritón X-100 y el Brij 58 se han usado para la permeabilización de vesículas de membrana y facilitar el acceso a la ATPasa, cuya actividad está latente en vesículas al derecho, pero se ha observado que además, el Brij 58, y en menor contribución el Triton X-100, aumentan simultáneamente la hidrólisis de ATP y el bombeo de H<sup>+</sup>. Sugiriendo que estos dos detergentes se pueden insertar dentro de la membrana y unirse a las proteínas de membrana tales como la ATPasa, ocasionándoles una modificación estructural. Alternativamente, estos dos detergentes podrían causar la reorientación de las vesículas, exponiendo el lado citosólico de la membrana y con ello accediendo a la ATPasa latente [Ibarz y col., 1994].

### **3.2 Efecto de Glicerolípidos.**

Se han hecho pruebas para determinar los requerimientos lipídicos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, las cuales incluyen deslipidación selectiva de la enzima para modificar su ambiente lipídico original, realizando una purificación de la enzima primero y reconstituyéndola nuevamente de manera selectiva con componentes lipídicos y ver su efecto en la actividad. Otra estrategia ha sido la de modificar el ambiente anfipático sometiendo a la enzima a la solubilización con varios detergentes que preserven su actividad [Brauer y Tu, 1989]. En la mayoría de los casos, se ha encontrado que los fosfolípidos estimulan la actividad en la enzima como es el caso de la asolectina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y fosfatidilglicerol [Kasamo, 1990].

Grupos polares de los glicerofosfolípidos como el glicerol, inositol y serina sólo activan un poco o nada a la enzima, mientras que teniendo etanolamina o colina no se tiene ningún efecto [Kasamo y col., 1987]. Lo anterior está en función tanto de la longitud de las cadenas de ácidos grasos esterificadas y su grado de saturación, como de las características de la parte hidrofílica (cabeza polar del lípido membranal).

### **3.3 Efecto de esteroides.**

Los esteroides son esenciales para el crecimiento de muchos tipos celulares. El colesterol es el esteroide principal de animales, el ergosterol predomina en levaduras y hongos en general. En plantas, la composición es más compleja, los esteroides de mayor cantidad en la membrana plasmática corresponden al campesterol, stigmasterol y sitosterol [Palmgren, 1991]. Hay estudios que han mostrado que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática puede estar regulada a través de la interacción con lípidos de membrana y este es el caso también de los esteroides, pues su composición en la membrana plasmática de las plantas influye en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Se ha visto que, alteraciones en la composición de esteroides de la membrana plasmática produce cambios en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, tanto en la hidrólisis de ATP como en el bombeo de protones: en el caso del stigmasterol la estimula, mientras que el sitosterol y campesterol la inhiben [Cooke y col., 1994]. Se han sugerido dos teorías para explicar la modulación de la actividad de la ATPasa por los esteroides [Grandmougin y col., 1997].

De acuerdo a la primera teoría, cambios en la composición lipídica pueden inducir una alteración de las propiedades físicas de la membrana de la bicapa lipídica, específicamente en la fluidez. Por ello, indirectamente la enzima puede sufrir cambios conformacionales, y esto resulta en cambios en su actividad. Mientras que la segunda teoría se basa en una interacción directa de los esteroides con la enzima, la cual debe apoyarse en especificidades estructurales del esteroide y de la enzima. Diferentes estudios sugieren que los cambios en la actividad de la enzima aparentemente son independientes de la fluidez, sugiriendo que la interacción directa lípido-proteína está involucrada, pero debido a la complejidad del metabolismo de los esteroides en la membrana, la regulación de la actividad de la ATPasa de la membrana por esteroides no es probable que sea parte de una respuesta rápida para modular a la enzima [Palmgren, 1991].

**ANTECEDENTES INMEDIATOS**

La ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas es una enzima que está sujeta a muchas formas de regulación. Una de las regiones de la estructura terciaria de la enzima que parece tener más importancia en la regulación de su actividad es la parte del carboxilo terminal. Ésta es una región de aproximadamente 100 aminoácidos que contienen varios sitios de fosforilación y de interacción con las proteínas 14-3-3. Esta porción de la proteína tiene un efecto autoinhibitorio sobre la catálisis de la enzima, aunque no está muy claro si la interacción de esta región del carboxilo terminal es directa o indirecta con el sitio catalítico.

En el laboratorio se ha encontrado que en la línea de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2b hp/Atlcb2a* que contiene un contenido 34% menor de esfingolípidos totales, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> está aumentada alrededor de un 100% con respecto a la actividad de la enzima de las plantas controles como las de la línea silvestre [Vázquez Vázquez, 2009]. Lo anterior se presenta tanto en plantas adultas como en estadios jóvenes [Mejía Hernández, 2010]. Se determinó que en la enzima de la línea *AtLcb2b hp/Atlcb2a*, la  $V_{max}$  está aumentada con respecto a la del genotipo silvestre [González Reyes, 2010]. Se desconoce si hay un desplazamiento de la región terminal de la estructura primaria de la enzima durante esta activación. Por ello, para determinar si en estas plantas con la actividad aumentada de la enzima, la región carboxilo terminal está involucrada, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0), tanto del genotipo silvestre como de la línea mutante silenciable *AtLcb2a hp/Atlcb2a*. Esta línea fue generada por el grupo del Dr. Edgar B. Cahoon como estrategia para examinar el papel de los esfingolípidos en las células vegetales. La estrategia consistió en reducir la síntesis celular de esfingolípidos modificando la expresión de los genes de la primera enzima de la vía de su síntesis: la serina palmitoiltransferasa (SPT), que está formada por los heterodímeros LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b. Para ello, este grupo generó a la mutante de *Arabidopsis thaliana* *Atlcb2a-1*, que no expresa a la subunidad LCB2a, por lo cual la planta sólo puede sintetizar a la SPT con los monómeros LCB1 y LCB2b. En esta mutante se realizó la construcción de una horquilla de ARN que funciona como ARNi para silenciar el gene remanente *LCB2b*, para ello se diseñaron condiciones para inducir el silenciamiento de este gene de manera controlada al aplicar el insecticida metoxifenoazida (Intrepid ®)[Dietrich y col., 2008].

### HIPÓTESIS:

El aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea de *Arabidopsis thaliana* con menor contenido de esfingolípidos se debe a cambios en la interacción de la región del carboxilo terminal con la enzima y los esfingolípidos de la membrana.

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar la contribución de la región del carboxilo terminal en la alta actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas con menor contenido de esfingolípidos.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Germinar y cultivar plantas de *Arabidopsis thaliana* de las distintas líneas en estudio (silvestre o wt, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) para obtener plantas adultas y proseguir con la inducción del silenciamiento del gene de la subunidad *LCB2b*.
- Obtener vesículas de membrana plasmática de plantas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, que fueron sometidas o no al tratamiento con metoxifenoazida.
- Determinar la actividad específica de la ATPasa H<sup>+</sup> de membrana plasmática en las vesículas de membrana plasmática obtenidas.
- Determinar el efecto de la lisofosfatidilcolina en la actividad aumentada de la enzima de las plantas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a 5 dpi (días pos-inducción) con un menor contenido de esfingolípidos.
- Determinar la actividad específica de la ATPasa H<sup>+</sup> de membrana plasmática en vesículas de membrana plasmática de las líneas en estudio, tratada a diferentes tiempos de incubación con tripsina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se utilizaron plantas de edad adulta de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col 0), genotipo silvestre, de la línea mutante *Atlcb2a-1* y de la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Las características de estas líneas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas como material biológico.

Línea de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)	Modificaciones genotípicas	Fenotipo	Contenido esfingoideo
Silvestre	Sin modificación	Normal (con o sin Metoxifenzida)	100% de esfingolípidos complejos
<i>Atlcb2a-1</i>	Interrupción del gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT por la inserción de un transposón.	Normal (con o sin Metoxifenzida)	100% de esfingolípidos complejos
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	a) Interrupción del gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT por la inserción de un transposón. b) Un vector binario conteniendo la construcción de una horquilla de ARN que funciona como ARNi para silenciar* el gen remanente que codifica para la subunidad LCB2b de la SPT.	Clorosis y eventualmente la muerte, en presencia de Metoxifenzida.	60% de esfingolípidos complejos tras la inducción por 5 días del silenciamiento con Metoxifenzida

\* Cuya inducción del silenciamiento se lleva a cabo mediante la aplicación de la metoxifenzida (insecticida Intrepid®)

## 2. Metodología general.

El diseño experimental para este trabajo se delinea en la Fig. 5, en la cual se observa que las plantas se expusieron a la inducción del silenciamiento génico, tomando como controles de éste a las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir. Posteriormente, se aislaron vesículas de membrana plasmática de todas las líneas y en estas se midieron la proteína, la hidrólisis de ATP, y los efectos de lisofosfatidilcolina y tripsina. Se registró el fenotipo para ver el efecto del inductor en todas las líneas de *Arabidopsis*.

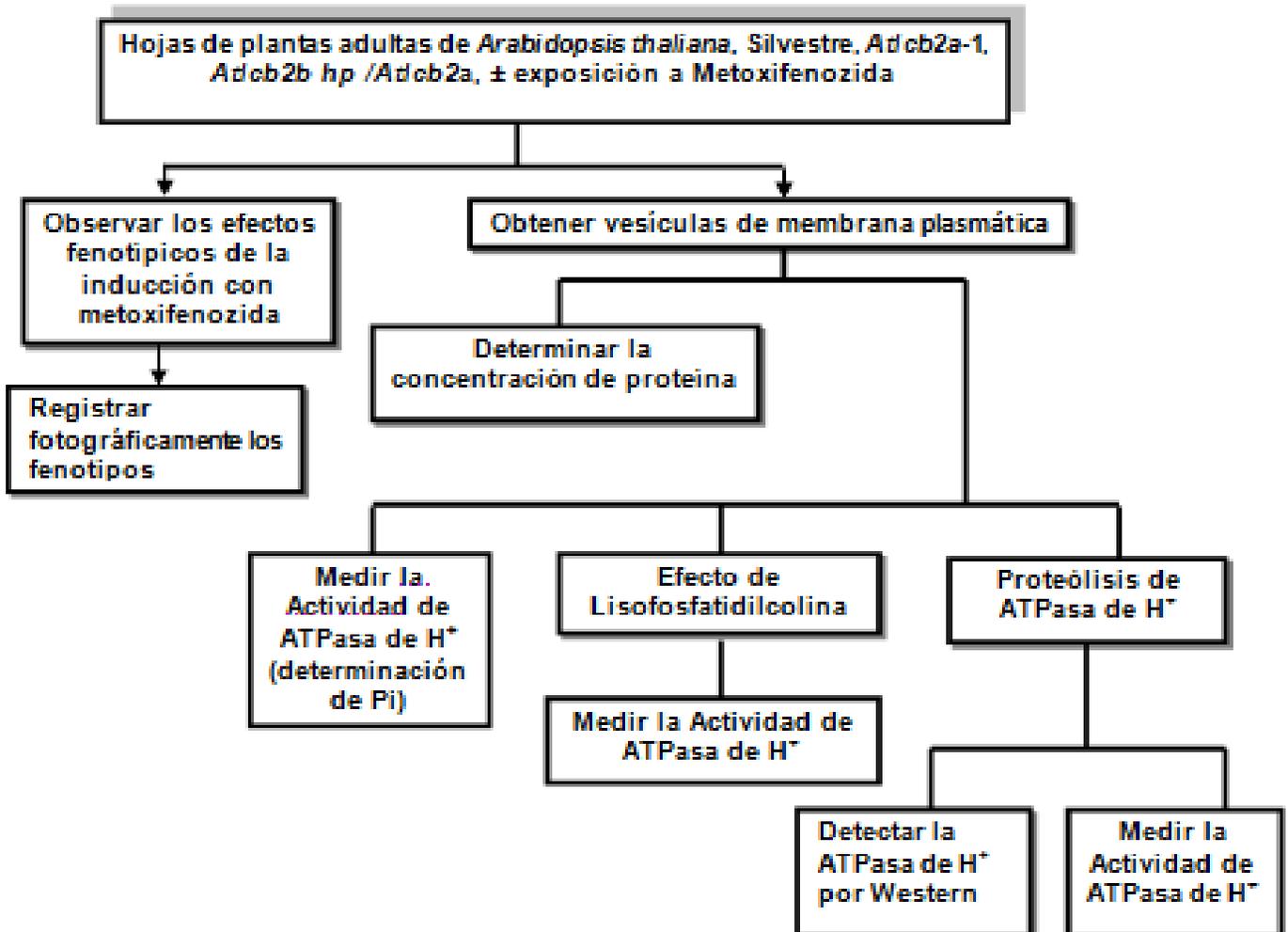


Figura 5. Esquema general de la metodología seguida en este trabajo.

### **3. Germinación y crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana***

Para llevar a cabo la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*, se lleva a cabo el procedimiento siguiente en la campana de flujo laminar: la cantidad de semillas de *Arabidopsis thaliana* a desinfectar se colocan en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de una solución de NaHClO<sub>4</sub> al 20% (v/v) elaborada a partir de cloro comercial (Cloralex®), 1 µL de una solución de Tween 20 al 0.1% (v/v) y 6 µL de Microdyn®. Se agita por 20 min en un agitador eléctrico. Posteriormente se centrifuga por 10 s en una minifuga y se retira el sobrenadante; se agrega 1 mL de solución NaHClO<sub>4</sub> al 20%, se agita por 10 min, se centrifuga y se retira de nuevo el sobrenadante. Se realizan 5 lavados consecutivos con agua estéril (1 mL) con periodos de agitación de 30 s, seguidos de un periodo de centrifugación de 10 s entre cada lavado. Las semillas se resuspenden en agua estéril.

Una vez desinfectadas, las semillas se siembran sobre la superficie del medio sólido contenido en cajas Petri desechables estériles de 8 cm de diámetro. El medio sólido es Gamborg B-5 más Agar al 1% y sacarosa al 1%, esterilizado a 121°C a una presión de 1.1 kg/cm<sup>2</sup> (15 lb/ in<sup>2</sup>) durante 20 min y del que se vierten 20 mL aproximadamente en cada una de las cajas Petri desechables estériles de 8 cm de diámetro (realizar también en cámara de flujo laminar o cerca del mechero), se dejan enfriar completamente y se mantienen en refrigeración hasta su uso.

La colocación de las semillas en la caja Petri se hace con la ayuda de una micropipeta de 1 mL con punta estéril, dejándolas acomodadas en una línea de aproximadamente 5.5 cm de largo en un extremo de la caja circular, posteriormente se sellan con parafilm® y se cubren con plástico autoadherente. Si se siembran para crecimiento en caja en posición horizontal, las semillas se esparcen en toda la superficie del agar. Las cajas sembradas se mantienen a 4°C por 48 h en la oscuridad y posteriormente se transfieren a una cámara de incubación a 22°C con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

#### **3.1 Crecimiento hasta plantas adultas**

Una vez desinfectadas las semillas se resuspenden en agua estéril y se mantienen a 4°C por 48 h. Posteriormente, las semillas se siembran sobre la superficie de la tierra contenida en charolas de plástico. La composición del sustrato es 1.5 partes de Mix 4

Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 0.5 partes de vermiculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.) y 0.5 partes de agrolita dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo. De México) humedecido con agua estéril. La colocación de las semillas en la charola se hace depositando las semillas en la superficie del sustrato con la ayuda de una micropipeta de 1 mL con una punta estéril, dejándolas acomodadas en hileras separadas por 2 cm aproximadamente entre ellas. Las charolas se mantienen en invernadero con un fotoperiodo natural o bien de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Se riegan con agua en un atomizador para mantenerlas húmedas. Si la luz natural es muy intensa, se cubren al con domos blancos opacos.

Una vez crecidas las plántulas (después de 2-3 semanas), se transfieren a suelo en macetas o maceteros, colocando una plántula por maceta. Las macetas y maceteros, así como las charolas deben estar lavadas y remojadas con HClO<sub>4</sub> comercial al 30% (Cloralex). Después de haber sido bien enjuagados con agua de la llave ya se pueden usar. La composición del sustrato es la misma mencionada anteriormente. La mezcla de sustrato se hace en una tina grande y ahí mismo se humedece antes de vaciarse a las macetas o maceteros y con mucho cuidado se transfieren las plántulas, ayudándose de abatelenguas o espátulas.

Al principio, las charolas con macetas o maceteros se cubren con domos transparentes para mantener la humedad y se riegan por la orilla de la superficie de cada maceta o bien con atomizador aproximadamente 2 veces a la semana. Las plantas se crecieron en invernadero con un fotoperiodo natural y aire acondicionado o bien con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Si la luz natural es muy intensa, se cubren al principio con domos blancos opacos.

Al cabo de dos semanas más o menos, o cuando ya se ven más fuertes las plántulas, se remueven los domos para permitir una mejor exposición a la luz. Se siguen regando por la parte aérea 2-3 veces a la semana.

Cuando las plantas alcanzan la edad y tamaño deseado (al cabo de dos meses y medio, aproximadamente), se procede a cosechar las hojas, cortando con tijeras toda el área foliar que incluye tanto hojas jóvenes como adultas, pero no tallos ni raíces. Se pesan en porciones y se envuelven en papel aluminio, anotando el peso neto y así se congelan con N<sub>2</sub> líquido inmediatamente después de cortarlas. Se almacenan en bolsas a -70°C hasta su uso para la obtención de vesículas de membrana plasmática.

#### **4. Silenciamiento génico del gen de la subunidad LCB2b de la SPT**

El silenciamiento génico del gene de la subunidad LCB2b de la SPT se induce asperjando las plantas con la metoxifenoza, que es el ingrediente activo del insecticida Intrepid. Para ello, se elabora una disolución del insecticida Intrepid® (Dow AgroSciences de México S.A. de C.V., formulado a una concentración de 240 g i.a./L, el cual debe mantenerse lejos de la luz, en un lugar fresco y bien cerrado). La solución debe quedar a una concentración final de metoxifenoza:agua de 1:5000 (v:v) para plántulas y 1:10000 (v:v) para plantas adultas partiendo de la solución comercial del insecticida Intrepid® (que contiene a la metoxifenoza y que no debe rebasar la fecha de caducidad). Debe prepararse fresca la solución que se va a usar a partir de la solución comercial de la siguiente manera: Se toma el volumen del insecticida Intrepid® con la ayuda de una micropipeta con punta estéril y para evitar que se tape la punta, se corta un poco de esta para hacer más grande el orificio. Al momento de tomar la cantidad de insecticida se debe hacer lentamente y procurar no sumergir toda la punta, se añade en un vaso de precipitado y se lleva a la concentración deseada con agua. Se recomienda primero hacer una solución stock 1:10 (v:v) para tomar un volumen mayor de la solución comercial y así tener menor error en la cantidad que se toma del Intrepid. Una vez que las plántulas alcanzaron 3 semanas de crecimiento o las plantas alcanzaron la edad adulta, se aplica la disolución de metoxifenoza mediante un aspersor manual de vidrio esterilizable, con una capacidad máxima de 25 mL, aplicando 8 disparos o aspersiones a una distancia de 5 cm de la caja petri o maceta aproximadamente, cubriendo completamente a la plántula o planta. Se mantienen las plantas en las condiciones de crecimiento (22°C con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h de oscuridad), hasta alcanzar el silenciamiento que se evidencia por clorosis generalizada y que se compara con el patrón establecido previamente y registrado fotográficamente.

#### **5. Obtención de parte aérea de plántulas y preparación de homogenados para la obtención de su fracción microsomal.**

**Cosecha de las plántulas.** Tras el periodo de inducción del silenciamiento génico, se cortan las raíces y hojas de las plántulas. Las raíces se separan de la parte aérea por medio de una navaja de acero inoxidable o ayudándose de una espátula mediante un corte desde el medio en donde se crecieron y ya separadas, se retira el agar remanente en ellas con

ayuda de pinzas y espátulas limpias. En el caso de las hojas, estas se toman con pinzas con todo y los tallos, y poco a poco se retiran del agar, cuidando de no romperlas. Ninguno de los tejidos recolectados se enjuaga. Tanto los tejidos de las plántulas inducidas como los de las que no se indujeron, se envasan en tubos Eppendorf individualmente para cada tejido, previamente pesados y rotulados, se pesan nuevamente el tubo que contiene el tejido y se congela inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido, manteniéndose a -70°C hasta su uso posterior.

### **Aislamiento de la fracción microsomal.**

#### ***Homogenización del tejido.***

- a) El tejido congelado de raíz u hoja se muele en mortero hasta conseguir un polvo fino, se agrega N<sub>2</sub> líquido periódicamente para evitar que se descongelen.
- b) El tejido pulverizado se pasa a un vaso de precipitado pequeño de 10 mL, se añaden 4 mL de Buffer de homogenización por cada 0.84 g (peso húmedo) de muestra. Se homogeniza en dos periodos de 10 segundos con un intermedio de 20 segundos con un homogenizador eléctrico a una velocidad de 3.0, manteniendo tanto el buffer de homogeneización como el vaso de precipitado sumergidos en baño de hielo-agua.
- c) Se filtra el homogeneizado a través de 3 capas de gasa, recibiendo el filtrado en otro vaso pequeño de 10 mL, se exprime la gasa presionándola contra la pared del vaso de precipitado ayudándose de un espátula limpia, y se recupera el líquido. Se lava el residuo que quedó sobre la gasa con 1 mL más de buffer de homogenización y se exprime nuevamente para recuperar la muestra.
- d) El filtrado final se coloca en tubos de centrifuga de policarbonato pequeños. Se centrifuga a 15 000 rpm (10 000 x g) a 4°C por 15 min en una microfuga refrigerada TL-100 (Beckman) usando el rotor TLA 100.4. la fracción nuclear que es la que forma el botón, se descarta.
- e) El sobrenadante se recupera, decantando en un tubo limpio de policarbonato y se centrifuga nuevamente, ahora a 43 000 rpm (100 000 x g) a 4°C por 120 min. Finalizando la centrifugación, se decanta el sobrenadante y se descarta.

#### **Obtención de la fracción microsomal.**

El botón obtenido se resuspende en 50 µL de buffer de ajuste de peso con un pincel fino y limpio. Ya disuelto, el pincel se lava con 50 µL de buffer de ajuste de peso

añadiéndosele al final también este volumen a la muestra. Posteriormente se mide el volumen final obtenido, se distribuye en tubos de 0.6 mL y se congelan inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido, manteniéndose a -70°C hasta su uso posterior.

### **6. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*.**

#### **6.1 Obtención de fracción microsomal**

Se siguió el protocolo descrito por Carmona-Salazar y col. (2011) haciendo un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

#### **6.2 Obtención de vesículas de membrana plasmática.**

Fueron aisladas a partir de las fracciones microsomales utilizando un sistema de distribución de las membranas subcelulares en un sistema de dos polímeros acuosos (polietilen glicol y dextran X-100) [Carmona-Salazar y col. 2011].

### **7. Determinación de proteína por el método de Lowry.**

Para determinar la concentración de proteína en una muestra, se realiza mediante un ensayo colorimétrico, haciendo uso de una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de 1 mg/mL. Para la elaboración de la curva estándar en tubos de ensayo se añade cantidades distintas de BSA (de 0 a 70 µL) y agua. En el caso de la muestra se tiene que añadir en una dilución adecuada para su determinación. Todos los tubos son tratados añadiendo 100 µL de desoxicolato de sodio 0.15% (m/v), 1 mL del reactivo A, el cual contiene partes iguales de CTC (carbonato de sodio 10% (m/v), tartrato sodio-potasio 0.2% (m/v) y sulfato de cobre 0.1% (m/v)), NaOH 0.8 N, SDS 10% (m/v) y H<sub>2</sub>O. Posteriormente se agregan 500 µL del reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu. Diluido 1:5 (v:v) con agua desionizada). Los tubos se dejan reposar cerca de 30 min a temperatura ambiente para desarrollar la coloración azul y posteriormente medir la absorbancia a 750nm.

### **8. Determinación de hidrólisis de ATP**

Tanto los tubos a usar en el ensayo (previamente lavados con Extran y tratados con

ácido sulfúrico), como el recipiente en el que está el medio de hidrólisis ya preparado, se mantienen en una gradilla colocada en un recipiente de unicel con hielo. Se procede a mezclar los componentes necesarios para el medio de hidrólisis a usar. El medio contiene los siguientes componentes a concentraciones finales: 250 mM de sacarosa/ PIPES 20 mM ajustada a pH 6.5 con BTP (Bis-Tris-Propano), 7  $\mu$ M CCCP (Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona), 0.015% Brij 58 (v/v) y 10 mM  $MgCl_2$ . Se colocan 3 tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis total, hidrólisis química (T0) e hidrólisis con inhibidores. En su caso, el medio se suplementa con inhibidores de diferentes enzimas que hidrolizan ATP y que pueden estar en la muestra membranal (si contiene  $Na_3VO_4$  se usa a una concentración final de 200  $\mu$ M; si se usa la mezcla de inhibidores  $NaN_3$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  y  $KNO_3$ , las concentraciones finales son de 2 mM, 2 mM y 50 mM respectivamente). El volumen final de estos tubos con inhibidores también debe ser de 150  $\mu$ L como en todos los casos.

La reacción se inicia con la adición de los 10  $\mu$ g de proteína al primer tubo con medio de hidrólisis, se agita brevemente con la ayuda de un vórtex y se coloca el tubo en una gradilla en un baño de agua a 29°C por 20 min medidos con cronómetro. Se repite lo mismo para cada tubo que contiene sólo medio de hidrólisis o medio con inhibidores en intervalos de 30 segundos de diferencia. En el caso de la determinación de la hidrólisis química sólo se adicionan 150  $\mu$ L del medio de hidrólisis en cada tubo y se coloca en una gradilla a las mismas condiciones que los tubos de hidrólisis total o con inhibidores.

Pasados los 20 min de incubación para cada tubo, se adicionan 150  $\mu$ L de SDS 24% agregándose directamente en el interior del tubo cuando éste aún está en el baño de agua e inmediatamente se agita con ayuda de un vórtex y se transfiere a una gradilla con hielo. Ya detenida la reacción en todos los tubos, se determina el Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP según el método de González- Romo et al. (1992).

Paralelamente al ensayo de hidrólisis de ATP se realiza una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico.

### **9. Determinación de fosfato inorgánico por el método de Chifflet modificado.**

La determinación del Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP, se inicia añadiendo a todos los tubos 300  $\mu$ L de solución B/C (Molibdato de amonio 2% y ácido ascórbico 12% ambos en HCl 1 N) en relación 1:1, esperar de 3 a 7 min a temperatura ambiente y añadir 450  $\mu$ L de reactivo E (2% citrato de sodio, 2% metarsenito de sodio, 2% ácido acético todo disuelto en agua bidestilada). Se esperan 20 min para el desarrollo y

estabilización del color, se lee su absorbancia a 850 nm. En el caso de los tubos de la curva patrón, primero se añaden de 1 a 60  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de fosfato 1 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , llevándolos a un volumen final de 150  $\mu\text{L}$  con agua bidestilada, posteriormente se añaden 150  $\mu\text{L}$  de SDS 24% (p/v).

### **10. Determinación del efecto de la lisofosfatidilcolina (LPC) en la hidrólisis de ATP de la ATPasa de $\text{H}^+$ de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana***

En una gradilla colocada en un recipiente de unicel con hielo se colocan 3 tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis total con o sin LPC, hidrólisis química (T0) e hidrólisis con mezcla de inhibidores con o sin LPC. Se añade a los tubos respectivos 30  $\mu\text{L}$  de LPC 500  $\mu\text{M}$  disuelta en cloroformo/metanol 1:1. Posteriormente se evapora el cloroformo/metanol con ayuda de  $\text{N}_2$  comprimido. Después de la evaporación total se añade el medio de hidrólisis o medio con inhibidores a cada uno de los tubos y se inicia la reacción con la adición de 4  $\mu\text{g}$  de proteína para las líneas control y 2.5  $\mu\text{g}$  para las líneas con menor contenido de esfingolípidos. Ya detenida la reacción en todos los tubos, se determina el Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP.

### **11. Proteólisis controlada de vesículas de membrana plasmática por diferentes tiempos**

Los tubos a usar en el ensayo se mantienen en un recipiente de unicel con hielo. En un tubo de PCR se coloca el medio de proteólisis a usar, añadiéndose a este tubo la cantidad correspondiente al número de ensayos que se vayan a hacer más un poco más, como margen. El medio contiene los siguientes componentes a concentraciones finales: 5 mM de EDTA-BTP a pH = 8, 2 mM de ATP, 250 mM sacarosa, 1.175mg/mL de Brij 58, 25 mM de MOPS-BTP a pH 8.0. Se añaden a los tubos respectivos 8  $\mu\text{L}$  de tripsina preparada a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se inicia la reacción con la adición de 200  $\mu\text{g}$  de proteína, colocando el tubo de PCR en una gradilla en un baño de agua a 29°C y a los 10, 20 y 40 min medidos con cronómetro, se toma una alícuota correspondiente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína y se colocan en un tubo de PCR que contiene el volumen necesario de inhibidor de tripsina de soya a una concentración final 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se colocan en el recipiente de unicel con hielo. Ya detenida la reacción de digestión controlada en todos los tubos, se determina la hidrólisis

de ATP o preparación de geles de acrilamida.

### **11.1 Determinación de hidrólisis de ATP en las muestras digeridas con tripsina**

En una gradilla colocada en un recipiente de unicel con hielo, para cada tiempo de digestión se colocan 3 tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis total e hidrólisis con inhibidores, se añade el medio de hidrólisis o medio con inhibidores a cada uno de los tubos y se inicia la reacción con la adición de 4  $\mu\text{g}$  de proteína digerida con tripsina para las líneas control y 2.5  $\mu\text{g}$  para las líneas con menor contenido de esfingolípidos. Ya detenida la reacción en todos los tubos, se determina el Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP.

### **11.2 Determinación del patrón de digestión de proteínas por electroforesis en geles de acrilamida**

En cada tubo de los diferentes tiempos digestión con tripsina tenemos un volumen equivalente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína más los  $\mu\text{L}$  de inhibidor de tripsina necesarios para una concentración final de 800  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con los que se detuvo la reacción, a ese volumen final de cada tubo se le agrega el doble de  $\mu\text{L}$  de buffer de carga. Posteriormente se calculan los  $\mu\text{L}$  necesarios para tener 32  $\mu\text{g}$  para aplicar al gel de la inmunoréplica o 15  $\mu\text{g}$  para la tinción con plata. Se cargan las muestras tratadas con o sin tripsina con las puntas para electroforesis en el gel de acrilamida. Todas las muestras se cargan aproximadamente al mismo volumen, la diferencia se completa con buffer de ajuste de peso. Se procede sobrecorrer el gel para poder visualizar la banda de ATPasa mediante la tinción de plata e inmunoréplica.

## **12. Preparación de geles de acrilamida**

**Las proteínas de las vesículas de membrana plasmática fueron separadas electroforéticamente de acuerdo a la técnica de Schangger y von Jagow (1987). El precodimiento utilizado es el siguiente:**

- a) Limpiar los vidrios de lado que va a estar en contacto con el gel con unas gotas de SDS 3%.
- b) Colocar el separador de 1.5mm entre los dos vidrios y montarlos en el soporte cuidando

que los cojines tengan vaselina para que no se escurra. Primero se coloca en la ranura y después se atorán en el soporte con los cojines. Se les pone un poco de H<sub>2</sub>O destilada dentro de los vidrios y se espera un rato para comprobar que no haya fugas del ensamblado de vidrios.

c) Preparación del gel separador. En un vaso de precipitado agregar los reactivos en el orden de la lista:

1. 2315  $\mu$ L de Acrilamida-bis acrilamida
2. 2315  $\mu$ L de Buffer del gel (Tris-SDS pH= 8.9 /HCl)
3. 940  $\mu$ L de Glicerol
4. 1405  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada

En este momento revisar que el soporte armado no haya dejado pasar el agua y retirar el agua volteando el soporte, secar entre los vidrios con tiras de papel filtro.

5. 23.5  $\mu$ L de Persulfato de amonio 10%
6. 2.4  $\mu$ L de TEMED (Tetrametiletilendiamina) y una vez puesto, mezclar e inmediatamente añadir entre los vidrios.

d) Una vez lleno el espacio entre los vidrios, se deposita encima, cuidadosamente, un poco de SDS 0.3% sobre el gel para prevenir la formación de una superficie cóncava de menisco y se deja polimerizar 30 min a temperatura ambiente.

e) Después de los 30 min, se comprueba que ya hayan polimerizado el gel inclinando un poco el soporte donde están los vidrios. Una vez polimerizado, se desecha el SDS y se seca el exceso con papel filtro.

f) Se prepara el gel concentrador, colocando los reactivos en el orden de la lista:

1. 330  $\mu$ L de Acrilamida-bis acrilamida
2. 620  $\mu$ L de Buffer del gel (Tris-SDS, pH= 8.9 /HCl)
3. 1530  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada
4. 23.5  $\mu$ L de Persulfato de amonio 10%
5. 2.4  $\mu$ L de TEMED

g) Se vacía un poco del gel concentrador entre los vidrios que contienen al gel separador y se coloca el peine de 15 pozos introduciéndolo casi hasta el final del peine.

h) Se deja polimerizar 1 h a temperatura ambiente y se observa que los carriles no se contraigan en ese caso, se agregan más gel concentrador.

i) Una vez polimerizado se remueve lentamente el peine del gel concentrador.

j) Fijar el gel con las placas de vidrio en el soporte de la cámara de electroforesis (vidrio pequeño queda hacia adentro).

- k) Se llena la cámara del soporte con el buffer del cátodo casi hasta arriba de las placas de vidrio.
- l) Cargar las muestras previamente tratadas con o sin tripsina con las puntas para electroforesis. Todas las muestras se cargan aproximadamente al mismo volumen, la diferencia se completa con buffer de ajuste de peso.
- m) Se coloca el buffer del ánodo en la cámara de electroforesis hasta que cubra los primeros tornillos de las placas del gel.
- n) Se coloca la tapa de la cámara de electroforesis haciendo coincidir los extremos del ánodo y del cátodo. Se conecta a la fuente de poder. Se deja correr el gel a 50 volts por 30 min (para que se apilen en una línea en el gel concentrador) y 100 volts por 2 h (se deja sobrecorrer el gel para poder visualizar la banda de ATPasa).

### **13. Tinción de geles con plata (Método de Vorum)**

- Fijación. Se prepara una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.05% (sólo puede ser el de Sigma, No. cat. 200-001-8). Se deja el gel en esta solución durante 2 h con agitación constante suave a temperatura ambiente.
- Lavado. Se remueven los geles de la solución fijadora y se lavan 3 veces en lavados de 20 min cada uno con una solución de etanol al 35%, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Sensibilización. Se mantiene el gel durante 5 min en una solución de tiosulfato de sodio 0.02%, en agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Lavado 2. Se lleva a cabo con agua bidestilada, 3 veces durante 5 min cada vez, con agitación suave y constante a temperatura ambiente. Este lavado es crítico, pues de excederse el tiempo, el gel no se tiñe y se tiene que volver a empezar con la fijación.
- Adición de la solución de plata. Se coloca el gel en una solución de  $\text{AgNO}_3$  0.2%, formaldehído 0.076% (123  $\mu\text{L}$  de formaldehído para 30 mL de solución de  $\text{AgNO}_3$ ); durante 20 min, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Lavado 3. Se lleva a cabo con agua bidestilada, 2 veces cada vez durante un 1 min, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Revelado. Después de enjuagar, se pone el gel en una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6%, formaldehído 0.05% y tiosulfato de sodio 0.0004%, con agitación suave y constante a temperatura ambiente, hasta que aparezca las bandas.
- Terminación del revelado. Se añade la solución stop. Consiste en metanol 50% y ácido acético 12%, manteniendo por 5 min, con agitación suave y constante a temperatura

ambiente.

- Almacenamiento del gel. Se prepara una solución de ácido acético al 1% en la que se guarda el gel a 4°C, protegido de la luz. Antes se puede escanear y posteriormente secar.

### **14. Secado de geles.**

Los geles apenas revelados se escanean y posteriormente se secan para preservarlos definitivamente. También se pueden re'escanear, pues tienen menor grosor.

Método de secado con calor y vacío.

- Colocar el gel teñido sobre una hoja de papel absorbente 3M, previamente humedecido y cubrir el gel con una hoja de papel celofán, alisar y eliminar burbujas.
- Recortar el celofán según el tamaño de cada gel.
- Colocar el gel preparado sobre la hoja de papel del equipo y taparlo con la hoja de plástico del mismo.
- Conectar y encender el vacío a 80°C durante 1.5 h.

### **15. Inmunoréplica.**

- Remover el gel de las placas de vidrio, cortar una esquina para marcar como referencia. Se transfiere el gel a un envase que contiene disolución amortiguadora de transferencia. Se pone en agitación rotatoria mínimo 15 min (máximo 30 min) a temperatura ambiente.
- Ensamblaje del cassette:
  - a) Se abren las rejillas del cassette. Sobre una de ellas se coloca una capa de esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia.
  - b) Sobre la esponja se coloca un cuadro de papel filtro empapado con disolución amortiguadora de transferencia.
  - c) Encima del papel filtro se coloca el gel o los carriles del gel que se transfirieron (una vez de incubado el gel en la disolución amortiguadora de transferencia).
  - d) Sobre el gel se pone una hoja de PVDF previamente humedecida con metanol y disolución amortiguadora de transferencia, de un tamaño correspondiente al del gel o a los carriles que se transfirieron.
  - e) Se corta la esquina de la membrana de PVDF donde estaba la correspondiente en el gel.
  - f) Sobre la membrana de PVDF se coloca otro papel filtro también empapado con

disolución amortiguadora de transferencia.

g) Se rueda 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.

h) Se añade la segunda esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia y se cierra la rejilla del cassette.

- El cassette se pone en la cámara de electrotransferencia, orientado de manera que el gel esté 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 reutilizada tres veces más).

- Se enciende la fuente de poder y se realiza la electrotransferencia en las siguientes condiciones: Para geles de 1.5 mm de grosor se utilizó 25 volts por 3 h.

- Al término, se apaga la fuente de poder y se remueve el cassette. Se abre el cassette y cuidadosamente se separa la membrana de PVDF. Se pone la membrana en un recipiente que contiene disolución de TTBS (se puede almacenar en TBS hasta por 2 días a 4 °C), cuidando que la cara que estuvo en contacto con el gel quede hacia arriba. Se realizan dos lavados con disolución de TTBS y un lavado con disolución de TBS, cada lavado es de 5 min en agitación suave y constante a temperatura ambiente.

- Se remueve el TBS y se cambió por disolución bloqueadora y se mantiene en agitación suave y constante por 1 h a temperatura ambiente.

- Se remueve la disolución bloqueadora y se realizan nuevamente 2 lavados con TTBS en agitación rotatoria por 5 min cada uno y posteriormente con TBS igual por 5 min.

- Se remueve el TBS y se añade la disolución con el primer anticuerpo (ver Apéndice).

- Se remueve la solución del primer anticuerpo y se realizan nuevamente 2 lavados con TTBS en agitación rotatoria por 5 min cada uno y posteriormente con TBS igual por 5 min.

- Se remueve el TBS y se añade la solución con el segundo anticuerpo (ver Apéndice).

- Se remueve la solución con el segundo anticuerpo y se realizan nuevamente 2 lavados con TTBS en agitación rotatoria por 5 min cada uno y posteriormente con TBS igual por 5 min.

- Se remueve el TBS y se añade la disolución para desarrollar color (ver Apéndice). De inmediato se puso en agitación suave. Las bandas se hacen haciendo visibles dependiendo de la cantidad de proteína presente. La reacción se detiene con agua desionizada.

## RESULTADOS

1. Efectos fenotípicos del silenciamiento de la subunidad LCB2b en plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

Se realizó el registro fotográfico de los efectos fenotípicos de la inducción con metoxifenoazida para verificar la concentración con la cual el insecticida Intrepid® induce el silenciamiento del gen *LCB2b* en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. El fenotipo observado en plantas adultas de la línea silvestre y la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con y sin exposición a la metoxifenoazida a una concentración 1:10000 (v:v) se muestra en la Figura 6, en donde se observa la aparición de algunas hojas cloróticas en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* al día 5 posterior a la exposición con el inductor. Esto corrobora lo reportado en trabajos anteriores en el laboratorio y lo descrito en el trabajo de Dietrich y col. (2008). Como podemos observar en la Figura 6B, el fenotipo de la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* al día 5 posterior a la inducción es reproducible en gran escala. Por ello, se decidió que las plantas de la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducidas con metoxifenoazida en estas condiciones, se utilizarían para la obtención de las vesículas de membrana plasmática y su posterior medición de la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, y así asegurarse de los efectos de la inducción del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT.



**Figura 6A. Efectos fenotípicos del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT de la parte aérea en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* tratada con el inductor intrepid®.** Las plantas adultas de la línea silvestre y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* se asperjaron con la metoxifenoazida (1:10000, v:v) cubriendo completamente la parte aérea. Se realizó el registro fotográfico del día 0 y del día 5 posterior a la inducción. Se denota con un (-) a las plantas que no se asperjaron con la disolución de metoxifenoazida y con un (+) a las que sí se asperjaron. Las flechas indican la clorosis presente en las hojas.

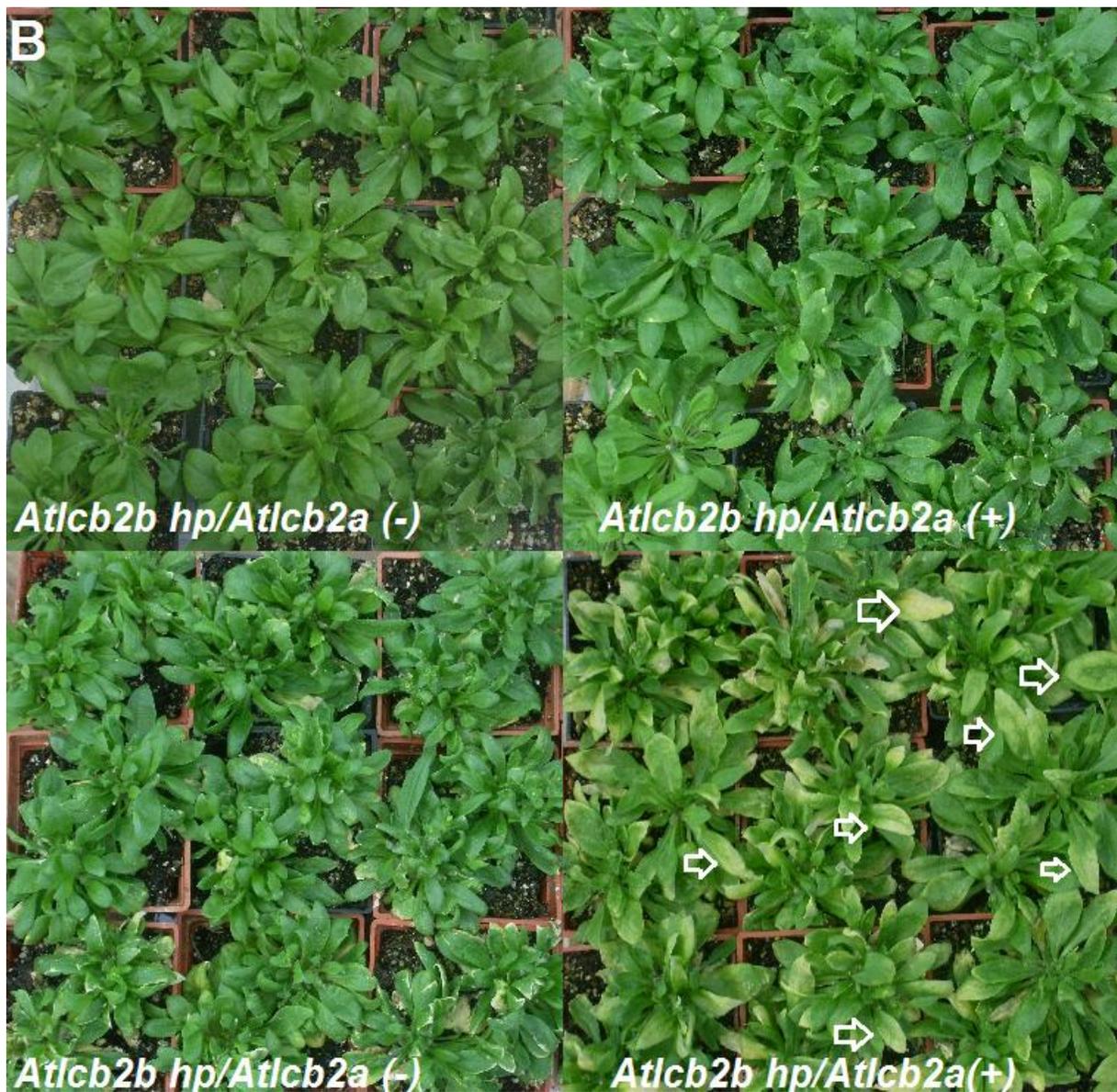


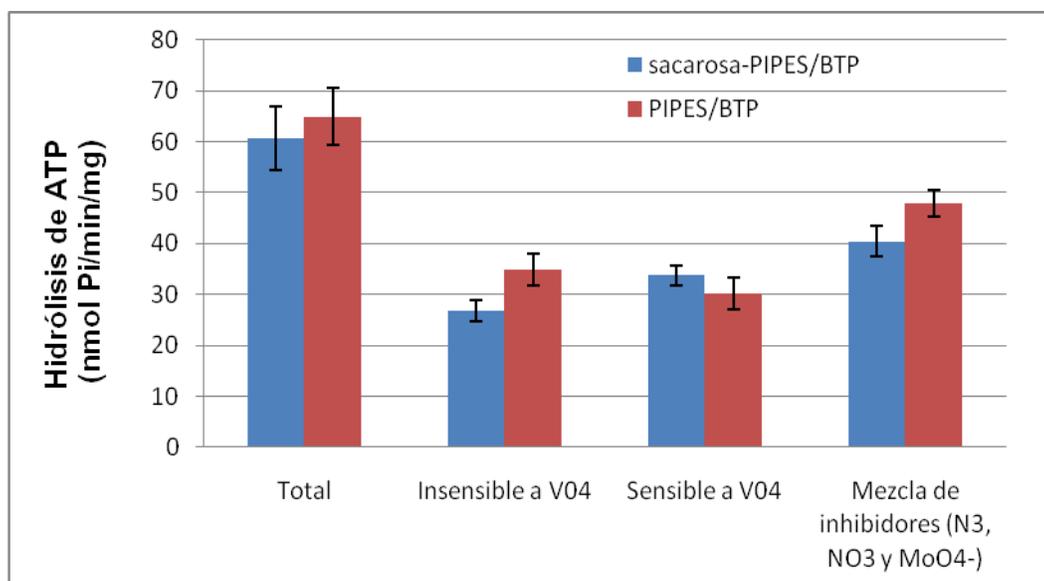
Figura 6B. Reproducibilidad de los efectos fenotípicos del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la serina palmitoiltransferasa en plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* tratadas con o sin el inductor intrepid®. Se asperjaron las plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con la metoxifenozida (1:10000, v:v). Se realizó el registro fotográfico del día 0 y del día 5 posterior a la inducción. Se denota con un (-) a las plantas que no se asperjaron con la disolución de metoxifenozida y con un (+) a las que sí se asperjaron. El panel superior corresponde al tiempo 0, antes de iniciarse la inducción y el inferior muestra a las plantas a los 5 días de inducción. Las flechas indican la clorosis presente en las hojas.

## 2. Optimización de las condiciones de medición de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup>

En trabajos anteriores en el laboratorio, la determinación de la hidrólisis de ATP de las vesículas de *Arabidopsis thaliana* se había llevado a cabo en un medio de reacción que contiene 250 mM de sacarosa/ PIPES 20 mM, ajustada a pH 6.5 con BTP (Bis-Tris-Propano), pero se ha reportado que la sacarosa tiene un efecto inhibitorio en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, tanto en el transporte de H<sup>+</sup> como en la hidrólisis de ATP, en vesículas de membrana plasmática de centeno, soya y maíz [Bérczi y Møller, 1987; Grouzis y col., 1987; Kasai y Sawada, 1994]. Se ha explicado que posiblemente en este efecto inhibitorio de la sacarosa en la actividad de la ATPasa, se encuentra involucrada la región del carboxilo terminal [Kasai y col., 2000]. Por ello, en este trabajo de tesis, para evitar resultados falsos negativos en el estudio del papel de la región del carboxilo terminal en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (en plantas con menor contenido de esfingolípidos), inicialmente se exploró la determinación de la hidrólisis de ATP en fracciones de membrana plasmática de la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* en un medio con o sin sacarosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7A, en donde se observa que no hay una diferencia significativa en la actividad de hidrólisis total de ATP medida en presencia de sacarosa 250 mM (barras azules), con respecto a la actividad de hidrólisis total de ATP medida sin sacarosa (barras rojas). Este mismo comportamiento se observa en la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de inhibidores de las posibles diferentes fuentes enzimáticas de fosfato inorgánico que se miden en el ensayo de ATPasa.

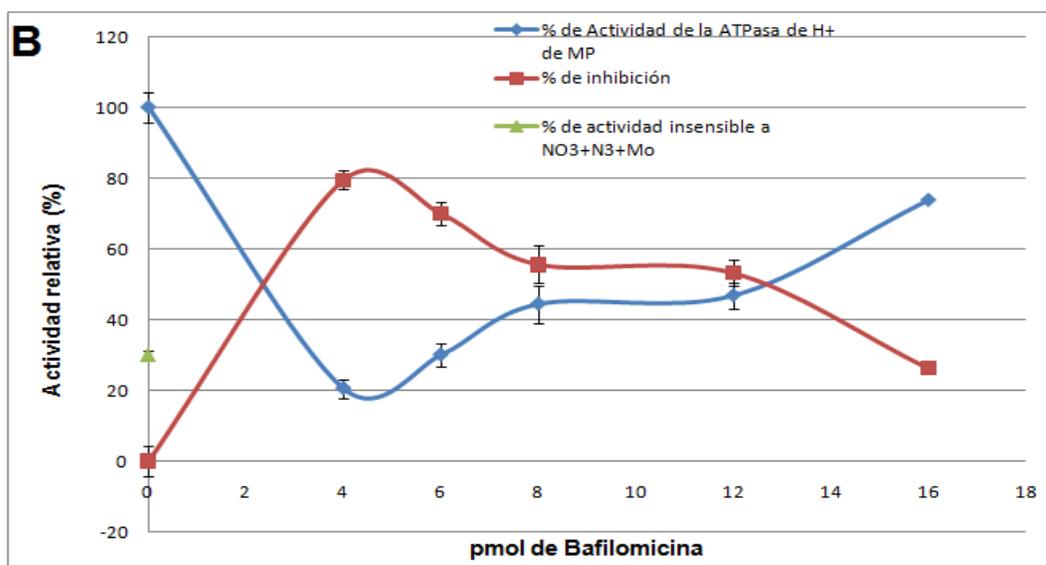
Por otra parte, en la determinación de la actividad de hidrólisis de ATP específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, regularmente se utilizan inhibidores específicos de otras enzimas que aunque estén en bajas cantidades en las preparaciones de vesículas de membrana plasmática, pueden contribuir a la hidrólisis de ATP: ATPasas tipo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (particularmente la ATPasa mitocondrial), fosfatasas y de ATPasas tipo V (particularmente la de la membrana vacuolar o tonoplasto). Para esta última, en el laboratorio y en la literatura se ha utilizado como inhibidor al KNO<sub>3</sub>, el cual solo es efectivo a concentraciones milimolares o mayores, es decir no es un potente inhibidor específico de la ATPasa vacuolar, mientras que la Bafilomicina A1 de *Streptomyces griseus* se ha descrito como un potente inhibidor específico de la ATPasa tipo V de células animales, plantas y

microorganismos, y que es efectiva a concentraciones nanomolares [Bowman y col., 1988; Dröse y col., 1993]. Por la tanto, se probó la Bafilomicina A1 en vez del nitrato para asegurarnos de que la actividad medida en presencia de los inhibidores correspondiera solo a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Para ello se determinó primero la actividad de hidrólisis de ATP en función de la cantidad de bafilomicina (pmol) para encontrar la concentración óptima de bafilomicina en la inhibición de la ATPasa tipo V.



**Figura 7A. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática en un medio con o sin sacarosa.** Se midió la hidrosis de ATP de fracciones microsomales de la línea silvestre en un medio con o sin sacarosa. La gráfica muestra los promedios de la hidrólisis total e hidrólisis con inhibidores, expresada en nmol Pi/min/mg ±EE. Se realizaron 3 repeticiones como mínimo para cada condición usando una preparación membranaral.

En la Figura 7B se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones de actividad de ATPasa en presencia de Bafilomicina A1 en el medio de reacción. Al graficar el porcentaje de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática con respecto a la actividad medida en ausencia de inhibidores, podemos observar que la actividad disminuye un 80% a los 4 pmol de Bafilomicina A1 y posteriormente la actividad aumenta de manera casi proporcional a la cantidad de bafilomicina, y esto se correlacióna con el porcentaje de inhibición de la Bafilomicina A1 en la actividad, en donde al aumentar la cantidad de Bafilomicina A1 el porcentaje de inhibición disminuye, como se observa en la línea roja de la gráfica de la Figura 7B. Estos resultados indican que la Bafilomicina A1 también estaba inhibiendo a la ATPasa de la membrana plasmática.

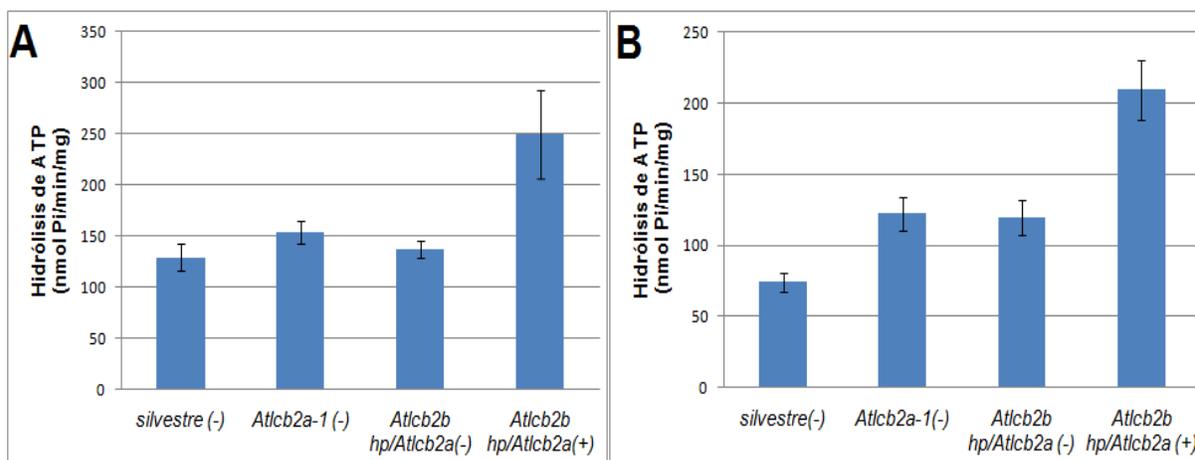


**Figura 7B. Determinación del efecto de la Bafilomicina A1 en la actividad de hidrólisis de ATP en fracciones microsomales de *Arabidopsis thaliana*.** Actividad medida con diferentes cantidades de Bafilomicina A1 (pmol) y en presencia de los inhibidores  $\text{NaN}_3$  y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  a un concentración 2 mM cada uno. Se graficó el % de actividad de la ATPasa tomando como 100% a la actividad medida en ausencia de los inhibidores. Se realizaron 6 repeticiones mínimo para cada condición provenientes de 2 preparaciones independientes. Solo en el caso de las condiciones 4 y 6 pmoles de bafilomicina se realizaron 3 repeticiones.

### 3. Reproducción de los resultados de medición de actividad de hidrólisis de ATP de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

Experimentos anteriores de medición de actividad de ATPasa de  $\text{H}^+$  en vesículas purificadas de membrana plasmática, demostraron que en la línea mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* que tiene un contenido 34% menor de esfingolípidos totales al ser inducida con metoxifenozida, la actividad de la ATPasa de  $\text{H}^+$  está aumentada alrededor de un 100% con respecto a la actividad de la enzima de las plantas silvestres y de los otros controles *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir. Se desconoce si hay desplazamiento de la región del carboxilo terminal durante esta activación. Por ello, para poder determinar si en estas plantas de la línea mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* con 5 días de inducción con metoxifenozida que fenotípicamente mostraban evidencias del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT, mostraban un aumento de la actividad de ATPasa en las vesículas de membrana plasmática, medimos la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de  $\text{H}^+$ . En esta línea se espera tener una actividad mayor con respecto a la silvestre y a las líneas control. Ya con

estas condiciones, podíamos determinar si la región del carboxilo terminal estaba involucrada en esta activación.

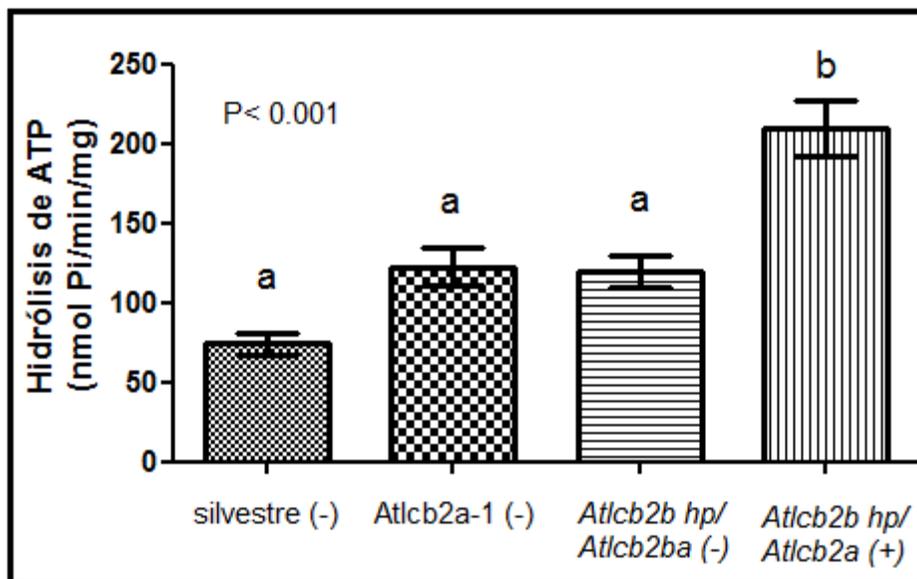


**Figura 8. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin el inductor (1:10000, v:v) por 5 días.** Las plantas que se asperjaron con la disolución de metoxifenoza se denotan con un (+) y las que no se asperjaron se denotan con un (-). De estas plantas, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las vesículas de membrana plasmática a las que se les determino la hidrólisis de ATP. (A) La gráfica muestra los valores promedio de hidrólisis total de ATP obtenidos para cada línea, expresados como nmol Pi/min/mg  $\pm$ EE. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, expresados como nmolPi/min/mg  $\pm$ EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

En la Figura 8A se observa el comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP llevada a cabo por las vesículas de membrana plasmática que podían tener diferentes enzimas que utilizan ATP como sustrato, si bien se espera que entre estas enzimas se encuentre de manera mayoritaria la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. A esta hidrólisis se le denomina hidrólisis total. En la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, se observa una actividad de hidrólisis de ATP similar: entre valores de 130 a 150 nmol Pi/min/mg de proteína, mientras que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con la metoxifenoza muestra una mayor actividad, alcanzando valores arriba de los 200 nmol Pi/min/mg de proteína.

Con el objetivo de asegurarnos que la actividad medida correspondía solo a la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y así poder analizar los componentes que contribuyen a la hidrólisis de ATP en la línea con menor contenido de esfingolípidos, se utilizaron inhibidores selectivos de las posibles enzimas presentes en las vesículas membranales que podrían participar en la hidrólisis de ATP medida. En la Figura 8B se

muestra la actividad de hidrólisis de ATP insensible a los inhibidores nitrato, molibdato o azida, que corresponde a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. Como se observa en la gráfica, en la línea silvestre la actividad es de 75 nmol/min/mg, mientras que en las líneas control: la *Atlcb2a-1* y la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, hay un aumento en la actividad con respecto a la silvestre, llegando a valores de aproximadamente de 120 nmol Pi/min/mg. Comparados estos valores con los de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida por 5 días con la metoxifenoza, ésta tiene una mayor actividad que todas las anteriores, mostrando valores arriba de los 260 nmol Pi/min/mg de proteína. Al realizar el análisis (ANOVA) para determinar si había o no diferencias significativas entre cada línea y aplicando la prueba de comparación de medias de Bonferroni [Mendenhall y Sincich, 1997] (Figura 9), se estableció que no había diferencia significativa entre los valores de hidrólisis de ATP de la línea silvestre y de las dos líneas control, y que solo la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a la metoxifenoza es estadísticamente diferente tanto a la línea silvestre como a las dos líneas control como se muestra en la Figura 9.

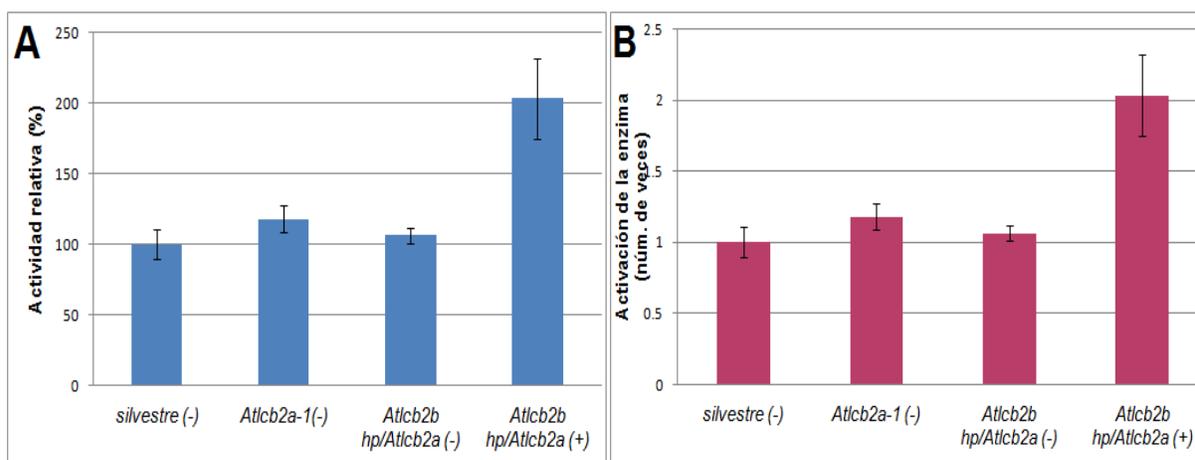


**Figura 9. Análisis estadístico de los valores medidos de la actividad de hidrólisis de ATP de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*.** Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5* aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni. Los datos procesados fueron tomados de la Figura 8B.

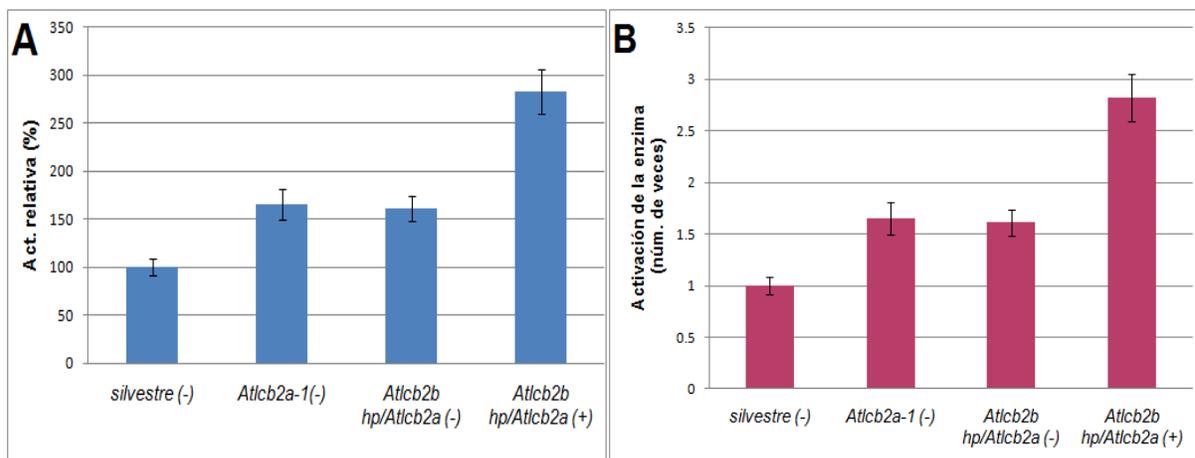
En las gráficas anteriores, las comparaciones de las actividades de hidrólisis de ATP entre las diferentes líneas, se hicieron tomando los valores absolutos de las actividades. Para poder visualizar el aumento de actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida, ahora

en términos porcentuales, se comparó la actividad de cada línea con respecto a la línea silvestre sin inducir (Figuras 10A y 11A). Se observa que la actividad de hidrólisis total de ATP y la hidrólisis específica de ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida está aumentada arriba del 100% con respecto a la actividad de la enzima de las plantas silvestre y controles *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir. Otra manera de expresar este aumento de la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida es mediante activación de la enzima en número de veces como se observa en la Figura 10B y 11B, indicándonos una activación de 2 y 2.8 veces con respecto a la silvestre, en la actividad total y la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de la membrana plasmática, respectivamente.

Como se puede observar en las dos gráficas de la Figura 8, no se realizaron mediciones de actividad en las líneas silvestre y línea mutante *Atlcb2a-1* tratadas con metoxifenoazida, porque en trabajos anteriores [González Reyes, 2010; Mejía Hernández, 2010] se había determinado que no había un efecto de la adición de la metoxifenoazida ni a nivel fenotípico ni en la actividad de ATPasa al tratarse las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* con o sin el inductor.



**Figura 10. Comparación de la actividad total de ATPasa de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, ambas con respecto a la actividad de hidrólisis de ATP de la línea silvestre sin inducir.** (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad relativa en % ±EE obtenidos para cada línea con respecto a la silvestre, basado en los datos de la Figura 8A. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces ±EE obtenidos para cada línea con respecto a la silvestre, basado en los datos de la Figura 8A.



**Figura 11. Comparación de la actividad específica de ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de las líneas *At1cb2a-1* y *At1cb2b hp/At1cb2a*, ambas con respecto a la actividad de hidrólisis de ATP de la línea silvestre sin inducir.** (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad relativa en % ±EE obtenidos para cada línea con respecto a la silvestre, basado en los datos de la Figura 8B. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces ±EE obtenidos para cada línea con respecto a la silvestre, basado en los datos de la Figura 8B.

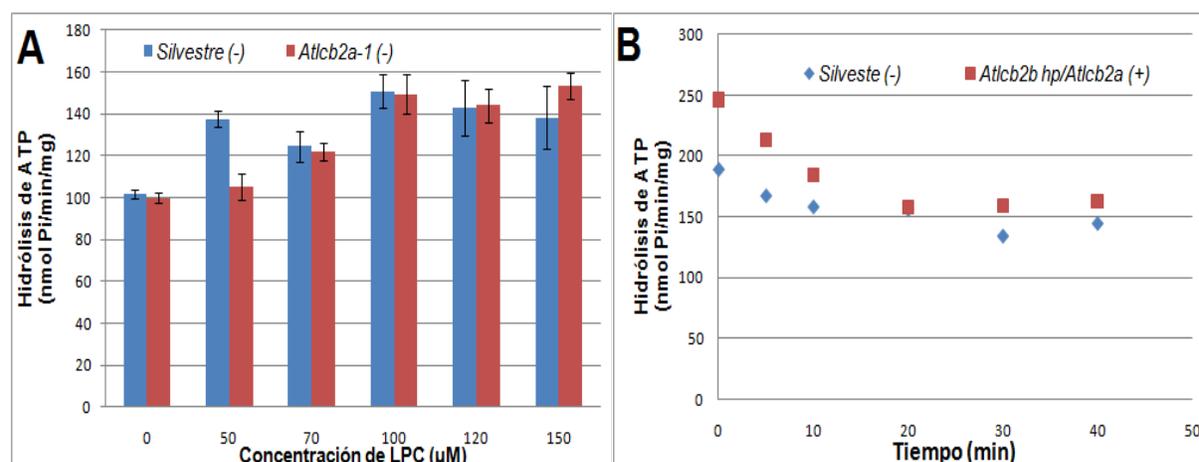
#### 4. Establecimiento de las condiciones óptimas para medir la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática por LPC.

El estudio de la regulación de la ATPasa de H<sup>+</sup> por su región carboxilo terminal en la enzima de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* requirió primero de la determinación de las condiciones óptimas de la activación de la ATPasa por lisofosfatidilcolina (LPC), una molécula que se ha reportado que está involucrada en el control de la catálisis de la enzima a través de un mecanismo que utiliza al extremo carboxilo del a ATPasa. Las condiciones experimentales incluyeron la medición de la actividad de ATPasa dependiente de la concentración de LPC y el tiempo de preincubación. Los valores determinados están representados en la Figura 12. En la determinación de la actividad de hidrólisis de ATP variando la concentración de LPC (sin tiempo de preincubación) representada en la Figura 12A se observa que la actividad aumentaba de manera proporcional a la concentración de LPC hasta los 100 μM, concentración a la cual se alcanzó la actividad máxima y que se mantuvo aún a concentraciones mayores (120 y 150 μM) en las líneas silvestre y *At1cb2a-1*.

Por otra parte, en la determinación del comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP variando el tiempo de preincubación con LPC 100 μM y que se representa en la Figura 12B, se observa que la actividad de hidrólisis de ATP fue disminuyendo conforme aumenta el tiempo de preincubación en las dos líneas graficadas, llegando a permanecer constante

entre los 20 y 40 min de preincubación en la línea silvestre y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida.

En resumen, las condiciones óptimas para ensayar los efectos de LPC en la actividad de hidrólisis de ATP en la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducir fueron una concentración 100  $\mu\text{M}$  de LPC sin preincubación.



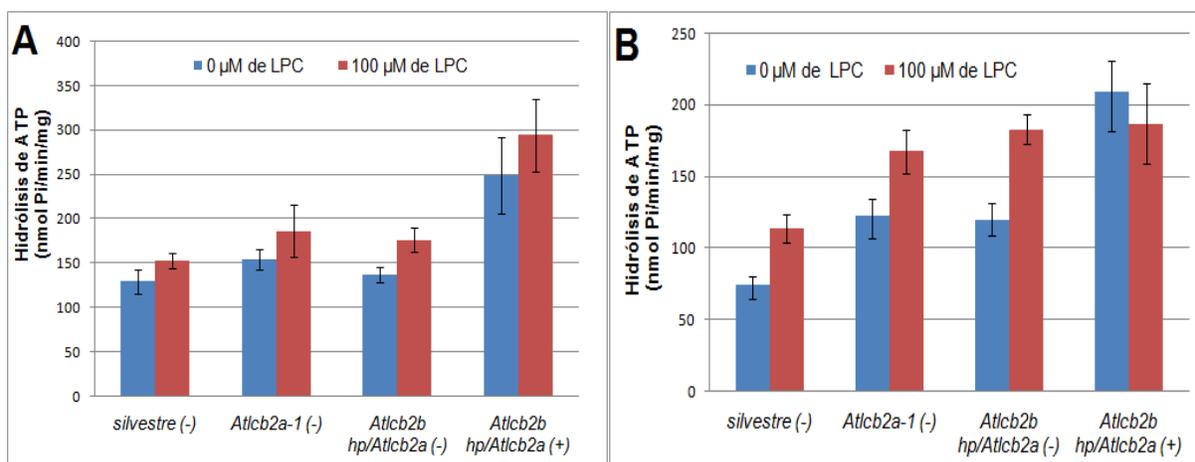
**Figura 12. Determinación de las condiciones óptimas para medir la activación de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de membrana plasmática por LPC en vesículas de membrana plasmáticas de hojas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción.** Se midió la actividad de hidrólisis de ATP insensible a los inhibidores nitrato, molibdato y azida. (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad medida a diferentes concentraciones de LPC ( $\mu\text{M}$ ) sin preincubación obtenidos para cada línea, expresados como nmol Pi/min/mg  $\pm$ EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. (B) la gráfica muestra los valores promedio de la actividad medida a diferentes tiempos de preincubación de LPC 100  $\mu\text{M}$ , expresados como nmol Pi/min/mg  $\pm$ EE. Se realizaron 2 mediciones para cada línea usando 2 preparaciones independientes.

### 5. Determinación de la activación de la ATPasa de $\text{H}^+$ de membrana plasmática por LPC.

En la Figura 13A se muestra el comportamiento de la actividad de hidrólisis total de ATP en vesículas de membrana plasmática de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción, en presencia de LPC 100  $\mu\text{M}$  sin preincubación, observándose que tanto en la línea silvestre como en las controles *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir no hay un aumento significativo de la actividad de hidrólisis total de ATP en presencia de LPC con respecto a la basal de cada una de ellas. En el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a la metoxifenoazida, tampoco se observa un cambio en la actividad cuando se incubaba en presencia de LPC, pero se sigue teniendo una mayor actividad de hidrólisis de ATP con respecto a las líneas silvestre y las líneas controles,

alcanzando valores de actividad mayores a los 250 nmol Pi/min/mg proteína con o sin LPC, mientras que en la líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, los valores de actividad medida son menores a 180 nmol Pi/min/mg aún en presencia de LPC. En la Figura 13B se observa el comportamiento de la actividad medida en presencia de los inhibidores nitrato, amonio y azida, correspondiente a la actividad de hidrólisis de ATP específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, en la cual se observa que tanto en la línea silvestre como en las líneas control en presencia de LPC hay un incremento de la actividad con respecto a la actividad basal de cada línea, mientras que en la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida, la actividad medida con o sin LPC no cambia.

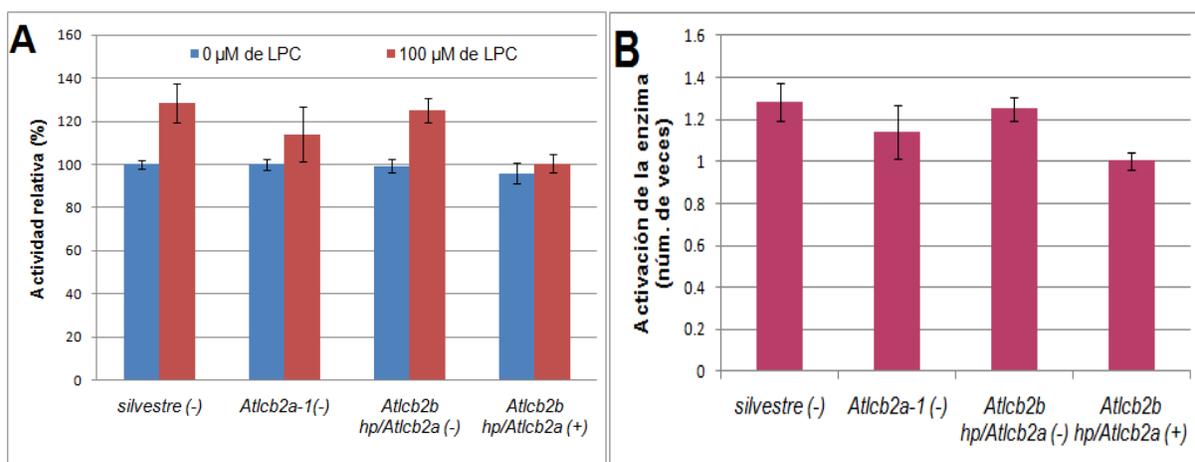
Para poder visualizar el efecto de la LPC en la actividad de hidrólisis de ATP en cada una de las líneas, se comparó la actividad medida en presencia de LPC de cada línea con respecto a la basal de cada una de ellas en términos relativos (%), como se muestra en las Figuras 14 y 15.



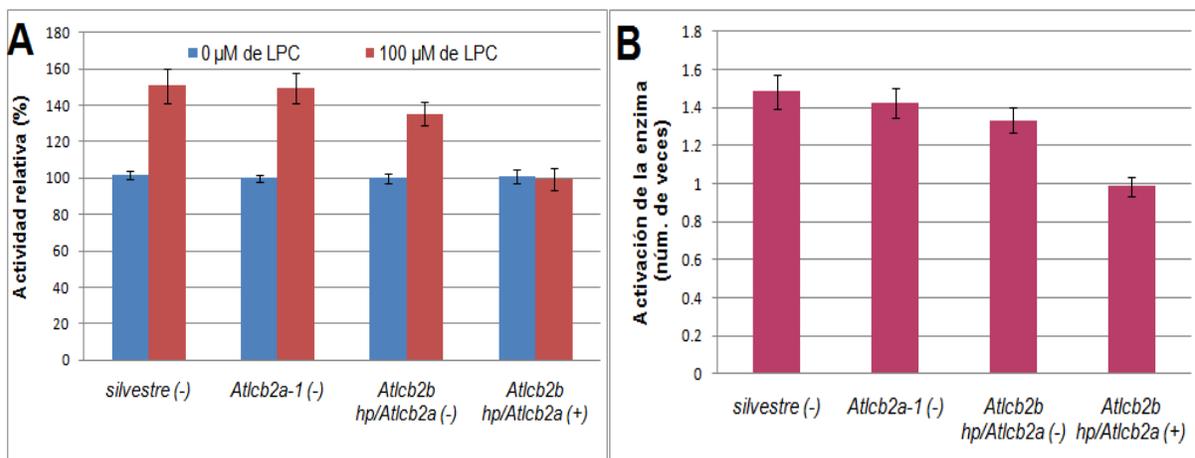
**Figura 13. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP con o sin LPC en vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.** (A) La gráfica muestra los valores promedio de hidrólisis total de ATP obtenidos para cada línea, expresados como nmol Pi/min/mg ±EE. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, expresados como nmolPi/min/mg ±EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. Las plantas que se asperjaron con la disolución de metoxifenoza se denotan con un (+) y las que no se asperjaron se denotan con un (-).

Como podemos observar en la Figura 14A el aumento de la actividad de hidrólisis total de ATP en presencia de LPC en la línea silvestre y en la línea control *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir es de un 25 % aproximadamente con respecto a la basal de cada una de ellas, mientras que en la línea control *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida no

hay un aumento en la actividad. Visto de otra manera, solo en la línea silvestre y la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, la activación de la enzima es 1.25 veces con respecto a su basal como se muestra en la Figura 13B. Considerando ahora la actividad específica de hidrólisis de ATP proveniente de la ATPasa de membrana plasmática, en la Figura 14 se observa que ésta aumentó un 45% en presencia de LPC (Figura 14A) o bien que se activa 1.45 veces (Figura 14B), tanto en la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, mientras que en la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida no hay un aumento o activación de la enzima en presencia de LPC.



**Figura 14. Comparación de la actividad total de ATPasa en presencia de LPC (100 μM) en las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción, con respecto a su basal.** (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad relativa en % ±EE obtenidos para cada línea con respecto su basal, basado en los datos de la Figura 13A. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces ±EE obtenidos para cada línea con respecto a la basal de cada una de ellas, considerando los datos de la Figura 13A.

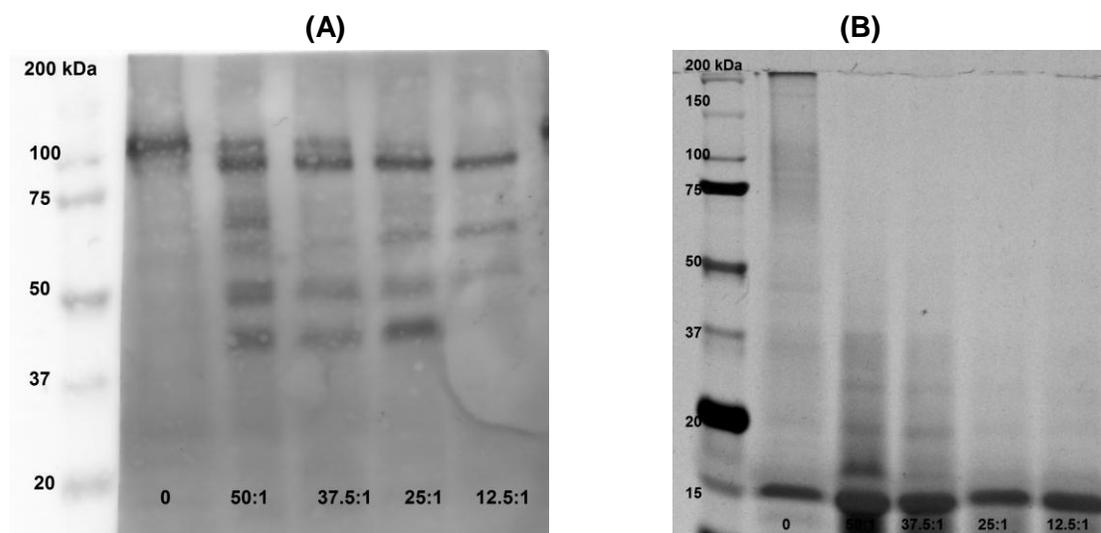


**Figura 15.** Comparación de la actividad de hidrólisis de ATP específica de ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática en presencia de LPC (100 μM) en las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducir, con respecto a su basal. (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad relativa en % ±EE obtenidos para cada línea con respecto su basal, empleando los datos de la Figura 13B. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces ±EE obtenidos para cada línea con respecto a la basal de cada una de ellas, basado en los datos de la Figura 13B.

## 6. Establecimiento de las condiciones óptimas para medir la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática por digestión con tripsina.

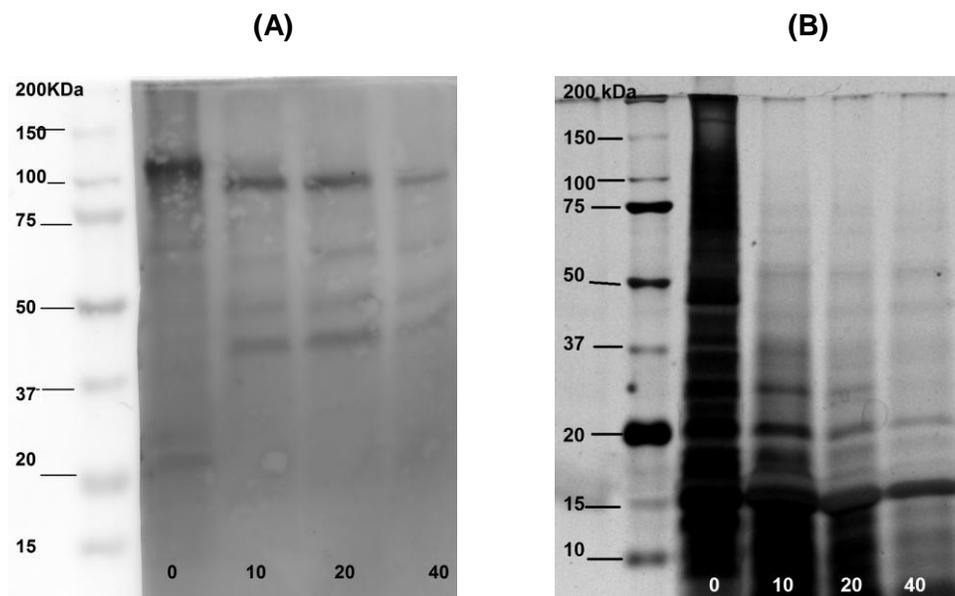
Por trabajos anteriores se sabe que la región del carboxilo terminal es un dominio autoinhibitorio que regula la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, sugiriendo que un aumento en la actividad de la enzima se debe a un desplazamiento de esta región conteniendo al carboxilo terminal y en consecuencia dejándolo más accesible a la digestión por tripsina [Axelsen y col., 1999; Piette y col., 2011]. Por lo tanto, para ver el efecto de la proteólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> por tripsina en la actividad de hidrólisis de ATP en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* después de 5 días posteriores a la inducción), había que controlar primero la proteólisis de la ATPasa, lo cual se registra mediante la visualización del patrón de digestión por inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Posteriormente, ya se mide la actividad enzimática de hidrólisis de ATP. La determinación de las condiciones óptimas para observar la proteólisis de la región del carboxilo terminal de la ATPasa incluyó la proteólisis de la ATPasa H<sup>+</sup> por tripsina dependiente de la relación proteína:tripsina y los diferentes tiempos de proteólisis, como se muestra en las Figuras 16 y 17. En la determinación del patrón de digestión por inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> variando la relación proteína:tripsina a un tiempo de 11 min representado en la Figura 16A,

se observó que la banda de 100 kDa que corresponde a la ATPasa de H<sup>+</sup> fue disminuyendo conforme aumentaba la proporción de tripsina a proteína y al mismo tiempo va apareciendo una banda de aproximadamente 90 kDa que correspondería a la ATPasa sin la región del carboxilo terminal, y que al alcanzar la relación 37.5:1 (proteína:tripsina) se logra observar con claridad todavía la banda de 100 kDa. Por lo tanto, para ver más lentamente este proceso de proteólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup>, se procedió a variar el tiempo de digestión con una relación 50:1 (proteína:tripsina), que es la relación en la que se observan muy claramente las bandas de 100 y 90 kDa en las vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre tratadas con tripsina. Ya con esta relación proteína membranal:tripsina, podemos observar en la Figura 17, el proceso de proteólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> a diferentes tiempos a una misma relación proteína:tripsina. El patrón de digestión es similar al visto en la Figura 16, en donde la banda de 100 kDa va desapareciendo y generándose una de 90 kDa. Por lo tanto las condiciones óptimas para ensayar los efectos de la proteólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> por tripsina en la actividad de hidrólisis de ATP en la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción son utilizando una relación proteína:tripsina 50:1 a los 0, 10 y 40 min de exposición.



**Figura 16. Determinación de la concentración óptima de tripsina sobre la remoción de la región del extremo carboxilo de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática.** Vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre se trataron con diferentes relaciones de proteína:tripsina durante un tiempo de 11 min a 29°C. Enseguida, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas de PVDF o bien teñidas con plata. (A) Inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de *Arabidopsis thaliana* (Agrisera Antibodies, Suecia). (B) Control de cargado del patrón de digestión de proteínas mostradas en A teñido con plata. Los números colocados en la parte inferior de cada imagen corresponden a la relación proteína:tripsina, mientras que los de la parte izquierda indican la masa molecular en kDa de cada banda (carril de marcadores de peso molecular).

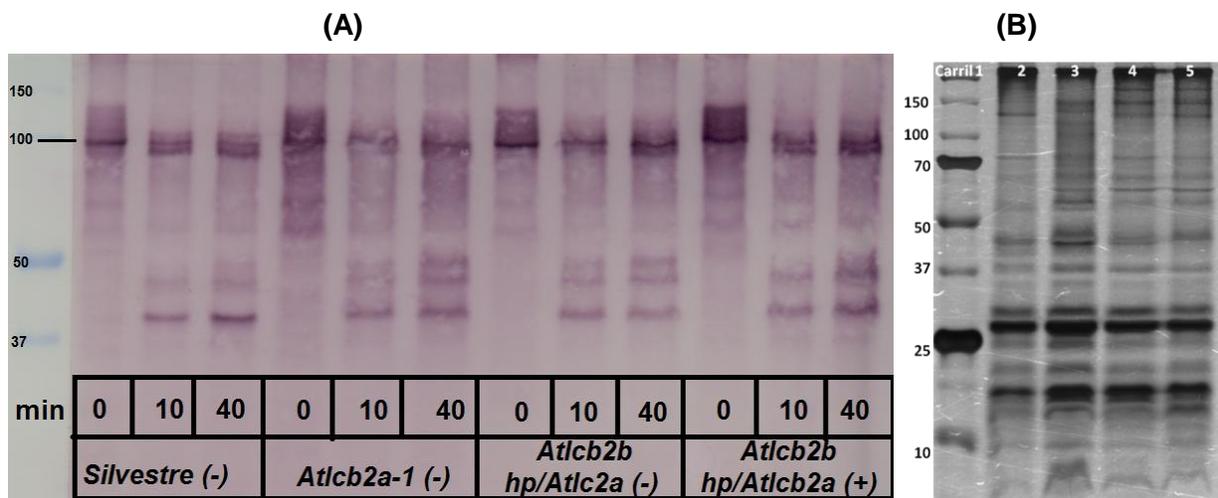
Por otra parte, en las Figuras 16B y 17B, se observan los controles de cargado del patrón de proteólisis de la ATPasa por electroforesis en geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata, con el objetivo de comprobar que se está cargando la misma cantidad de proteína en todos los carriles, mediante la visualización de la intensidad de las bandas. En la Figura 16B se observa que conforme se va aumentando la cantidad de tripsina va disminuyendo proporcionalmente la intensidad de las bandas de cada carril y lo mismo se observa cuando aumentamos el tiempo de exposición de las vesículas de membrana plasmática a la tripsina como se observa en la Figura 17B.



**Figura 17. Determinación de las condiciones óptimas de tiempo y relación proteína:tripsina sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática.** Vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre tratadas con una relación proteína:tripsina 50:1 a los tiempos 0, 10, 20 y 40 min a 29°C. Enseguida, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas de PVDF o bien teñidas con plata. (A) Inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de *Agrisera* en membrana PVDF. (B) Control de cargado del patrón de digestión de proteínas mostradas en A teñido con plata. Los números colocados en la parte inferior de cada imagen corresponden a los tiempos de exposición con tripsina, mientras que los de la parte izquierda indican el peso molecular en KDa de cada banda (marcador de peso molecular).

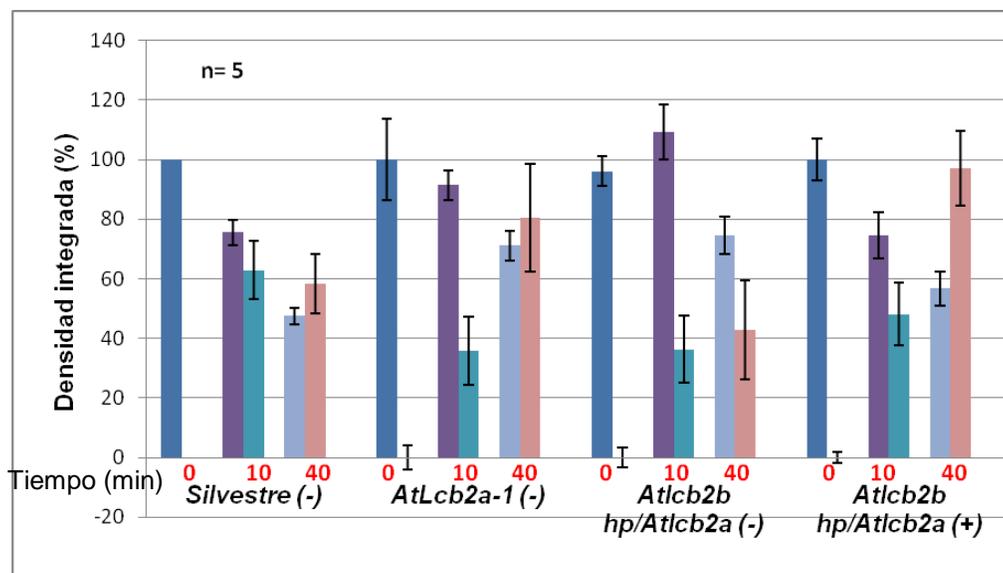
**7. Proteólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción.**

Para ver si el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida se debe a un posible cambio de la interacción de la región del carboxilo terminal con su entorno, quedando más expuesto o no a la proteólisis por tripsina, se realizó la observación del comportamiento del patrón de digestión de las vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción, mediante la inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de *Agrisera* en una membrana de PVDF como se muestra en la Figura 18. Se puede advertir que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con metoxifenoazida, la proteólisis es más lenta con respecto a la línea silvestre, ya que en la línea silvestre al tiempo de 40 min apenas si se alcanza a ver la banda de 100 kDa, correspondiente a una ATPasa íntegra, mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* todavía se logra apreciar bien esa banda. Pero si comparamos la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con la no inducida se observa que a los 40 min en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que fue expuesta a la metoxifenoazida, se observan claramente las dos bandas la 100 y 90 kDa, mientras que en la no expuesta a la metoxifenoazida apenas si se alcanza a ver la 90 kDa. Para confirmar esta apreciación, se realizó la determinación de la densitometría de la banda de 100 y 90 kDa de las inmunoréplicas del patrón de digestión de los diferentes tiempos de proteólisis de cada línea (Figura 19), en donde se observa que la intensidad de la banda de 100 kDa en la línea silvestre disminuye más rápido conforme se aumenta el tiempo de proteólisis, denotándose que al tiempo de 40 min hay menos del 50% de esta banda, posteriormente le sigue la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida y por último las dos líneas control *Atlcb2a-1* y la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, ya que al tiempo de 40 min, estas dos líneas control tienen arriba de un 70% de la banda de 100 kDa. Con respecto a la densitometría de la banda de 90 kDa, hay una correlación con lo anterior, ya que en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir la proteólisis es más lenta que en la línea silvestre y la línea *Atlcb2b hp/atlcb2a* inducida con metoxifenoazida, en donde al tiempo de 40 min solo hay alrededor del 40-60% de la banda de 90 kDa, mientras que en las líneas silvestre y *Atlcb2b hp/atlcb2a* inducida es de 70% y 95% respectivamente.



**Figura 18. Determinación del patrón de proteólisis de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea silvestre, la línea *At1cb2a-1* y de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* con o sin inducción.** Las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron tratadas con tripsina a una relación proteína:tripsina 50:1 a los tiempos 0,10 y 40 min a 29°C. Enseguida, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas de PVDF o bien teñidas con plata. (A) Inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de *Agrisera* en membrana PVDF. (B) Control de cargado del tiempo cero de cada línea *Arabidopsis thaliana* de proteínas mostradas en A teñido con plata, en donde el carril (1) corresponde al marcador de peso molecular, (2) la línea silvestre, (3) la línea *At1cb2a-1*, (4) la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* sin inducir y (5) la *At1cb2b hp/At1cb2a* inducida. Los números colocados en la parte izquierda indican el peso molecular en kDa de cada banda (marcador de peso molecular). Experimento representativo de 6 inmunoréplicas realizadas con 3 preparaciones independientes de cada línea.

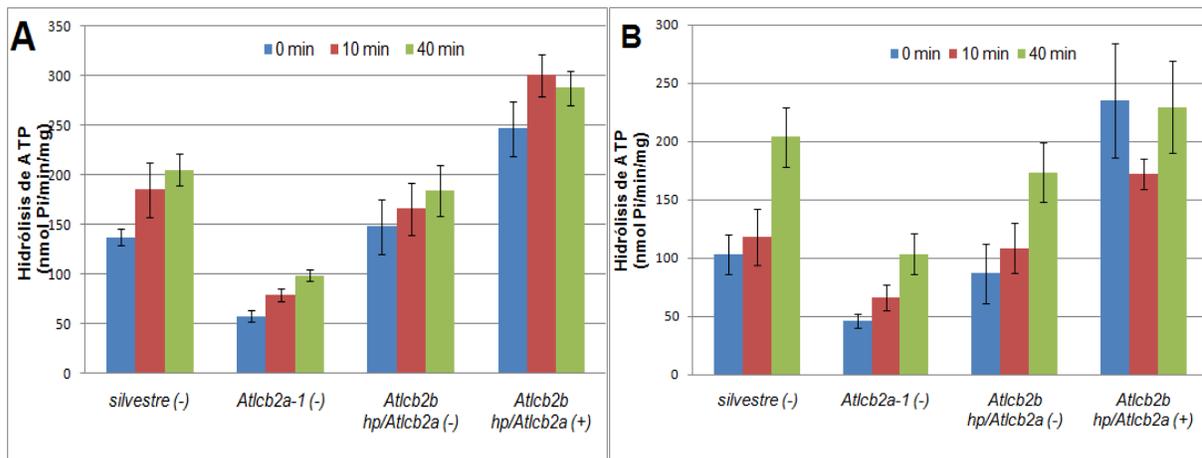
Por otra parte, en la inmunoréplica se observa que en la línea *At1cb2a-1* y en la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* con o sin exposición a la metoxifenoazida, la intensidad de las bandas de su patrón de digestión a los diferentes tiempos es mayor en comparación con la línea silvestre, sugiriendo que se cargó más muestra. De acuerdo a la Figura 18B, solo la línea *At1cb2a-1* (carril 3) parece tener un ligero contenido mayor de proteína, mientras que en la línea silvestre, *At1cb2b hp/At1cb2a* no inducida y la *At1cb2b hp/At1cb2a* inducida con metoxifenoazida se observa una homogeneidad entre ellas.



**Figura 19. Densitometría de la banda de 100 y 90 kDa de los diferentes tiempos de proteólisis de las líneas de *Arabidopsis thaliana*.** Se escanearon las membranas de PVDF de la inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> y mediante el programa *ImageJ* se realizó la determinación de la densidad integrada de la banda 100 y 90 kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad integrada en % ±EE de cada tiempo de proteólisis, obtenidos para cada línea con respecto a su tiempo cero de proteólisis. Los números colocados debajo de cada par de barras corresponde al tiempo de proteólisis, en donde la primera barra de cada tiempo de cada línea corresponde a la banda de 100 kDa y la segunda barra a la banda de 90 kDa. La determinación se obtuvo de 5 inmunoréplicas realizadas.

### 8. Medición de la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática por proteólisis con tripsina.

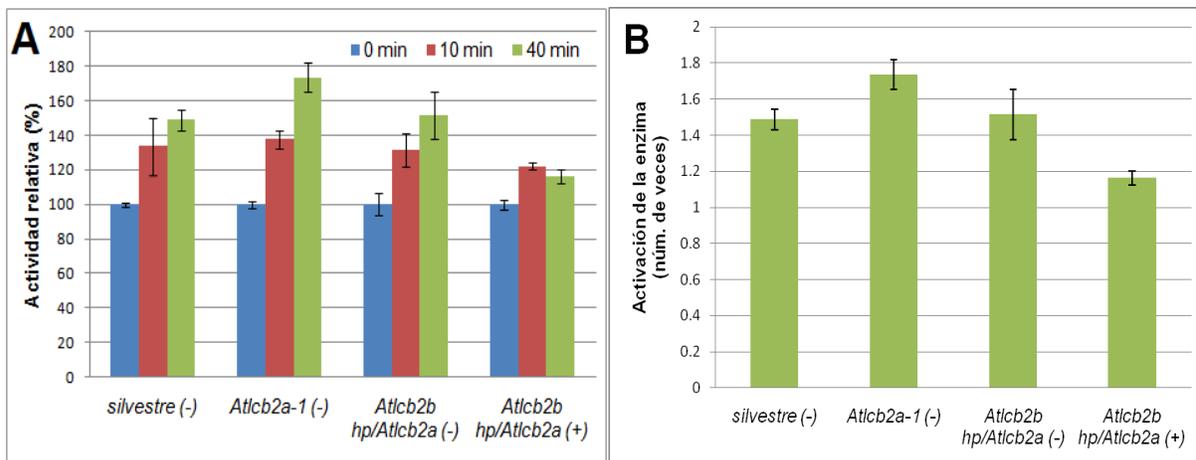
Como se observa en la Figura 18, al hacer la proteólisis controlada de las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*, la región del carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> se va eliminando conforme aumenta el tiempo de exposición a la tripsina obteniéndose una banda de 90 kDa, por lo tanto al ser eliminada esta región autoinhibitoria de la ATPasa de H<sup>+</sup>, la actividad de hidrólisis de ATP se espera que aumente. Por ello, se realizó la medición de la actividad de la hidrólisis de ATP de las vesículas digeridas con tripsina a los diferentes tiempos, de la línea silvestre, la línea mutante *Atlcb2a-1* y la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin exposición a la metoxifenoza. Los valores obtenidos de la actividad medida se representan en la Figura 20.



**Figura 20. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con tripsina a diferentes tiempos.** Se realizó la proteólisis de las vesículas de membrana plasmática con una relación proteína:tripsina 50:1 a los tiempos 0, 10 y 40 min a 29°C. Posteriormente, se les determinó la hidrólisis de ATP. (A) La gráfica muestra los valores promedio de hidrólisis total de ATP de los diferentes tiempos de proteólisis obtenidos para cada línea, expresados como nmol Pi/min/mg  $\pm$ EE. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad específica de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, expresados como nmolPi/min/mg  $\pm$ EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. Se denota con un (+) a las plantas que se asperjaron con la solución de metoxifenoizida y a las que no se asperjaron se denotan con un (-).

Como se observa en la Figura 20A, la actividad de hidrólisis total en la línea silvestre, aumentó de manera proporcional al tiempo de exposición de tripsina, llegando a valores de 200 nmol Pi/min/mg proteína a los 40 min, este mismo comportamiento se observa en la línea *Atlcb2a-1*, en la cual al tiempo cero min de exposición, la actividad total es de 60 nmol Pi/min/mg proteína, mientras que a los 40 min la actividad medida se encuentra alrededor de los 100 nmol Pi/min/mg. Con respecto a las líneas *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción con la metoxifenoizida, no se observa un cambio significativo en la actividad de hidrólisis total a los diferentes tiempos de proteólisis. En la Figura 20B se representa la actividad de hidrólisis de ATP específica de la ATPasa de H<sup>+</sup>, en donde se observa que en la línea silvestre, la actividad medida a los 40 min es mayor con respecto a los tiempos 0 y 10 min de exposición a la tripsina, llegando a valores de 200 nmol Pi/min/mg de proteína, mientras que a los tiempos 0 y 10 min de proteólisis, la actividad medida es de alrededor de 100 nmol Pi/min/mg. Este mismo comportamiento se observa en las líneas control *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, en las cuales la actividad a tiempos menores a 10 min de proteólisis, es de alrededor de 66 y 110 nmol Pi/min/mg respectivamente, mientras que a los 40 min la actividad es de 105 y 170 nmol Pi/min/mg respectivamente. En el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con la metoxifenoizida, no hay un cambio significativo en la

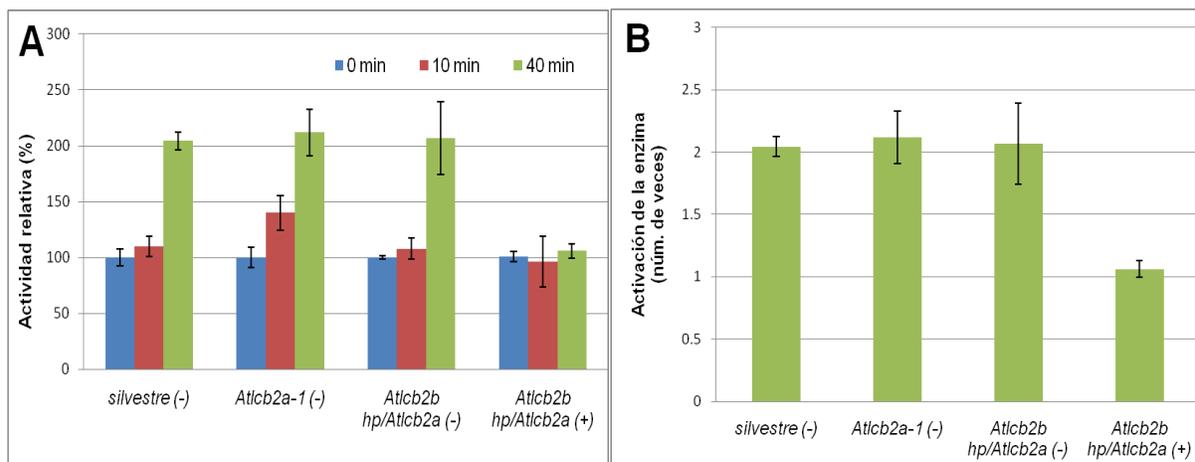
actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de los diferentes tiempos de proteólisis, pero cabe resaltar que su actividad sigue siendo mayor con respecto a los tiempos 0 y 10 min de proteólisis de la línea silvestre y las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, mientras que a los 40 min de proteólisis tanto de la línea silvestre como de la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, la actividad específica es muy similar, llegando a valores de 200 nmol Pi/min/mg como los obtenidos a los diferentes tiempos de proteólisis de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida.



**Figura 21. Comparación de la actividad total de ATPasa de los diferentes tiempos de proteólisis en las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducir, con respecto al tiempo cero de proteólisis.** (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad relativa en %  $\pm$ EE de cada tiempo de proteólisis, obtenidos para cada línea con respecto a su tiempo cero de proteólisis, basado en los datos de la Figura 19A. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces  $\pm$ EE al tiempo de 40 min de proteólisis, obtenidos para cada línea con respecto al tiempo cero de cada una de ellas, basado en los datos de la Figura 19A.

Para poder visualizar el efecto de los diferentes tiempos de proteólisis en la actividad de hidrólisis de ATP en cada una de las líneas, se comparó la actividad medida a los diferentes tiempos de proteólisis con respecto a su tiempo cero respectivo, como se muestra en la Figura 21 y Figura 22. Como podemos observar en la Figura 21A, el aumento de la actividad de hidrólisis total de ATP en el tiempo de 10 min de proteólisis, es de un 35 % aproximadamente con respecto al tiempo cero de cada una de ellas en la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con metoxifenoizida, hay un pequeño aumento de la actividad de alrededor del 20%. En el caso de la actividad de hidrólisis total a los 40 min de proteólisis, se observa que hay un aumento de un 50% en la línea silvestre y en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir con respecto al tiempo cero de proteólisis, en la línea control *Atlcb2a-1* el aumento es de un 70%, mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a

la metoxifenoazida, el aumento máximo es de 20%. Por lo tanto, la activación de la enzima en número de veces tanto en la silvestre como en la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir es 1.5 veces, mientras que en la *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida por la metoxifenoazida, es de 1.7 y 1.2 veces respectivamente como se muestra en la Figura 21B.



**Figura 22. Comparación de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de los diferentes tiempos de proteólisis en las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducir, con respecto al tiempo cero de proteólisis.** (A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad relativa en % ±EE de cada tiempo de proteólisis, obtenidos para cada línea con respecto a su tiempo cero de proteólisis, basado en los datos de la Figura 19B. (B) La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces ±EE al tiempo de 40 min de proteólisis, obtenidos para cada línea con respecto al tiempo cero de cada una de ellas, basado en los datos de la Figura 19B.

Con respecto a la comparación de la actividad de hidrólisis de ATP específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de los diferentes tiempos de proteólisis, solo a los 40 min la actividad específica de hidrólisis de ATP hay un aumento notable, llegando a un 100% (Figura 22A) o bien, expresado de otra manera, se activa 2 veces (Figura 22B), tanto en la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, con respecto a sus tiempos cero respectivos. Comparativamente, en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida no hay un aumento o activación de la enzima en los diferentes tiempos de proteólisis con respecto a su tiempo cero de proteólisis como se muestra en la Figura 22.

---

## DISCUSIÓN

La ATPasa de H<sup>+</sup> es la proteína más importante de la membrana plasmática en las plantas, por lo que es muy abundante y se sintetiza de manera constitutiva para satisfacer los requerimientos de la célula, ya que como se mencionado anteriormente, está involucrada en muchos aspectos de la fisiología de las plantas y por lo tanto es una enzima que está sujeta a muchas formas de regulación, entre las que se hallan mecanismos transcripcionales y traduccionales, post-traduccionales (fosforilación-desfosforilación), interacción con proteínas específicas, con toxinas de patógenos y con lípidos membranales. En la regulación de la enzima por interacción con lípidos membranales sólo se han hecho estudios de componentes lipídicos de la membrana utilizando glicerolípidos y esteroides [Sandstrom y col., 1987; Brauer y Tu, 1989; Cooke y col., 1994; Gomes y col., 1996; Grandmougin-Ferjani y col., 1997] pero no se tienen reportes sobre la posible regulación de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas por esfingolípidos, que es otro de los componentes lipídicos de la membrana de plantas. Se ha encontrado recientemente a los esfingolípidos también como elementos clave en las cascadas de traducción de señales que regulan procesos importantes de la fisiología celular como crecimiento, diferenciación y muerte celular [Chen y col., 2006; Dietrich y col., 2008; Pata y col., 2010; Saucedo-García y col., 2011)].

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo estudios modificando la cantidad o la calidad de esfingolípidos en la membrana plasmática y luego se ha estudiado su efecto en diferentes funciones membranales, incluyendo la actividad de enzimas como la ATPasa de H<sup>+</sup>. Para ello se han utilizado enfoques bioquímicos en plantas genéticamente modificadas, como la línea mutante silenciada de *Arabidopsis thaliana Atlcb2b hp/Atlcb2a* que tiene un contenido 34% menor de esfingolípidos totales al ser expuesta al inductor metoxifenozida. En esta se encontró que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> es mayor que la actividad de la enzima de las plantas controles [Vázquez Vázquez, 2009; Mejía Hernández, 2010]. Las características cinéticas de la actividad de la enzima en la línea *Atlcb2b hp/ Atlcb2a* han revelado que la enzima de plantas con menor contenido de esfingolípidos tiene una  $V_{max}$  mayor que la de la enzima control [González Reyes, 2010]. Sin embargo, no se sabe cuál es el posible mecanismo por el cual la actividad está aumentada en la línea con menor contenido de esfingolípidos. Por ello, en este trabajo se estudia la contribución que tiene la región del carboxilo terminal en la actividad aumentada de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas con menor contenido de esfingolípidos, ya que esta región del

carboxilo terminal es una de las regiones de la estructura terciaria de la enzima que parece tener más importancia en la regulación de su actividad, ejerciendo un efecto autoinhibitorio sobre la catálisis de la enzima [Palmgren y col., 1990 y 1991; Olsson y col., 1995; Axelsen y col., 1999]. Para ello se utilizaron preparaciones purificadas de membrana plasmática que fueron obtenidas de hojas de plantas adultas mutantes silenciadas de *Arabidopsis thaliana*.

### **1. Efectos fenotípicos del silenciamiento de la subunidad LCB2b en plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.**

Para poder explorar la contribución de la región del carboxilo terminal en la actividad aumentada de la ATPasa de H<sup>+</sup> observada en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, fue necesario incluir en el presente estudio como controles a la línea silvestre (progenitora de la línea *Atlcb2a-1*), la línea mutante *Atlcb2a-1* (progenitora de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) y la misma línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición a la metoxifenoza. De esta manera se podía corroborar que el silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT ocurría únicamente en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en presencia del inductor metoxifenoza. No se incluyó en el estudio a las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* tratadas con metoxifenoza porque en trabajos anteriores [González Reyes, 2010; Mejía Hernández, 2010] se había determinado que no había un efecto ni a nivel fenotípico ni en la actividad de ATPasa al tratarse las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* con el inductor metoxifenoza.

Una de las formas más sencillas de estimar el silenciamiento génico era a través del análisis fenotípico de las plantas expuestas a metoxifenoza y así asegurarse que hubo una disminución en el contenido de los niveles de esfingolípidos complejos como resultado del silenciamiento génico inducido por la metoxifenoza, observándose clorosis en las hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* al ser expuesta con el inductor metoxifenoza. Este efecto de clorosis es parte del proceso de la muerte del tejido vegetal por disminución de los esfingolípidos complejos endógenos de la planta, ya que al inducir el silenciamiento génico en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, ya no se expresa la actividad de la primera enzima de la síntesis de esfingolípidos (SPT), gracias a la mutación de inserción en el gene de la subunidad LCB2a y al silenciamiento génico de la subunidad LCB2b, con lo que las dos formas posibles de la enzima quedan anuladas progresivamente (la SPT es una enzima formada por los heterodímeros LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b). En consecuencia, ya no se cataliza la condensación de la serina con la palmitoil-CoA para generar cetoesfingina, el precursor de esfingina, una de las bases de cadena larga constitutivas de los

esfingolípidos complejos, y con ello, hay una disminución de los esfingolípidos complejos endógenos [Dietrich y col., 2008]. De ahí, que la clorosis sea uno de los indicadores de la eficiencia del inductor para la síntesis de la horquilla de ARN que es la responsable de silenciar la expresión del gene que codifica para la síntesis de la proteína LCB2b en la línea mutante de interés *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

Los registros fenotípicos mostrados en las Figuras 6A y 6B permitieron corroborar los efectos del inductor observados en trabajos anteriores en el laboratorio, tanto en plantas adultas como en estadios jóvenes [Vázquez Vázquez, 2009, Mejía Hernández, 2010] y lo descrito en el trabajo de Dietrich y col. (2008), en donde la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* presentó clorosis al día 5 posterior a la exposición con metoxifenoazida 1:10000. Adicionalmente, el hecho de que tanto la línea silvestre como la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* no expuesta al inductor no presentaran indicios de daño o muerte celular, implica que el fenotipo observado en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor no se debe a la edad de la planta (envejecimiento) o a un efecto tóxico general e inespecífico del inductor no relacionado con el silenciamiento.

Por ello, se decidió que las plantas de la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducidas con metoxifenoazida en estas condiciones, se utilizarían para la obtención de las vesículas de membrana plasmática para su posterior medición de actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, y así asegurarse de los efectos de la inducción del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT. Como se mencionó anteriormente, las plantas con un contenido 34% menor de esfingolípidos complejos, tienen una actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> mayor que la actividad de la enzima de las plantas con un contenido de esfingolípidos normales. Se tuvo cuidado de alcanzar el mismo grado de silenciamiento en los lotes de plantas que fueron crecidas a diferentes tiempos para poder alcanzar los mismos niveles disminuidos de esfingolípidos (Figura 6B).

## **2. Actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática de líneas de *Arabidopsis thaliana* con diferente contenido de esfingolípidos.**

En las vesículas obtenidas se esperaba tener una actividad mayor en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con respecto a las líneas control (Silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir), como lo visto anteriormente en el laboratorio, para poder en estas condiciones, investigar si la región del carboxilo terminal estaba involucrada en esta activación. Las actividades de hidrólisis total de ATP en nuestras preparaciones estuvieron

en un intervalo de 129 a 153 nmol Pi/min/mg en las 3 líneas control analizadas, y en la línea con menor contenido de esfingolípidos la actividad fue de 249 nmol Pi/min/mg, mientras que las actividades específicas de ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática estuvieron en un intervalo de 75 a 119 nmol Pi/min/mg en las líneas controles (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir) y en la línea con menor contenido de esfingolípidos la actividad fue de 209 nmol Pi/min/mg (Figura 8). La diferencia entre los valores de actividad de la hidrólisis total y la hidrólisis específica de la ATPasa de cada línea es mínima, indicándonos que nuestras vesículas de membrana plasmática tienen un buen grado de pureza, ya que al tener valores muy cercanos, la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática se encuentra de manera mayoritaria en nuestras preparaciones. Al comparar estos valores de actividad de ATPasa con los obtenidos en trabajos anteriores en el laboratorio, los valores están muy cercanos, encontrándose valores entre 120 a 170 nmol Pi/min/mg en líneas con esfingolípidos normales y en el caso de la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida fue de 253 nmol Pi/min/mg [González Reyes, 2010]. En el caso con lo reportado en otras especies, también están cercanos a los reportados, pues encontramos que en centeno se han reportado valores de actividad de 108 nmol Pi/min/mg [Kasai y col., 2000], en hojas de maíz se obtuvieron valores de 203 nmol Pi/min/mg [Perlin y Spanswick, 1981], mientras que en levaduras se han reportado valores de 540 nmol Pi/min/mg [Dambly y Boutry, 2001]. Cabe mencionar que estos valores pueden ser influenciados por las condiciones de medición de la reacción de hidrólisis de ATP, por ejemplo la concentración de ATP, el pH y la temperatura [Bennett y col., 1985].

### **3. Papel de la región del carboxilo terminal en la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de una línea con menor contenido de esfingolípidos**

Mediante el uso de anticuerpos específicos y péptidos sintéticos se ha obtenido evidencia de que en la región del carboxilo terminal, 100 residuos del extremo, se encuentra una región de auto-inhibición (Dominio R) [Palmgren y col., 1990 y 1991]. Mediante mutagénesis dirigida y estudios bioquímicos se ha demostrado que este dominio puede ser funcionalmente dividido en dos regiones (RI y RII) que interactúan con los dominios citoplasmáticos esenciales para el ciclo catalítico [Olsson y col., 1995; Axelsen y col., 1999]. Diferentes estudios sugieren un modelo en el cual el carboxilo terminal interactúa, directamente o indirectamente, con la región transmembranal y el dominio de unión del ATP (Dominio N) para inhibir la actividad de la enzima (Figura 23). Interacciones de la región del carboxilo

terminal con la región transmembranal limitarían el acceso de protones a su sitio de transporte o el transporte mismo, y las interacciones con el dominio N limitarían el acceso al ATP o incluso la liberación de los productos de la reacción. Se ha sugerido que la activación de la enzima por un activador podría deberse a un cambio de conformación más activa debido a una modificación del C-terminal, lo que liberaría las interacciones inhibitorias, permitiendo la unión del ATP y la apropiada movilidad de los sitios de transporte de protones [Palmgren y col., 1991; Portillo y col., 1991; Eraso y col., 1994].

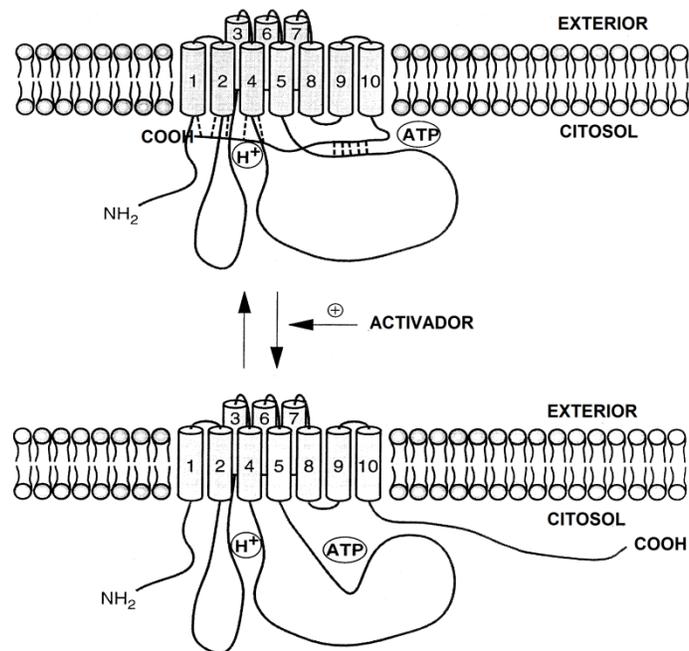


Figura 23. Modelo de activación de la ATPasa de  $H^+$  de membrana plasmática de plantas y levaduras. En la parte superior se ilustra el estado de baja actividad. El activador podría provocar una modificación del C-terminal, liberando la interacción inhibitoria y provocando que la ATPasa adopte una conformación más activa (inferior) (modificada de Portillo F., 2000).

La lisofosfatidilcolina (LPC) es un ejemplo de un activador de la ATPasa de  $H^+$  de membrana plasmática, se ha reportado que es una molécula que está involucrada en el control de la catálisis de la enzima a través de un mecanismo que involucra el extremo carboxilo del a ATPasa. Por ello se estudió la activación de la ATPasa por lisofosfatidilcolina (LPC), para determinar la regulación de la ATPasa de  $H^+$  por su región carboxilo terminal en la enzima de la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Las condiciones óptimas de 100  $\mu M$  de LPC sin preincubación encontradas experimentalmente y que fueron utilizadas para este estudio sobre el efecto de LPC en la actividad de hidrólisis de ATP en las diferentes líneas de *Arabidopsis*, nos permitieron determinar el efecto que tiene la

LPC en la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea con menor contenido de esfingolípidos comparada con sus líneas control antes mencionadas. Al comparar estas condiciones con las reportadas en la literatura, la concentración de LPC que usamos es muy razonable, ya que se ha descrito que la activación máxima es alcanzada a partir de 60 µg/ml de LPC (que equivale a 118.8 µM) y que se mantiene aún a concentraciones mayores, como lo visto en la Figura 12A. Con respecto al tiempo de preincubación, estudios con LPC han realizado preincubaciones solo de 4 a 5 min, que es un tiempo muy corto [Cocucci y Marré, 1984; Palmgren y col., 1990; Johansson y col., 1994; Olsson y col., 1995]. En nuestro caso no hubo preincubación, ya que se encontró que conforme aumentamos el tiempo de preincubación la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> se inhibía, lo cual posiblemente se deba a las condiciones experimentales, ya que se ha reportado que el efecto de LPC depende del pH del medio de reacción, la concentración de LPC y de la proteína de membrana plasmática [De Michelis y col., 1997].

Como se ha mencionado con anterioridad, se utilizaron vesículas de membrana plasmática de hojas de las diferentes líneas de *Arabidopsis*, en la cual al medir la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de 100 µM de LPC en el medio de reacción sin preincubación, se encontró tanto en las líneas controles (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir) como en la línea con menor contenido de esfingolípidos (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a la metoxifenoazida), que no hay un aumento significativo de la actividad de hidrólisis total de ATP con respecto a la actividad de hidrólisis de ATP sin LPC en el medio de reacción de cada una de ellas (Figura 13 A), esto posiblemente se debe a la presencia de diferentes enzimas que utilizan ATP como sustrato y que pueden estar presentes en pequeñas cantidades en nuestras vesículas de membrana plasmática, ya que para obtener la actividad de hidrólisis de ATP solo de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática, se midió la actividad en presencia de los inhibidores nitrato, azida y molibdato, que son inhibidores selectivos de ATPasa de tonoplasto, ATPasa mitocondrial y fosfatasa respectivamente. Se observó que en las líneas control (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a* sin inducir) en presencia de LPC hubo un aumento en la actividad del 45% o sea una activación de 1.45 veces con respecto a la actividad sin LPC de cada línea, mientras que en la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida, la actividad medida con o sin LPC no cambia (Figura 15). Por lo tanto al no haber un aumento en la actividad de hidrólisis de ATP por LPC en la línea con menor contenido de esfingolípidos, se sugiere que la región del carboxilo terminal está involucrada, ya que posiblemente al

disminuir la cantidad de esfingolípidos hay un cambio de conformación de la enzima en la cual hay un desplazamiento de la región del carboxilo terminal. Se ha reportado que las LPCs de cadena larga estimulan la actividad de la ATPasa H<sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática con un alto grado de especificidad, y que la sustitución de la larga cadena acílica (más de 14 carbonos) por una cadena de 10 a 12 carbonos da como resultado la pérdida total de la capacidad de activación. Adicionalmente, la alteración de la parte glicerolfosfolina del zwitterión por el grupo no iónico polioxietileno resulta en una total pérdida de la capacidad de activación. En consecuencia ambas evidencias indican que las interacciones hidrofóbicas y polares son importantes para la activación por LPC [Palmgren y col., 1990; Gomés y col., 1996]. En concordancia con lo anterior, en las vesículas de membrana plasmática de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir de *Arabidopsis thaliana* que tiene 100% de esfingolípidos totales, la LPC modificó las interacciones hidrofóbicas y polares lípido-proteína, ocasionando un cambio de conformación de la enzima alterando las interacciones inhibitorias de la región del carboxilo terminal y en consecuencia hay aumento de la actividad de hidrólisis de ATP. Mientras que la línea mutante silenciada de *Arabidopsis thaliana Atlcb2b hp/Atlcb2a* que tiene un contenido 34% menor de esfingolípidos totales al ser expuesta al inductor metoxifenoza, ya no presenta un aumento en la actividad por LPC, por que posiblemente estas interacciones inhibitorias de la región del carboxilo terminal ya están modificadas y por ello su actividad es mayor que la línea silvestre y controles, con o sin LPC. Es sugerente el hecho de que los esfingolípidos complejos contienen ácidos grasos de cadena larga o muy larga (Chen y col. 2009), ya que podrían estar asegurando la activación de la enzima. Por lo tanto el posible cambio de conformación de la enzima por disminución de esfingolípidos se podría explicar por una alteración de las interacciones hidrofílicas o hidrofóbicas o ambas, que se producen directa o indirectamente entre los esfingolípidos y la enzima, ocasionando un desplazamiento de la región del carboxilo terminal.

Como una estrategia adicional, se realizó la remoción de esta región del carboxilo terminal por proteólisis con tripsina, para ver si el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida se debía a un posible cambio de la interacción de la región del carboxilo terminal con su entorno, quedando más expuesto o no a la proteólisis por tripsina. Mediante inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de *Agrisera* en membrana PVDF se observó el comportamiento del patrón de digestión de las vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*

con o sin inducción (Figura 18A). Se pudo advertir que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida, la proteólisis es más rápida con respecto a sus líneas control inmediatas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, mientras que al compararla con la línea silvestre, la proteólisis es más lenta en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida. Esta diferencia del patrón de digestión entre la línea silvestre y las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir fue inesperada, ya que de acuerdo a lo reportado en la literatura, para las tres líneas: silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, la cantidad de esfingolípidos endógenos no cambia [Chen y col., 2006; Dietrich y col., 2008]. La única diferencia entre la línea silvestre y las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, es que las dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir) solo pueden tener la versión del heterodímero LCB1/LCB2b de la SPT, mientras que la línea silvestre tiene ambas versiones LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b. Estudios realizados en microsomas obtenidos de levaduras que sólo podían expresar el heterodímero LCB1/LCB2a comparados con otras que sólo podían expresar el heterodímero LCB1/LCB2b presentaron prácticamente la misma actividad de la SPT, concluyendo que los dos polipéptidos LCB2 son catalíticamente redundantes en el complejo del heterodímero de la SPT [Dietrich y col., 2008]. Respecto a lo anterior, la diferencia en el patrón de digestión por tripsina a los diferentes tiempos, entre las vesículas de la línea silvestre y las dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir) resultó ser interesante, sugiriendo que las dos subunidades LCB2 no son estrictamente redundantes, pues al carecer las líneas control de la subunidad LCB2a de la SPT y ser ésta la única diferencia con su línea progenitora (la línea silvestre), se podría sugerir que aunque las funciones básicas de las subunidades LCB2a y LCB2b son iguales, hay ciertos procesos más finos en los que cada una interviene de manera especializada y que son los que probablemente determinen diferencias en determinados esfingolípidos específicos ocasionando una conformación diferente, por ello sería importante determinar el contenido y composición de los esfingolípidos complejos de nuestras vesículas de membrana plasmática de las líneas de *Arabidopsis thaliana* que fueron utilizadas en este trabajo y así dilucidar las diferencias mínimas en la cantidad de esfingolípidos específicos que podrían tener un papel importante en la interacción con la ATPasa. La funcionalidad no redundante de las subunidades LCB2a y LCB2b de la SPT se ha puesto también de manifiesto recientemente en el caso de la síntesis de bases esfingoideas señalizadoras del proceso de muerte celular programada en *Arabidopsis* (Saucedo-García y col., 2011).

Otra posibilidad que podría explicar esta diferencia encontrada entre la línea silvestre y las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir en el patrón de digestión, es que

se tratara de dos isoformas diferentes de la enzima [Michelet y Boutry, 1995], ya que si bien la inmunodetección puede demostrar la presencia de la ATPasa de H<sup>+</sup>, no distingue entre las diferentes isoenzimas, pues el anticuerpo reconoce a todas las isoformas (*Agrisera Antibodies*). Sin embargo parece remoto que una diferencia en la expresión de las subunidades de la SPT incida en el tipo de isoforma de ATPasa que se exprese. Se puede elucubrar al respecto que el tipo de esfingolípidos que se sintetiza por una forma especial de SPT puede definir el tipo de isoforma que se inserta en la membrana. Al respecto, algunos estudios en levaduras indican que este puede ser el caso [Gaigg y col, 2006]

El estudio de los parámetros cinéticos de la actividad aumentada de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas con menor contenido de esfingolípidos ha revelado diferencias muy ligeras en la  $K_m$  entre las línea silvestre y las líneas controles *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, en donde la  $K_m$  es mayor en la línea silvestre que las líneas control como se muestra en la Tabla 2 [González Reyes, 2010]. Estudios de las propiedades funcionales de las tres isoformas principales de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (AHA1, AHA2 y AHA3) han revelado que las isoformas AHA1 y AHA2 tienen una  $K_m$  relativamente menor (0.15 mM), mientras que la AHA3 exhibe una  $K_m$  mayor (1.5 mM) y con respecto a la  $V_{max}$  (μmol de Pi/mg de proteína/min) la AHA1 =1.25; AHA2 = 2.45 y AHA3 = 1.50. Además, estudios con LPC en estas tres isoformas han demostrado que hay una estimulación similar entre la AHA1 y AHA3 (AHA1 = 60%; AHA2 =160%; AHA3 =50%) [Palmgren y Christensen, 1994]. Lo anterior, sugiere que posiblemente en nuestras plantas de las líneas mutantes sí se trate de dos isoformas diferentes y más aún, de que posiblemente sea la isoforma AHA3 para la línea silvestre y la AHA1 para las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, ya que como hemos visto en el presente trabajo, no se encontraron diferencias significativas en el efecto de LPC y la  $V_{max}$  (Figura 15 y Tabla 2) tanto en la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir. Por ello sería importante realizar un análisis de expresión de genes para poder confirmar esta posibilidad.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas [González Reyes, 2010].

		Silvestre	<i>Atlcb2a-1</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (0dpi)	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (7dpi)
<b>Michaelis-Menten</b>	$K_m$ (mM)	2.06 ± 0.26	1.07 ± 0.05	1.29 ± 0.11	1.23 ± 0.1
	$V_{max}$ (nmol Pimin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	168.5 ± 7.7	130.1 ± 1.8	223.2 ± 6.0	315.9 ± 9.2
<b><math>n</math> (Hill)</b>		0.88 ± 0.15	1.05 ± 0.70	1.14 ± 0.11	1.03 ± 0.12

Por otra parte, la densitometría de las bandas de 100 y 90 kDa de las inmunorélicas del patrón de digestión de los diferentes tiempos de proteólisis de cada línea (Figura 19), se obtuvo otro dato que parece ser importante, que es con respecto a la densitometría de la banda de 90 kDa al tiempo de 40 min de las diferentes líneas de *Arabidopsis* utilizadas, se observó que en la línea *Atlcb2b hp/atlcb2a* inducida, prácticamente la banda de 90 kDa es 95%, es decir la mayoría de las ATPasa de H<sup>+</sup> de nuestras vesículas de membrana plasmática no tiene la región del carboxilo terminal, mientras que en la línea silvestre y las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir hay alrededor del 40-75% de la banda de 90 kDa. Esto nos sugiere que el carboxilo terminal está más expuesto o es más estable a la proteólisis en la línea con menor contenido de esfingolípidos que en sus líneas control, apoyando la posibilidad de que el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida se debe a un posible cambio de la interacción de la región del carboxilo terminal con su entorno.

Como se observó en la Figura 18A, al hacer la proteólisis controlada de las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*, la región del carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> se va eliminando conforme aumenta el tiempo de exposición a la tripsina obteniéndose una banda de 90 kDa, que correlaciona con lo descrito en la literatura [Palmgren y col., 1990a; Desbrosses y col., 1998; Piette y col., 2001]. Por lo tanto se esperaba que al ser eliminada la región autoinhibitoria de la ATPasa de H<sup>+</sup>, la actividad de hidrólisis de ATP aumentara. Al realizar la medición de la actividad de la

hidrólisis de ATP de las vesículas digeridas con tripsina a los diferentes tiempos (0, 10 y 40 min), de la línea silvestre, la línea mutante *Atlcb2a-1* y la línea mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin exposición a la metoxifenoazida, se observó que hay un aumento notable de alrededor del 50% a los 40 min de proteólisis en la actividad de hidrólisis total con respecto al tiempo cero, tanto en la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, mientras que al determinar la actividad de hidrólisis de ATP específica de ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática utilizando inhibidores específicos de las posibles enzimas que utilizan ATP como sustrato (fosfatasas, ATPasa de tonoplasto y mitocondrial), se logró observar a los 40 min un aumento en la actividad, llegando a un 100% (Figura 22A) o bien una activación de 2 veces (Figura 22B), tanto en la línea silvestre como en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, con respecto a sus tiempos cero respectivos. Estas diferencias entre la actividad de hidrólisis total y la específica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática posiblemente se debe a un enmascaramiento por la presencia de diferentes enzimas que utilizan ATP como sustrato y que pueden estar presentes en pequeñas cantidades en nuestras vesículas de membrana plasmática como lo visto en los experimentos con LPC. Con respecto a la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con metoxifenoazida no hubo un aumento o activación de la enzima en los diferentes tiempos de proteólisis con respecto a su tiempo cero de proteólisis. Este comportamiento de la actividad después de la proteólisis de las diferentes líneas de *Arabidopsis* utilizadas es consistente con los resultados con LPC, por lo tanto la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de plantas con menor contenido de esfingolípidos está relacionada estrechamente con la región del carboxilo terminal.

En la Figura 24 se presenta un modelo que trata de describir e interpretar los resultados obtenidos en esta tesis. En él se propone que los esfingolípidos membranales están en contacto directo o indirecto con la ATPasa de H<sup>+</sup> y que esta interacción tiene influencia en la conformación de la enzima, de tal manera que cuando hay niveles de esfingolípidos normales (100%) la enzima se mantiene en un estado de actividad “moderada”, y cuando el contenido de los esfingolípidos endógenos disminuye a un 60%, la enzima toma una conformación más activa. En esta, está involucrado un cambio en la interacción del dominio auto-inhibitorio de la región del carboxilo terminal con el sitio catalítico y el dominio transmembranal ocasionando su desplazamiento. En este contexto, los esfingolípidos podrían estar siendo fundamentales en la expresión del poder catalítico de la enzima, constituyendo factores importantes en su regulación. Este modelo apoyaría los recientes estudios que ubican a la ATPasa de H<sup>+</sup> en microdominios membranales

enriquecidos en esfingolípidos y esterol, sugiriendo que una de las razones por la que esta enzima migra de la membrana a estos microdominios es para controlar su nivel de actividad catalítica. De cualquier forma, el hecho de que los esfingolípidos membranales estuvieran promoviendo un rígido control sobre la actividad de la enzima, les da mucho valor en términos fisiológicos.

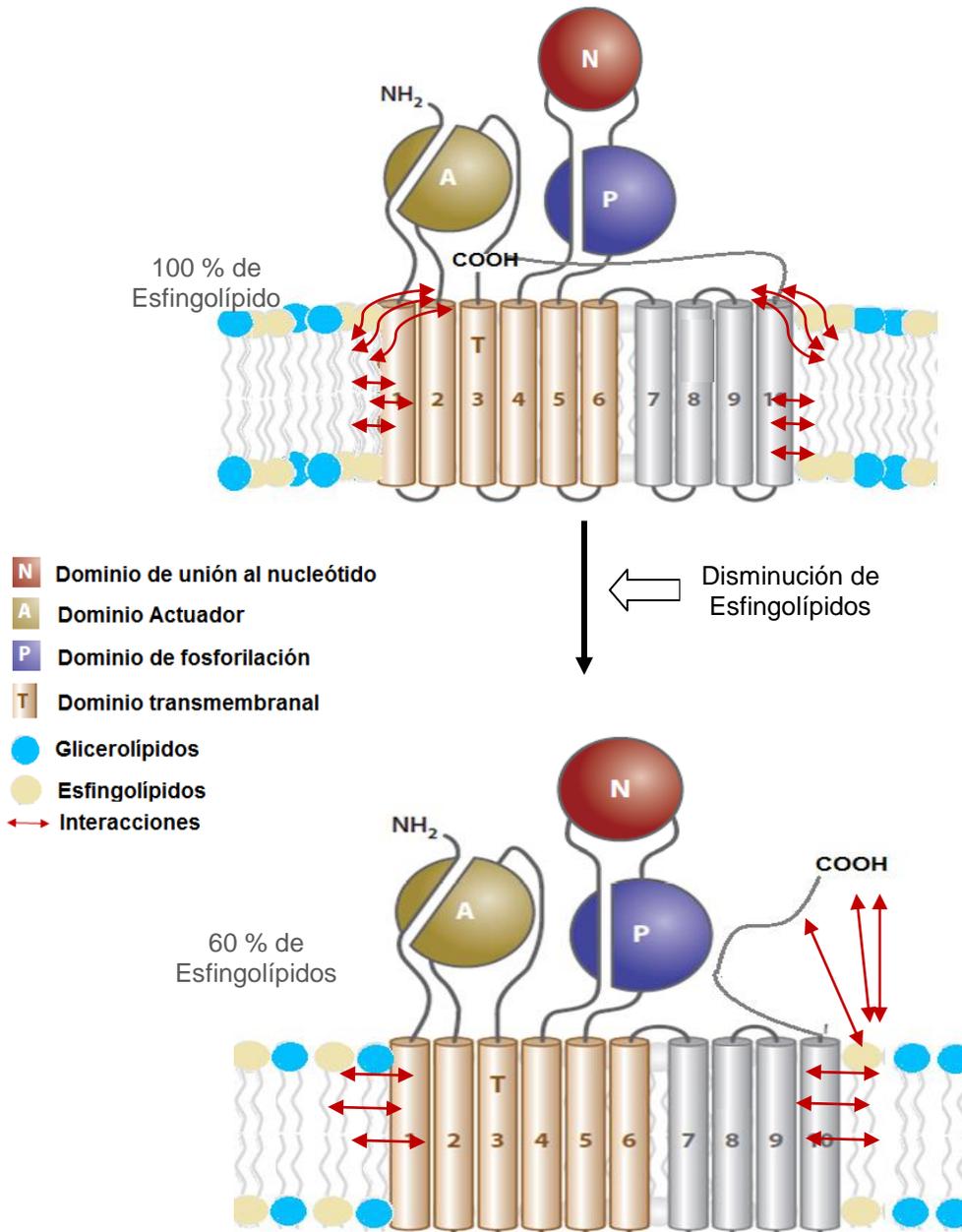


Figura 24. Modelo propuesto del efecto de los esfingolípidos sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en *Arabidopsis thaliana*, en la cual está involucrada la región del carboxilo terminal en la activación de la enzima por disminución de esfingolípidos (Modificado Palmgren MG y Nissen P, 2011).

### CONCLUSIONES

La actividad catalítica de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, no es afectada por la lisofosfatidilcolina ni por la remoción de la región del carboxilo terminal por tripsina. Estos resultados indican que la alta actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea de *Arabidopsis thaliana* con menor contenido de esfingolípidos se debe a cambios en la interacción de la región del carboxilo terminal con la enzima, y estos cambios son propiciados por la disminución de esfingolípidos membranales.

De lo anterior se deduce por tanto, que los esfingolípidos de la membrana plasmática están involucrados en el control de la actividad catalítica de la enzima y que esta regulación implica la región del carboxilo terminal de la proteína.

### PERSPECTIVAS

Determinar el contenido y composición de los esfingolípidos complejos de nuestras vesículas de membrana plasmática de las líneas de *Arabidopsis thaliana*: silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con y sin exposición al inductor para determinar qué esfingolípidos se modificaron y provocaron el cambio de actividad para así conocer que esfingolípidos específicos tienen un papel importante en la interacción con la ATPasa.

Realizar un análisis de expresión de genes de las plantas adultas de las líneas *Arabidopsis thaliana*: silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con y sin exposición al inductor para poder saber si hay una expresión diferencial de isoformas al mutar o silenciar las subunidades de la LCB2 de la SPT.

Determinar la interacción esfingolípidos-proteína mediante diversos estudios que incluyan el uso de modificadores químicos de unión covalente [Habenr kant y van Meer, 2009] para poder determinar que tipo de interacciones (hidrofóbicas o polares) están involucradas en la regulación por la región del carboxilo terminal.

APÉNDICE

- A. Disolución amortiguadora de transferencia para Réplica en Western.
- a) 15 ml de una solución 1 M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 (se prepara tomando ml de 1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y mL de 1M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
  - b) 200 mL de metanol reactivo analítico
  - c) 2.5 mL de una solución 20% de SDS
- Aforar todo lo anterior a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada
- B. Disolución amortiguadora con Tris-solución salina (TBS)
- a) 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 (pesar 2.4g y aforar a 1 L)
  - b) 0.5 M de NaCl (29.2g / L)
- C. Disolución amortiguadora TBS con Tween 20 (TTBS)
- a) TBS .....995 mL.
  - b) Tween 20 al 20% v/v..... 5 mL.

Tabla 3. Condiciones para las incubaciones y revelado de las réplicas en Western de la ATPasa de  $\text{H}^+$  isoforma 3 de *Arabidopsis thaliana*

Tipo de anticuerpo utilizado	Solución bloqueadora	Anticuerpo y condiciones de incubación	Solución del segundo anticuerpo y condiciones de incubación
ATPasa de $\text{H}^+$ de <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>Agrisera</i> )	2% L* en TTBS	1:1000 2% L* en TBS En recipiente a t.amb. durante toda la noche	Fosfatasa alcalina 1:1000 en 2% L* en TBS En recipiente a t. amb. durante 2 h

\*Leche descremada Svelty

- D. 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.

- E. Solución patrón de NBT para desarrollar color.
- Preparar 1 mL de 70% de dimetilformamida (0.7 mL de DMF más 0.3 mL de agua bidestilada).
  - Disolver 30 mg de NBT en la disolución de 70% de DMF. Guardar a 4°C en un envase protegido a la luz, siendo estable por 2 meses.
- F. Solución patrón de BCIP para desarrollar color.
- Disolver 15 mg de BCIP en 1 mL de dimetilformamida. Guardar a 4 °C en un envase protegido a la luz, siendo estable por 2 meses.
- G. Mezcla para desarrollar color.
- Se prepara justo antes de ser usada.
  - Añadir 100 µL de solución de NBT y 100 µL de solución BCIP por cada 10 mL de disolución amortiguadora de carbonatos.

**BIBLIOGRAFÍA**

Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K and Watson J. Molecular Biology of the Cell. Third edition. Garland Publishing Inc. New York (1994) Pp 477-487.

Axelsen KB, Venema K, Jahn T, Baunsgaard L and Palmgren MG. Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2: Mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry*, 38: 7227-7234 (1999).

Bérczi A and Møller IM. Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity in wheat root plasma membrane vesicles: time-dependence and effect of sucrose and detergents. *Plant Physiol*, 70: 583-589 (1987).

Bennett AB, O'Neil SD, Eilmann M, Spanswick RM. H<sup>+</sup>-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris* III. Modulation of ATPase activity by reaction substrate and product. *Plant Physiol*, 78: 495-499 (1985).

Bowman EJ, Siebers A and Altendorf K. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Biochemistry*, 85: 7972-7976 (1988).

Brauer D, Tu SI. Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol*, 89: 867-874 (1989).

Buchanan B, Gruissem W and Jones RL. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville (2000) Pp 902-904.

Bush DR. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 513-542 (1993).

Callen J. Biología Celular. De las Moléculas a los Organismos. Primera edición. Compañía Editorial Continental. Ciudad de México (2000). Pp 353-485

Carmona-Salazar L, El Hafidi M, Enríquez-Arredondo C, Vázquez-Vázquez C, González de la Vara LE and Gavilanes-Ruíz M. Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Anal Biochem*, 417: 220-227 (2011).

Chang Li Z and Bush DR.  $\Delta$ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves: II. Evidence for multiple aliphatic, neutral amino acid symports. *Plant Physiol*, 96: 1338-1344 (1991).

Chen M, Hang G, Dietrich CR, Dunn TM and Cahoon EB. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the identification and functional characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*, 18: 3576-3593 (2006).

Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J and Gavilanes-Ruiz M, Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. En: Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions, (Wada H, Murata N, Govindjee, Eds) Pp 77-115 (2009).

Cocucci MC and Marré E. Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate-inhibited,  $Mg^{2+}$ -ATPase from radish microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 771: 42-52 (1984).

Cooke DT, Burden RS, James CS, Seco T and Sierra B. Influence of sterols on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. *Plant Physiol*, 32: 769-773 (1994).

Dambly S, Boutry M. The two major plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase display different regulatory properties. *J Biol Chem*, 276: 7017-7022 (2001).

De Michelis MI, Papini R and Pugliarello MC. Multiple effects of lysophosphatidylcholine on the activity of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase of radish seedlings. *Bota Acta*, 110: 43-48 (1997).

Desbrosses G, Stelling J and Renaudin JP. Dephosphorylation activates the purified plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase possible function of phosphothreonine residues in a mechanism not involving the regulatory C-terminal domain of the enzyme. *J Biochem*, 251: 496-503 (1998).

Dietrich C, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM and Cahoon EB. Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J*, 54: 284-298 (2008).

Dröse S, Bindseil KU, Bowman EJ, Sieberr A, Zeeck A and Altendorf K. Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*, 32: 3902-3906 (1993).

Eraso P, Portillo F. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose, interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J Biol Chem*, 269: 10393-10399 (1994).

Gaigg B, Toulmay A, 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: 34135-34145 (2006).

Gavilanes M, Sánchez S, Enríquez M y García O. Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia*, 46: 251-262 (1995).

Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K. Plant proton pumps. *FEBS Lett*, 581: 2204-2214 (2007).

Gomes E, Venema K, Simon-Plas F, Milat ML, Palmgren MG and Blein JP. 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 Lett*, 398: 48-52 (1996).

González Reyes KM. Caracterización de la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2010).

Grandmougin A, Schuler I and Hartmann MA. Sterol modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol*, 113: 163-174 (1997).

Grouzis JP, Gibrat R, Rigaud J and Gringnon c. Study of sidedness and tightness to H<sup>+</sup> of corn root plasmalemma vesicles: preparation of a fraction enriched in inside-out vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 903: 449-464 (1987).

Gutiérrez-Najera, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M. Fumonisin B<sub>1</sub>, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 221: 589-596 (2005).

Habenkrant P, van Meer G. Protein-lipid interactions: paparazzi hinting for snap-shots. *Biol Chem*, 390: 795-803 (2009).

Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H and Serrano R. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 185: 527-537 (1991).

Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barret-Wilt G, Kline KG, Mohson SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR. Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biol Chem*, 285: 17918-17929 (2010).

Ibarz E, Palmgren M G, Palazón J, Piñol MT and Serrano R. Activation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by the non-ionic detergent Brij 58. *Biochim Biophys Acta*, 1196: 93-96 (1994).

Johanson F, Sommarin M and Larsson C. Rapid purification of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in its non-activated form using FPLC. *Physiol Plantarum*, 92: 389-396 (1994).

Kanczewska J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud JL, 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 USA*, 102: 11675-11680 (2005).

Kasai M and Sawada S. Evidence for decrease in vanadate-sensitive Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity of higher plant membrane preparation in sucrose solution. *Plant Cell Physiol*, 13: 697-700 (1994).

Kasai M, Sato K, Ono Tsuyoshi, Ono Takako, Kasai Kanji, Tsuruta S, Kikuchi M, Yamazaki J, Kanazawa N and Sawada S. Inhibitory effect of sucrose on the plasma membrane H<sup>+</sup> pump activity and possible involvement of the C-terminal region in the sucrose effect. *J Plant Res*, 113: 97-102 (2000).

Kasamo K and Nouche I. the role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiata* L. (Mung bean) roots and hypocotyls. *Plant Physiol* 83: 323-328 (1987).

Kasamo K. Mechanism for activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) culture cells by molecular species of a phospholipid. *Plant Physiol*, 93: 1049-1052 (1990).

Kasamo K. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res*, 116: 517-523 (2003).

Kasamo K and Sakakibara Y. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci*, 111: 117-131 (1995).

Luckey M. Structural Biology with Biochemical and Biophysical Foundations. Cambridge University Press. New York (2008) Pp 17-23.

Markham JE, Cahoon EB and Jaworski JG. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, 281: 22684-22694 (2006).

Maxfiel F and Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease, *Nature*, 7068: 612-621 (2005).

Mejía Hernández E. Contribución de los esfingolípidos a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en plantas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2010).

Mendenhall W and Sincich T. Probabilidad y estadística para Ingeniería y Ciencias. 4ta. Edición, Prentice-Hall Hispanoamericana (1997) Pp 789-899.

Michelet B and Boutry M. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol*, 108: 1-6 (1995).

Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M. Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H<sup>+</sup>-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem*, 273: 34837-34842 (1998).

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 4ta. Edición, (2006) Pp 374.

Olsson A, Johansson F, Sommarin M and Larsson C. Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant J*, 8: 959-962 (1995).

Palmgren MG, Larsson C and Sommarin M. Proteolytic activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by removal of a terminal segment. *Jf Biol Chem*, 265: 13423-13426 (1990a).

Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskow P and Larsson C. Effect of detergents on the H<sup>+</sup>-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1021:133-140 (1990).

Palmgren MG. Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Physiol Plantarum*, 83: 314-323 (1991).

Palmgren MG and Christensen G. Fuctional comparisons between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms expressed in yeast. *J Biol Chem*, 269: 3027-3033 (1994).

Palmgren MG. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 817-845 (2001).

Palmgren MG and Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 40: 243-266 (2011).

Pata MO, Hannun YA and Ng C. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the sphinx. *New Phytol*, 185: 611-630 (2010).

Pederson PL, Carafoli E. Ion motive ATPase. Ubiquity, properties, and significance to cell fuction. *Trends Biochem Sci*, 12: 146-150 (1987).

Pedersen BP, Buch-Penderson M, Morth P, Palmgren MG, Nissen P. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450: 1111-1115 (2007).

Perlin DS, Spanswick RM. Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. *Plant Physiol*, 68: 521-526 (1981).

Piette AS, Derua R, Waelkens E, Boutry M and Duby G. A phosphorylation in the C-terminal auto-inhibitory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activates the enzyme with no requirement for regulatory 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, 286: 18474-18482 (2011).

Portillo F, Eraso P and Serrano R. Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett*, 287: 71-74 (1991).

Portillo F. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, 1469: 31-42 (2000).

Sandstrom RP, DeBoer AH, Lomax TL, and Cleland RE. Latency of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning. *Plant Physiol*, 85: 693-698 (1987).

Reyes C, Gómez J, Villalaín J and González J. Protein-Lipid Interactions. First edition. Springer Series in Biophysics 9. Germany (2006). Pp 203-208.

Saucedo-García M, González-Solís A, Rodríguez-Mejía P, Olivera-Flores TJ, Vázquez-Santana S, Cahoon EB and Gavilanes-Ruíz M. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Singnaling and Behavior*, 6: 1616-1619 (2011).

Serrano R, Montesinos C, Sánchez J. Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Sci*, 56: 117-122 (1988).

Sterin-Speziale N, Leocata-Nieto F. Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular. *Revista Química Viva*, 3: 234-350 (2007).

Stryer L, Berg J, Tymoczko J, Bioquímica 5° edición, Ed. Reverté. Barcelona, 2004, Pp 320-341.

Vázquez Vázquez CA. Mecanismo de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por disminución de ceramidas endógenas en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM (2007).

Vázquez-Vázquez C, Meza-Bernal L, González-Reyes KM, Ponce G, Carmona L, Enríquez MC, Dietrich C, Ming C, Cahoon BE and Gavilanes- Ruíz M. H<sup>+</sup>-ATPase activity in plasma membrane vesicles isolated from Arabidopsis mutants in sphingolipid synthesis. III Pan-American Plant Membrane Biology Workshop. Puebla, México. January 13-16, 2010. p. 77.

Yeagle PL. Cholesterol modulation of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta*, 727: 39-44 (1983).