

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

“Estudio de la acumulación activa de calcio en el
aparato de Golgi de la célula vegetal”



Viviana Rosa Ordenes Ortíz

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con
mención en Botánica.

RESUMEN

El Ca^{2+} juega un papel crucial en la fisiología vegetal, actuando como segundo mensajero en la percepción de una gran variedad de señales endógenas y ambientales. El aumento transiente de Ca^{2+} citosólico en respuesta a estímulos está determinado por dos flujos opuestos: La entrada de Ca^{2+} al citosol a través de canales y su salida mediante el transporte activo al espacio extracelular o hacia reservorios intracelulares. Hasta ahora, sólo dos organelos de la célula vegetal han sido identificados como reservorios de Ca^{2+} : la vacuola y el retículo endoplásmico. En ellos, la concentración de Ca^{2+} puede sobrepasar los 10 mM y se mantiene principalmente por la captación activa de Ca^{2+} mediada por bombas de Ca^{2+} presentes en las membranas de estos organelos. Las bombas de Ca^{2+} o Ca^{2+} -ATPasas, son el mecanismo de transporte activo de Ca^{2+} más importante, sus principales funciones son mantener baja la concentración del ion en el citosol (nM) impulsando su acumulación en los reservorios intracelulares y suplir de Ca^{2+} a los distintos organelos para las funciones celulares y bioquímicas. Recientes datos obtenidos a través del proyecto de secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* revelan la existencia de por lo menos 11 genes que codificarían para Ca^{2+} -ATPasas. Además, el análisis de los EST (expressed sequence tags) sugiere que el número de bombas de Ca^{2+} presentes en esta planta sería aún mayor. Algunas de estas bombas ya han sido identificadas a nivel molecular y funcional en el retículo endoplásmico y en la vacuola. Sin embargo, el análisis de la

distribución subcelular de actividades Ca^{2+} -ATPasa obtenidas en diversos tejidos vegetales sugiere que estas bombas podrían estar presentes también en otro sistema membranoso de la célula vegetal: el aparato de Golgi. El aparato de Golgi vegetal se compone de numerosas pilas de cisternas distribuidas por toda la célula, estas estructuras son responsables de la síntesis y ensamblaje de glicoproteínas, proteoglicanos y polisacáridos complejos. En células animales y levaduras, el aparato de Golgi posee bombas de Ca^{2+} y funciona como un reservorio de Ca^{2+} . Tal es la importancia de las Ca^{2+} -ATPasas de Golgi para estas células, que los cambios en la abundancia y actividad de estas proteínas o la mutación de los genes que las codifican afectan la homeostasis de Ca^{2+} del organelo, lo que deriva en alteraciones en procesos de señalización, glicosilación de proteínas y tráfico vesicular que se llevan a cabo en el aparato de Golgi.

Considerando que hasta ahora los mecanismos de homeostasis de Ca^{2+} en el aparato de Golgi vegetal no han sido analizados en profundidad y dada la importancia de este organelo en procesos celulares que dependen de Ca^{2+} , es posible pensar que el Ca^{2+} es acumulado en el lumen del organelo mediante la acción de bombas Ca^{2+} -ATPasa y por lo tanto, el aparato de Golgi también podría funcionar como un reservorio de Ca^{2+} para la célula vegetal.

En este trabajo se utilizaron dos aproximaciones para el estudio de la homeostasis de Ca^{2+} del aparato de Golgi vegetal. Primero, se investigó la presencia de un mecanismo de transporte activo de Ca^{2+} en las membranas del Golgi, mediante la medición de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en fracciones subcelulares aisladas desde plántulas etioladas de arveja (*Pisum sativum*). La distribución subcelular de la actividad

de captación de Ca^{2+} dependiente de ATP medida en estas membranas mostró una fuerte correlación con la distribución de marcadores de membrana de Golgi. La K_m aparente para la actividad de transporte de Ca^{2+} fue 209 nM. La alta afinidad por Ca^{2+} que presenta este mecanismo de transporte, sugiere que se trata de una bomba Ca^{2+} -ATPasa presente en el organelo. Además, esta actividad fue fuertemente inhibida por vanadato (concentración que causa un 50% de inhibición o $I_{50}=126 \mu\text{M}$) y ácido ciclopiazónico ($I_{50}= 0,36 \text{ nmol mg protein}^{-1}$) dos conocidos inhibidores de Ca^{2+} ATPasas en células animales, levaduras y plantas. Interesantemente, la actividad Ca^{2+} -ATPásica medida en las membranas de Golgi fue inhibida por Tapsigargina ($I_{50}=88 \text{ nM}$), un potente inhibidor de Ca^{2+} ATPasa tipo SERCA (sarco-endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPases) de células animales, cuyo efecto sobre Ca^{2+} -ATPasas vegetales no se había demostrado hasta ahora.

Esta nueva bomba de Ca^{2+} cuya actividad se detectó en el aparato de Golgi vegetal nos lleva a formular las siguientes preguntas: ¿Participa esta bomba en la homeostasis de Ca^{2+} del Golgi vegetal?, ¿Su actividad produce la acumulación de Ca^{2+} en el organelo?. La respuesta a estas preguntas se encontró utilizando la segunda aproximación para el estudio de la homeostasis de Ca^{2+} del aparato de Golgi: la medición *in vivo* de la concentración de Ca^{2+} del organelo.

Para medir la concentración de Ca^{2+} *in vivo* en el aparato de Golgi vegetal se destinó la fotoproteína dependiente de Ca^{2+} , aequorina, al lumen del organelo. Esto se logró realizando una fusión génica entre la secuencia codificante de la fotoproteína y una señal de destinación al Golgi. El constructo génico se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* obteniéndose de esta forma líneas de

plantas transgénicas que acumulan la proteína quimérica. Las mediciones de Ca^{2+} libre *in vivo* en el aparato de Golgi fueron obtenidas a través de la luminiscencia dependiente de Ca^{2+} producida por la fotoproteína. Se encontró que la concentración de Ca^{2+} en estado de reposo es cercana a $1\mu\text{M}$, valor mucho mayor que el registrado en el citosol ($0,05\mu\text{M}$). Además, al igual que en el citosol, la concentración de Ca^{2+} en el Golgi aumenta frente estímulos tales como frío, movimiento o estrés osmótico, pero a diferencia de las dinámicas de remoción de Ca^{2+} del citosol, el Golgi exhibe una disminución del Ca^{2+} libre post-estímulo que tarda horas en alcanzar nuevamente el estado de reposo. Finalmente, Tapsigargina inhibe el aumento de Ca^{2+} libre inducido por estímulos en el aparato de Golgi lo que indica que la bomba Ca^{2+} -ATPasa descrita funcionalmente participa en la homeostasis de Ca^{2+} del organelo.