

PURIFICACIÓN DE UNA PORINA DE LA MEMBRANA EXTERNA MITOCONDRIAL DE RAÍZ DE BETABEL (*Beta vulgaris*)

Alcántar-Aguirre FC, Lino-Alfaro MB, [Délano-Frier JP](#) y [González de la Vara LE](#). Cinvestav-Campus Guanajuato. Apartado Postal 629, 36500 Irapuato, Gto, México. Tel.: 01 462 39600. email: lgonzale@ira.cinvestav.mx, idelano@ira.cinvestav.mx

La mitocondria contiene canales dependientes de voltaje conocidos como VDAC o porinas mitocondriales, las cuales son el principal componente de la membrana externa mitocondrial. Estos canales son la principal ruta de difusión de iones a través de esta membrana, y se han encontrado en plantas, hongos y humanos, donde están implicados en procesos cancerosos y apoptóticos. En mamíferos, VDAC permite la unión de la hexocinasa 2 al exterior de la mitocondria, para que tenga así acceso preferente al ATP (Pedersen, 2007).

Por otra parte, diversas plantas de la familia Solanaceae producen sistemina cuando son agredidas por insectos. La sistemina es un péptido que actúa como una señal que promueve una respuesta defensiva (Pearce et al. 1991), y se origina de la hidrólisis de la prosistemina, un polipéptido de 200 aa cuyo gen se ha clonado de jitomate, papa y chile. Como la prosistemina sólo se ha encontrado en solanáceas, resultó interesante observar que en diversas plantas de la familia Amaranthaceae, entre ellas el betabel, se reconocía una proteína de 35 kD con un anticuerpo producido contra prosistemina recombinante de jitomate.

Por lo anterior, se procedió a purificar a la proteína reconocida por el anticuerpo anti-prosistemina en las raíces de betabel (*Beta vulgaris*), y secuenciarla parcialmente por espectrometría de masas (MS). El objeto fue identificar una molécula homóloga a la prosistemina en las amarantáceas.

En un extracto de raíces de betabel, se encontró a la proteína de interés de 35 kD en las membranas. Éstas se separaron en membranas plasmáticas (MP) y membranas intracitoplásmicas (MIC) con un sistema de partición de polímeros acuosos (Lino et al. 1998). Como la proteína de 35 kDa se encontró en las MIC, éstas se centrifugaron en un gradiente isopícnico de sacarosa, inmunodetectando a nuestra proteína de interés en membranas densas, quizá mitocondrias. Las proteínas de estas membranas se extrajeron con Tritón X-114 y, en una partición en serie, se encontró a la proteína de 35 kDa en la fracción de proteínas más hidrofóbicas. Esta fracción se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico, encontrándose a la proteína de 35 kDa prácticamente purificada, principalmente en la fracción de proteínas que no se unen a la columna de DEAE-sefárosa (Fig. 1). La banda de proteína de 35 kDa purificada se recortó de un gel y se secuenció parcialmente por MS. Las secuencias de cuatro péptidos, 54 aa en total, mostraron una muy alta homología con una porina de membrana externa mitocondrial (VDAC) de espinaca (Fig. 2). Sin embargo, las secuencias de VDAC de espinaca y de prosistemina de jitomate, presentaron muy baja homología entre ellas. En conclusión, se purificó una proteína reconocida por suero antiprosistemina, que por sus características bioquímicas y por su identificación por MS, es una porina de membrana externa mitocondrial presente en raíces de betabel (*Beta vulgaris*).

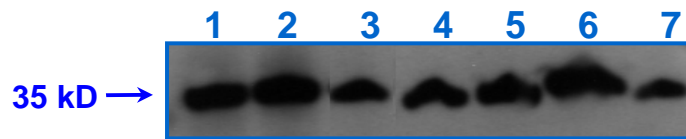


Figura 1. Inmunodetección con anticuerpos anti-prosistemina, después de la cromatografía DEAE-Sepharosa. 1) Membrana de organelos, 2) Fracción densa del gradiente de sacarosa, 3) Muestra para cromatografía DEAE-Sefarosa, 4) Fracción no retenida por la columna de cromatografía DEAE-Sefarosa , 5) Fracción cero seguida del material no retenido por la columna de cromatografía, 6) Fracción uno seguida de la fracción cero, 7) Fracción dos de la cromatografía DEAE-Sefarosa.

$(m + 2H^+)/z$	$m + H^+$	<i>Péptido</i>	
974.5	1948	<i>B. vulgaris</i>	BFLLTFSTSDGVALTST · · ·
		<i>S. oleracea</i>	28 KFTLLTYTANGVAITST 44
818.92	1636.84	<i>B. vulgaris</i>	-VTLSEVDTSALEK
		<i>S. oleracea</i>	251 VTISGEVDTSAIEK 264
801.4	1601.86	<i>B. vulgaris</i>	BLFTTLIVDEPA-
		<i>S. oleracea</i>	77 NLFTTITVDEPA 87
654.35	1307.7	<i>B. vulgaris</i>	BQGELFLADVSTK ·
		<i>S. oleracea</i>	47 KKGELFLADVSTK 59

Figura 2. Los cuatro fragmentos de un total de 54 aminoácidos, con su masa correspondiente obtenidos por espectrometría de masas, mostrando su alta identidad con espinaca (*S. oleracea*).

Bibliografía

Lino B, Baizabal-Aguirre VM, González de la Vara LE (1998) The plasma-membrane H^+ -ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 204:352-359

Pearce G, Strydom D, Johnson S & Ryan CA (1991) *Science* 253, 895-897

Pedersen PL (2007) Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancer' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg Biomembr* 39:211-222