



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

00591
UN/M
POSGRADO
Ciencias Bioquímicas



FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INTERACCIÓN DE LA FUMONISINA B1 CON LA
MEMBRANA PLASMÁTICA: EFECTOS EN LA BICAPA
LIPÍDICA Y EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A:

NORA ANDREA GUTIÉRREZ NÁJERA

Tutora: DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ.

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2005

0350046



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

A la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis y que estuvo formado por:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Instituto de Neurobiología, UNAM
Dra. Rocío Cruz Ortega	Instituto de Ecología, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruíz	Facultad de Química, UNAM

A la contribución de Laura Carmona, Christian Vazquez, Silvia Palacios, Liliana Martínez y Priscila Rodríguez por resultados obtenidos por ellos y que se incluyen en dos de los artículos y en sus respectivos trabajos de tesis. Estos resultados fueron fundamentales para entender e interpretar el modelo utilizado en este trabajo.

A la asesoría de las Dras. Rosario Muñoz Clares y Sobeida Sánchez Nieto del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, en el análisis de los resultados de la cinética de la actividad de ATPasa.

A la asesoría del Dr. Javier Plasencia, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, en las determinaciones de fumonisina B₁ y bases esfingoideas.

A la asesoría del Dr. Jorge Ramírez del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en las mediciones de fluidez membranal.

A la colaboración del Dr. Mohamed El Hafidi, del Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en las mediciones de ácidos grasos.

Al apoyo del Dr. Antonio Peña del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo las mediciones de fluidez membranal.

A la ayuda técnica de la Q.F.B. Consuelo Enríquez del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, en la obtención de vesículas de membrana plasmática.

A la ayuda técnica de la Quím. Laurel Fabila Ibarra.

A la asesoría técnica de la M. en C. Mariana Rivas en la medición de bases esfingoideas.

A la asesoría técnica de la Q.F.B. Diana Sánchez en la medición de la fumonisina B₁.

Nora Andrea Gutiérrez Nájera recibió becas otorgadas por CONACYT (138551), DGEP-UNAM y UC-MEXUS (Proy. CN-03-118) mientras realizó los estudios de doctorado.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (40311-Q), DGAPA-UNAM (IN208300) y PAEP-UNAM (103325).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespecial.

NOMBRE: Nora A. Gutiérrez Nájera

FECHA: 17- noviembre - 2005

FIRMA: Nora A. Gutiérrez Nájera

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de diciembre de 2005

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Antonio Peña Díaz
Vocal	Dr. Jesús Aguirre Linares
Vocal	Dra. Rosario Muñoz Clares
Vocal	Dra. Rocío Cruz Ortega
Secretario	Dr. José de Jesús García Trejo
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Suplente	Dra. Marietta Tuena Sangri

AGRADECIMIENTOS

A Jehová mi Dios y padre, por la vida que me concede y por la fuerza que me ha suministrado para seguir en este camino.

A mis padres, Avelina y Roberto, por todo su amor y por ayudarme a llegar a ser lo que soy.

A mis hermanos, Diana, Lorena y Roberto por creer siempre en mí y en lo que soy capaz de hacer.

A la Dra. Marina Gavilanes por su apoyo y por la formación que de ella recibí hasta este punto de mi vida académica.

A la Dra. Rocío Cruz y al Dr. Javier Plasencia por su apoyo incondicional en las diversas etapas de la realización de esta tesis.

A mi amiga Andrea San Juan, por el ánimo que siempre me ha brindado y por su apoyo incondicional.

A todo mis compañeros del laboratorio 101 que han contribuido de muchas formas como su ayuda técnica pero más por su compañerismo y por compartirlo todo durante mi estancia en este laboratorio.

RESUMEN

La fumonisina B₁ (FB₁) es una de las toxinas producidas por *Fusarium verticillioides*, un patógeno que se encuentra comúnmente en el maíz. Se ha observado que la FB₁ inhibe a la esfinganina N-aciltransferasa (SAT), enzima que sintetiza la ceramida; un precursor de los esfingolípidos membranales. Por su naturaleza química y su efecto en la biosíntesis de esfingolípidos, la FB₁ podría alterar la composición, estructura y propiedades de la membrana plasmática. Con base en lo anterior, se determinó el efecto de la toxina en algunos componentes tanto lipídicos como proteicos de la membrana plasmática de embriones de maíz en germinación, explorando sus posibles mecanismos de acción. Se realizaron experimentos con dos enfoques experimentales: 1) en los experimentos *in vivo* (en los que se añadió FB₁ a los embriones en el medio de imbibición durante 24 h) se observó indirectamente la acción de esta toxina sobre la membrana plasmática debido a su efecto en la SAT; 2) en los experimentos *in vitro* (en los que se añadió la FB₁ a las membranas plasmáticas purificadas y aisladas de embriones no expuestos a la toxina) se observó la acción directa de la FB₁ sobre los componentes membranales.

En los experimentos *in vivo* se observó que el efecto de la FB₁ en la actividad de la SAT produjo un incremento de 10 veces en los niveles de esfinganina en la membrana plasmática y de 4 veces en los niveles de fitoesfingosina en microsomas. En estas condiciones, la actividad de la ATPasa de H⁺ se inhibió por la FB₁, inhibición que se revirtió por la adición de ceramida exógena. Aunque los niveles de ácidos grasos en la membrana plasmática no se modificaron, la fluidez membranal y la peroxidación lipídica disminuyeron.

In vitro, la FB₁ inhibió acompetitivamente a la ATPasa de H⁺ y aumentó la fluidez membranal. Sin embargo, estos dos fenómenos no estuvieron relacionados. Los niveles de peroxidación lipídica no se modificaron.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la FB₁ modifica las propiedades y actividades enzimáticas de la membrana plasmática de embriones de maíz a través de dos vías: 1) una directa, en la que la toxina actúa sobre las moléculas que componen la membrana, y 2) una indirecta, en la que la toxina modifica los niveles membranales de esfinganina y ceramida, como consecuencia de la inhibición de la SAT. Los mecanismos de acción descritos para la FB₁ sobre la membrana plasmática de los embriones de semillas de maíz pueden contribuir a los efectos de la toxina durante la infección de *F. verticillioides* o constituir parte de la estrategia de los embriones para contender con el proceso de infección por este hongo.

ABSTRACT

Fumonisin B₁ (FB₁) is one of the toxins produced by the fungus *Fusarium verticillioides*, a maize pathogen that produces the rotting of maize ears. FB₁ inhibits sphinganine N-acyl transferase (SAT), enzyme that synthesizes ceramide, a key molecule in sphingolipid biosynthesis. Because of FB₁ chemical nature and its effects in sphingolipid biosynthesis, this toxin could alter the structure, composition and properties of the plant plasma membrane. The aim of this work was to study the effects and possible mechanisms of action of this toxin on lipid and protein components of the plasma membrane of germinating maize embryos. To study the FB₁ effects, *in vivo* and *in vitro* approaches were undertaken. In the first case, FB₁ was added to maize embryos during a 24 h imbibition period and the action of the toxin on SAT activity and its consequences on plasma membrane were observed. In the second case, FB₁ was added to plasma membranes isolated from maize embryos imbibed for 24 h in the absence of the toxins and the direct action of FB₁ on plasma membrane components was determined.

In vivo experiments showed that the effect of FB₁ on SAT activity led to a 10-fold increase in plasma membrane sphinganine levels, and 4-fold increase in microsomal phytosphingosine, producing a decrease in plasma membrane fluidity. Under these conditions, the plasma membrane H⁺-ATPase activity was inhibited, but this inhibition was released by exogenous ceramide. Fatty acid levels in plasma membranes did not change, but membrane fluidity and lipid peroxidation decreased.

In vitro, FB₁ produced uncompetitive inhibition of the H⁺-ATPase and increased membrane fluidity. However, these phenomena were not related. FB₁ did not affect lipid peroxidation.

Altogether, these results show that FB₁ modifies the properties and enzymatic activities of the plasma membrane of maize embryos through two different pathways: 1) By direct action of FB₁ on plasma membrane components, and 2) Indirectly through modification of the levels of sphinganine and probably ceramide in the plasma membrane, as a result of SAT inhibition. The mechanisms of FB₁ action on the plasma membrane described in this work might contribute to the infection of *F. verticillioides* or to be part of the maize embryos strategy to contend with the infection by this fungus.

INDICE	No. página
Carátula.	1
Reconocimientos.	2
Agradecimientos.	5
Resumen.	6
Abstract.	7
Indice	8
Introducción.	10
I. La fumonisina B ₁ y sus efectos fisiológicos en sistemas vegetales y animales.	10
II. Estructura y propiedades de la FB ₁ .	12
III. La fumonisina B ₁ y los mecanismos moleculares de su acción tóxica.	13
1. La FB ₁ y el metabolismo de esfingolípidos.	14
2. La FB ₁ en relación con las vías de transducción de señales.	17
3. La FB ₁ y los componentes de la membrana plasmática.	18
IV. La ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de plantas.	20
1. Estructura de la ATPasa de H ⁺ .	20
2. Papeles fisiológicos de la ATPasa de H ⁺ .	23
3. La ATPasa de H ⁺ y las toxinas microbianas.	24
4. La ATPasa de H ⁺ y la respuesta de defensa contra patógenos.	26
V. Los esfingolípidos y las respuestas de defensa contra patógenos en plantas.	28
Hipótesis	32
Objetivo general	32
Objetivos particulares.	32
Capítulo: "La membrana plasmática y su importancia durante la patogénesis en plantas"	
Resultados.	33
El modelo biológico.	33
Los enfoques <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	33
Organización de resultados.	34
Artículo: "Fumonisin B ₁ , a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrana H ⁺ -ATPase".	
Artículo: "Fumonisin B ₁ inhibitory effects <i>in vivo</i> : decrease of plant plasma membrane H ⁺ -ATPase activity is due to diminished levels of ceramide".	
Capítulo: "Interplay at the interphase fumonisin B ₁ , a fungal toxin and its effects on the plasma membrane from maize embryos".	
Discusión.	35
I. Acción directa de la molécula de FB ₁ sobre la membrana plasmática.	36
1. La FB ₁ disminuyó la rigidez de la región hidrofóbica de la membrana plasmática.	36
2. La FB ₁ inhibió a la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática por un mecanismo de cinética acompetitiva.	36
3. La esfinganina y la fitoesfingosina inhibieron a la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática.	37
II. Acción de la FB ₁ sobre la membrana a través de la modificación de los niveles endógenos de esfingolípidos membranales.	38
1. La adición de FB ₁ a los embriones inhibió a la ATPasa de H ⁺ sin que se detectara la toxina en la membrana.	38
2. La adición de FB ₁ a los embriones de maíz aumentó los niveles de bases esfingoideas en las membranas celulares.	39
3. La fluidez de la membrana plasmática disminuyó por el aumento en esfinganina y no se correlacionó con un cambio en los niveles membranales de ácidos grasos o de proteína total.	40
4. La peroxidación de lípidos de la membrana plasmática disminuyó por adición de la FB ₁ a los embriones de maíz.	42

5. La inhibición producida en la actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática está asociada a la disminución membranal de ceramida y no al incremento en esfinganina o a una menor cantidad de enzima o a una pérdida en la fluidez membranal.	43
6. Probables mecanismos de acción de la ceramida en la actividad de la ATPasa de H ⁺ .	44
III. Implicaciones fisiológicas de los efectos de la FB ₁ en la membrana.	46
1. El efecto inhibitorio de la FB ₁ en el crecimiento radicular está asociado a su inhibición sobre la ATPasa de H ⁺ .	46
2. El escape de electrolitos inducido por la FB ₁ puede estar revelando un mecanismo de MCP (muerte celular programada) relacionado con mecanismos de defensa.	47
Conclusiones particulares.	49
Conclusión general.	50
Modelo.	51
Bibliografía.	52

INTRODUCCIÓN

I. LA FUMONISINA B1 Y SUS EFECTOS FISIOLÓGICOS EN SISTEMAS VEGETALES Y ANIMALES

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos que resultan dañinos para los animales y seres humanos. Las especies de *Fusarium* pueden producir una variedad de compuestos, como pigmentos y antibióticos, pero son muy conocidas por la producción de micotoxinas de varios tipos como los tricotecenos y las fumonisinas. Estas últimas son un grupo de toxinas descubiertas en 1988 y producidas por *F. verticillioides*.

Fusarium verticillioides es uno de los hongos más asociados a la contaminación de cereales básicos como el maíz y que son parte de la dieta de animales y humanos. Se ha observado que está involucrado en enfermedades humanas y animales desde su descripción original en 1904, cuando en los Estados Unidos se presentaron en el campo brotes extensos de enfermedades animales asociadas con la ingestión de maíz contaminado con hongos.

Más recientemente, *F. verticillioides* se ha asociado con el cáncer del esófago humano en algunas áreas del mundo de alta incidencia de la enfermedad. En el sur de África, las más altas proporciones de cáncer de esófago humano se presentan en los distritos de suroeste del Transkei, donde el maíz es el principal producto en la dieta. Los cultivos aislados de *F. verticillioides* de maíz producido en estos distritos fueron gravemente tóxicos para patos (Kriek *et al.* 1981b). Cuando el material de cultivo de estos aislados creció sobre maíz esterilizado y se alimentó con éste a animales de experimentación, las lesiones producidas incluyeron cirrosis e hiperplasia nodular del hígado y trombosis intra ventricular cardíaca en ratas, leucoencefalomalacia y hepatitis tóxica en caballos, edema pulmonar en cerdos, nefrosis y hepatitis en ovejas y falla congestiva aguda del corazón en babuinos (Kriek *et al.* 1981a, 1981b). Marasas *et al.* (1984) encontraron que el aislado MRC 826 de *F. verticillioides* crecido en maíz esterilizado fue hepatocarcinogénico para ratas (Nelson *et al.* 1993). Se ha demostrado que los efectos descritos anteriormente en animales producidos por los aislados de *Fusarium verticillioides* son reproducidos por uno de los metabolitos secundarios producidos por este hongo: la fumonisina B₁ (FB₁). Adicionalmente, el consumo de pequeñas cantidades de toxinas fúngicas puede resultar en una inmunidad deteriorada y una disminución de la resistencia a enfermedades infecciosas. De particular interés es la capacidad de la FB₁ de alterar la función inmune normal y sus efectos inmunosupresivos e inmunoestimulatorios (Meli *et al.* 2000).

Las fumonisinas de las series A, B y C, han sido detectadas en maíz de buena calidad para consumo animal y humano en los Estados Unidos y el sur de África, únicas

áreas del mundo para las cuales se han reportado suficientes resultados de encuestas. Ahí se encontraron concentraciones de FB₁ en el intervalo de 0 a 38 µg/g de peso seco de maíz en 175 muestras seleccionadas aleatoriamente en el estado de Iowa de 1988-1991. Se encontraron concentraciones promedio de FB₁ (2.5 y 3.5 µg/g) para las cosechas de los cuatro años estudiados. En el sur de África se encontraron concentraciones promedio de la toxina entre 0.4 a 1.8 µg/g. En muestras de maíz asociadas con problemas de salud de humanos y animales, las concentraciones de FB₁ son más altas que en las de las muestras de maíz de buena calidad (menores a 1 µg/g). El cáncer de esófago humano en ciertas regiones rurales de Transkei está asociado con el consumo de maíz de pobre calidad que puede estar naturalmente contaminado con hasta 140 µg de fumonisinas por gramo de peso seco de maíz. El maíz y productos derivados asociados con brotes de varias enfermedades de animales contienen desde 0.3 hasta 330 µg/g de la toxina (Nelson, 1993). En México se ha detectado la presencia de fumonisina B₁ en maíz que se consume en niveles de 0.4 -28.5 µg/g (Desjardins *et al.* 1994; Rosiles *et al.* 1998).

La FB₁ también es tóxica para las plantas. Al aplicar la FB₁ en concentraciones de 4.1 a 1388 µM a hojas de toloache se observó una disminución del crecimiento de las plantas y lesiones en las hojas. Se observaron otros efectos como la fuga de electrolitos, autólisis, y fotoblanqueamiento de tejidos en menos de 12 h después de exposición a la luz (25°C). El grado de daño es directamente proporcional a la concentración y duración de la exposición en todos los casos. La FB₁ redujo los niveles de clorofila entre 5 y 73% después de 48 h en la luz. Al exponer hojas de toloache a la FB₁ en una concentración de 694 µM, se observó daño ultraestructural en las células en empalizada del mesófilo (Abbas *et al.* 1991, Abbas *et al.* 1992).

La FB₁ inhibe el crecimiento de cultivos de callos de maíz, dependiendo de la concentración de la toxina (0.14-140 µM). El efecto de inhibición del crecimiento es reversible, ya que si se transfiere el callo a un medio de crecimiento libre de la toxina después de 6 semanas de tratamiento con la FB₁, se recupera el nivel de crecimiento del callo hasta valores del control (Van Asch *et al.* 1992). Además de estos datos en estudios efectuados sobre el efecto de FB₁ en la germinación de semillas de maíz, se reportó que la FB₁ no inhibía la emergencia de la radícula, es decir no inhibía la germinación, y que al variar la concentración de FB₁ de 1.4 a 140 µM no había diferencia en los porcentajes máximos de germinación de las semillas. Sin embargo, sí se observaba diferencia en el crecimiento de la radícula al incrementar la concentración de la FB₁ en el tratamiento de las semillas de maíz en germinación, disminuyendo el crecimiento de la radícula en las semillas con siete días de germinación (Doehlert *et al.* 1994).

Se observó que la FB₁ inhibe el crecimiento de los pelos radiculares de plantas de tomate con genotipo *Asc/asc* (plantas de tomate con fenotipo de resistencia a FB₁) a concentraciones superiores a 1 μM. También se inhibe el crecimiento de la raíz, se produce la necrosis de la punta de la raíz y la deformación de pelos radiculares con 700 μM de FB₁ (Brandwagt *et al.* 2000). En protoplastos de *Arabidopsis* se ha observado que la FB₁ induce la muerte celular programada (Asai *et al.* 2000).

II. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA FB₁

Las estructuras de las fumonisinas fueron reportadas primero por un grupo de investigadores sudafricanos en 1988 (Bezuidenhout *et al.* 1988). La FB₁ es un diéster del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y un 2-amino-12,16 dimetil, 3, 5, 10, 14, 15-pentahidroxiicosano con los grupos hidroxilos en C-14 y C-15 esterificados al carboxilo terminal de los ácidos (Fig. 1). Además de la FB₁, se han reportado otras fumonisinas relacionadas estructuralmente. Las fumonisinas B₂ y B₃ son homólogos estructurales que carecen de uno de los grupos hidroxilo libres de la cadena. La fumonisina B₂ carece del hidroxilo C-10 mientras que la fumonisina B₃ carece del hidroxilo en el C-5. Las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ son las que se presentan con mayor frecuencia en las muestras de maíz contaminadas naturalmente. Algunas muestras de maíz contienen pequeñas cantidades de la fumonisina B₄, cuya estructura carece de los grupos hidroxilos en los carbonos C-5 y C-10. Un análogo adicional a la fumonisina B₁ es la fumonisina C₁, que tiene los mismos sustituyentes que la fumonisina B₁, pero un peso molecular 14 Da menor y carece del grupo metilo en el carbono C-1. Ésta se presenta en la naturaleza en bajas concentraciones, así como las fumonisinas A₁ y A₂, las cuales están acetiladas en el grupo amino (Nelson, 1993).

Aunque la FB₁ fue identificada como una nueva clase de micotoxina, su estructura es muy similar a la de las toxinas AAL (producidas por el hongo *Alternaria alternata*), las cuales son monoésteres del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y 2,4,5,13,14-pentahidroxiheptadecano. Como se puede observar en su estructura (Fig. 1), la FB₁ es una molécula anfipática; sin embargo, los grupos hidrofílicos, al igual que en las otras fumonisinas, la vuelven insoluble en disolventes orgánicos y muy soluble en agua.

Estudios de modelaje molecular sobre la conformación de la FB₁ en solución acuosa han permitido proponer que esta molécula tiene una conformación similar a una cruz con las cadenas laterales de ácido tricarbálico orientadas perpendicularmente al eje principal de la cadena hidrocarbonada. Cuando interactúa con una monocapa de colesterol, sobre una superficie acuosa, las cadenas de ácido tricarbálico de la FB₁ se

encuentran expuestas hacia el medio ambiente acuoso, mientras que el esqueleto hidrocarbonado del C16 al C20 de la cola, interactúa con la cadena de carbono acíclica del colesterol. Esquemáticamente, la FB₁ adoptaría una configuración de mariposa (Mahfoud *et al.* 2002) (Fig. 2).

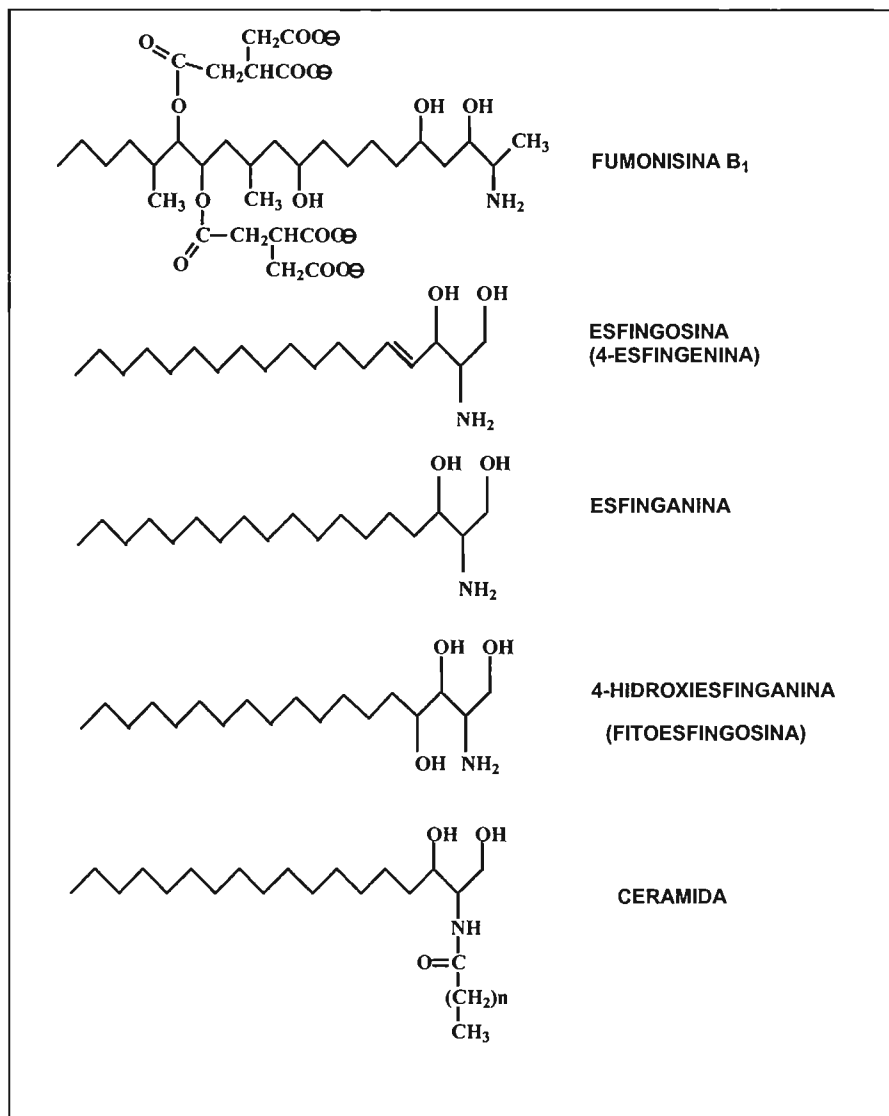


Fig. 1. Estructuras químicas de compuestos esfingoideos.

III. LA FUMONISINA B₁ Y LOS MECANISMOS MOLECULARES DE SU ACCIÓN TÓXICA

La FB₁ interactúa con varias moléculas celulares e indudablemente varios de estos efectos pueden contribuir a su acción tóxica. A continuación se describen algunos de los efectos reportados en la literatura.

1. La FB₁ y el metabolismo de esfingolípidos

Recientemente se descubrió que los esfingolípidos, una clase de lípidos membranales, son también importantes moléculas de señalización (Huwiler *et al.* 2000). Estos lípidos son derivados de bases de cadena larga y muestran una gran complejidad y diversidad estructural. Para principios de este siglo ya se habían identificado al menos 300 especies de esfingolípidos en mamíferos.

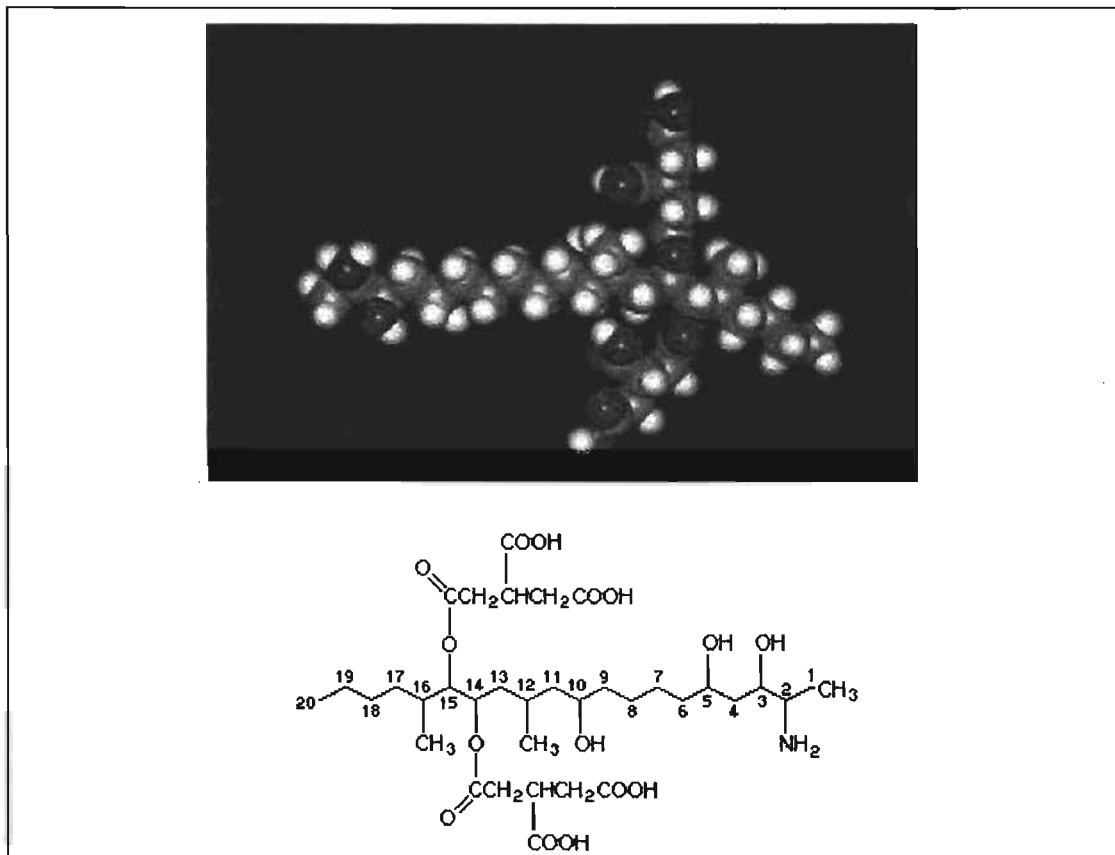


Fig. 2. Estructura de la FB₁ (tomado de <http://psiweb.unl.edu/stone/resint.html>)

Estructuralmente, los esfingolípidos se definen y distinguen por la presencia de un esqueleto esfingoideo. En células de mamíferos este compuesto esfingoideo suele ser la esfingosina ((2S,3R,4E)-2-amino-1,3-dihidroxi-4-octadeceno) y en levaduras y células de plantas es fitoesfingosina (Fig. 1). El siguiente bloque estructural de los esfingolípidos es la ceramida, una molécula de esfingosina acilada en el grupo 2-amino. Esta parte de ceramida es el armazón básico para la mayoría de los esfingolípidos, los cuales varían en

la estructura de sus porciones hidrofóbica e hidrofílica y especialmente en los diferentes sustituyentes en la posición del grupo 1-hidroxilo como se puede observar en la Fig. 1 (Huwiler *et al.* 2000).

La biosíntesis de los esfingolípidos tiene lugar en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. La etapa inicial es la condensación de L-serina con un ácido graso esterificado a la coenzima A, usualmente palmitoil-coenzima A, para producir 3-cetoesfinganina. Esta reacción es catalizada por la enzima serina palmitoil transferasa (SPT), que es dependiente de piridoxal fosfato. En esta reacción, el grupo carboxilo de serina es liberado como dióxido de carbono. Esto resulta en la formación de bases de cadena larga con una longitud de 18 carbonos. La SPT cataliza el paso limitante de la biosíntesis de esfingolípidos y por tanto puede ser el principal punto de regulación.

En la siguiente etapa, la 3-cetoesfinganina es reducida a D-eritro-esfinganina por la enzima 3-cetoesfinganina reductasa en una reacción dependiente de NADPH. Después de esto, la esfinganina es acilada a dihidroceramida por la enzima esfinganina N-aciltransferasa. Luego, la enzima dihidroceramida desaturasa produce una insaturación en la dihidroceramida para producir ceramida. Todas estas enzimas que llevan a cabo la biosíntesis de la ceramida están localizadas en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático. La ceramida es el precursor común de la esfingomielina y glicoesfingolípidos, y la etapa final de su biosíntesis tiene lugar en la parte luminal de las membranas del aparato de Golgi (Fig. 3).

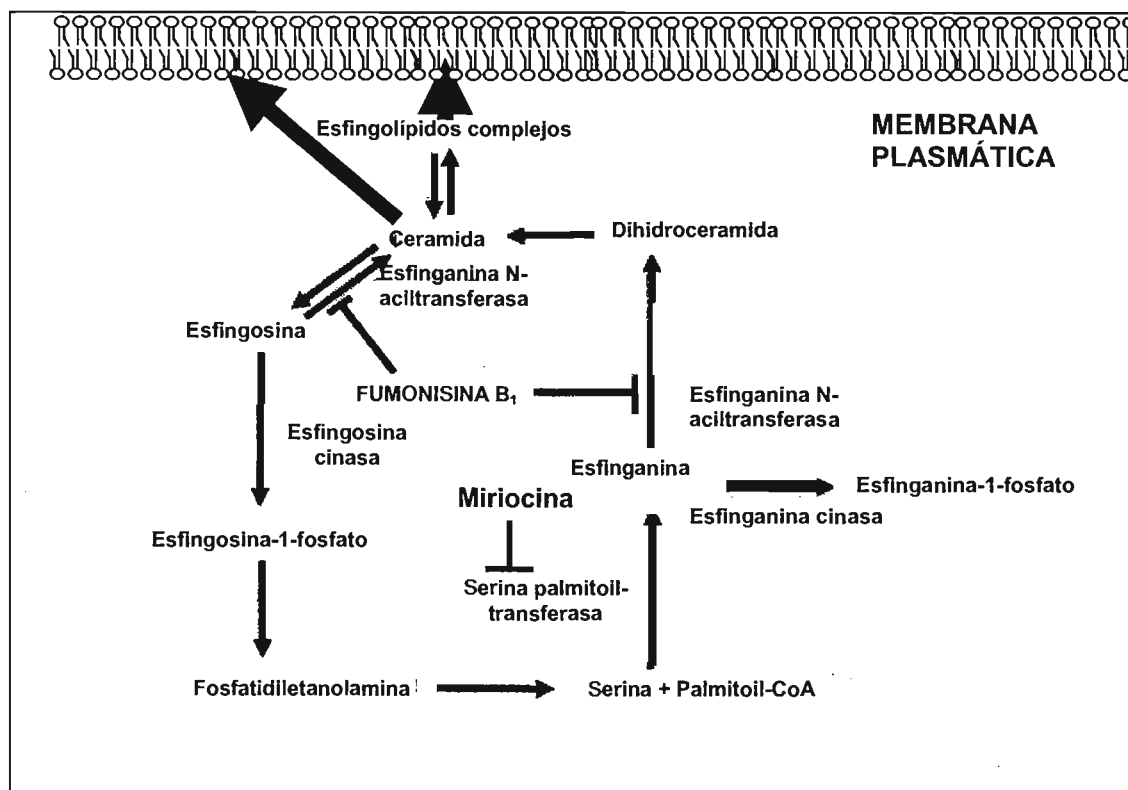


Fig. 3. Metabolismo de esfingolípidos y sitios de inhibición de la FB₁ y miriocina (modificado de Goope et al. 2003).

La fumonisinas y las toxinas de *Alternaria alternata* (AAL) son compuestos estructuralmente semejantes a las bases esfingoideas (Fig. 1). Como ya se mencionó, estas toxinas son producidas por varias especies de hongos filamentosos asociados con enfermedades de las plantas. En *Lemna pausicostata* Heglem 6746 (un tipo de lenteja de agua), en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y en callo de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv *Wisconsin*), tanto la FB₁ como la toxina de AAL produjeron un gran incremento en esfinganina y fitoesfingosina, bases esfingoideas que se encuentran normalmente en bajas concentraciones. Esto indicaba que ambas toxinas interrumpían la biosíntesis de esfingolípidos. Dado que las bases esfingoideas son precursores de ceramida, se propuso que las toxinas tenían como blanco, en esta ruta metabólica, a la enzima que sintetizaba ceramida. Esto también sugirió que los efectos fisiológicos producidos por *Fusarium moniliforme* (ahora *F. verticillioides*) y *A. alternata* podrían ser consecuencia de esta interrupción del metabolismo de esfingolípidos (Abbas et al. 1994, 1998).

En animales ya se había demostrado que la FB₁ es un inhibidor de la actividad de la esfingosina N-acil transferasa (ceramida sintetasa). En microsomas de hígado de rata,

la FB₁ inhibió la actividad de la ceramida sintetasa con una IC₅₀ de 0.1 μM y redujo la conversión de esfingosina a ceramida en hepatocitos intactos. Esta inhibición fue acompañada por un aumento en los niveles de esfinganina libre. Cuando los hepatocitos fueron incubados con 1 μM de FB₁ por 4 días, los niveles de esfinganina se incrementaron 110 veces, aunque la esfingosina disminuyó considerablemente (la esfingosina no es intermediario de la síntesis *de novo* de esfingolípidos, sino que se produce por recambio de esfingolípidos complejos) (Wang *et al.* 1991). En otro estudio, los hepatocitos de rata fueron expuestos a la FB₁ en concentraciones de 150 μM-500 μM, produciendo alteraciones en los lípidos: disminuyó los niveles de triacilgliceroles y esfingomielina e incrementó los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. También se observó un incremento de los niveles de esfinganina a bajas y altas concentraciones de la toxina (Gelderblom *et al.* 1996).

En células de riñón de cerdo, la FB₁ (en concentraciones de 10-50 μM) causó un incremento en la esfinganina libre intracelular, lo cual precedió a una disminución de esfingolípidos complejos, a la inhibición del crecimiento celular y finalmente a la muerte celular. Los efectos sobre el crecimiento y la muerte celular se correlacionaron con el incremento en bases esfingoideas libres y la disminución de los esfingolípidos complejos. En este estudio se concluyó que tanto el incremento en bases esfingoideas, como la disminución en esfingolípidos complejos contribuyen a la inhibición del crecimiento celular y a la citoletalidad de la FB₁ (Yoo *et al.* 1996).

Estos estudios indicaron que un objetivo molecular importante de la acción de la FB₁ en animales y en plantas es la inhibición de la actividad de la esfinganina/esfingosina N-acil transferasa.

2. La FB₁ en relación con las vías de transducción de señales

Uno de los elementos importantes en la transducción de señales que es afectado por la FB₁ es la proteína cinasa C (PKC). La FB₁ activa catalíticamente a la PKC en rebanadas de corteza cerebral de rata en una manera similar a la del forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), éster de forbol que es promotor de tumores y es análogo estructural del diacil glicerol. Cuando se añadió la FB₁ *in vitro* a rebanadas de corteza cerebral, esta toxina facilitó la translocación de PKC desde el citosol a la membrana en una manera similar a la del PMA, y este efecto fue dependiente de la concentración de la toxina (1-1000 nM). Estos resultados sugirieron que la FB₁ estaba interactuando con PKC en el mismo sitio de unión de la enzima con el éster de forbol (Yeung *et al.* 1996). También se ha demostrado en células epiteliales de bronquios humanos que la FB₁ (10 μM)

incrementa la translocación de PKC (proteína cinasa C) y estimula a una MAPK (mitogen activated protein kinase), además de que estimula la actividad de la PLA2 (fosfolipasa A2), aumentando la liberación de ácido araquidónico (AA). Es interesante que la activación producida por la FB₁ en esta PLA2 es un proceso de dos etapas: la primera es la fosforilación de cPLA2 por la MAPK y la segunda es una consecuencia del incremento en esfinganina y esfingosina dentro y fuera de las células, ya que es conocido que la esfingosina induce un aumento en calcio libre intracelular. Esto sugiere que la acción de la FB₁ depende parcialmente de la acción de PLA2 sobre las enzimas involucradas en el ciclo celular, como MAPK y PKC, y sobre ácidos grasos bioactivos, como prostaglandinas y leucotrienos (derivados del ácido araquidónico), además del efecto de la toxina en la interrupción del metabolismo de esfingolípidos (Pinelli *et al.* 1999).

In vitro se ha demostrado que la FB₁ inhibe la actividad de las fosfatasa de serina/treonina (PPs) (PP1, PP2A, PP2B, PP2C y PP5/T/IK/H) con valores de IC₅₀ de 80 μM-3000 μM. De estas fosfatasa, PP5 fue la más sensible con una IC₅₀ de 80 μM. Estos valores son muy altos comparados con un inhibidor específico de este tipo de actividades como el ácido okadaico, que inhibe en el intervalo nanomolar (IC₅₀ para PP5 de 3 nM). Tal acción se ha asociado con la actividad potenciadora y promotora de tumores cancerosos en ratas y ratones por esta toxina (Fukuda *et al.* 1996).

En las plantas, específicamente en protoplastos de *Arabidopsis*, se ha observado que la FB₁ induce muerte celular programada. Este efecto puede estar mediado por una cascada de señalización que involucra la producción de ácido salicílico precedida por la producción de especies reactivas de oxígeno (potenciada por la presencia de luz). Además de la producción de ácido salicílico, parece que también se necesita la producción de jasmonato y etileno junto con las respuestas desencadenadas por sus respectivas cascadas de transducción de señales (Asai *et al.* 2000).

3. La FB₁ y los componentes de la membrana plasmática

En *Datura stramonium* (toloache), se había observado que tanto en luz como en oscuridad, 1041 μM de FB₁ producía un incremento en la fuga de electrolitos, si bien ésta descendía a menos de la mitad en la oscuridad. Al exponer hojas de toloache a la FB₁ a una concentración de 694 μM, se observó daño ultraestructural en las células en empalizada del mesófilo, comenzando a las 6 horas e intensificándose a las 12 horas de exposición a la toxina. La degeneración del citoplasma y el colapso de cloroplastos indicaban que esta toxina tiene como objetivo primario la membrana plasmática o el tonoplasto. Sin embargo, esto también podría deberse a la inhibición del metabolismo de

esfingolípidos, que son componentes principales de la membrana plasmática, lo que podría ocasionar deterioro o disfunción membranal (Abbas *et al.* 1992).

Por ejemplo, en las células Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano), usando a la FB₁ para inhibir la biosíntesis de esfingolípidos, se demostró que el transporte de 5-metiltetrahidrofolato (derivado monocarbonado de tetrahidrofolato, un folato reducido, enzimáticamente activo), mediado por el receptor de folato, se bloqueaba casi completamente (90%), y que ésto estaba relacionado con una disminución de esfingolípidos en un 40% por acción de la FB₁ (Stevens y Tang, 1997). Este receptor de folato, es una proteína anclada a través de gliosilfosfatidilinositol a microdominios membranales insolubles en Tritón X-100 a temperatura baja y que están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Se ha demostrado que la toma de folato por este receptor es inhibida también por la disminución del colesterol celular (Chang *et al.* 1993).

De hecho, la FB₁ interrumpe la función de barrera de las células endoteliales, aumentando al doble la velocidad de transferencia de albúmina a través de monocapas (Ramamy *et al.* 1995), por lo que los autores propusieron que los efectos de esta micotoxina pudieran cambiar la respuesta de la célula a estímulos externos, modificando el enlace de proteínas, receptores o enzimas involucradas en las diferentes vías de transducción de señales.

Hay evidencias de que en membranas modelo, la FB₁ incrementa la velocidad de oxidación de los ácidos grasos de lípidos de la bicapa, además de promover la producción de intermediarios de radicales libres y acelerar las reacciones en cadena de la peroxidación de los lípidos que forman estas membranas (Yin *et al.* 1998). En estas membranas modelo, se ha observado que la FB₁ perturba la región cercana a la superficie membranal en la fase fluida de la membrana y tiene un efecto mínimo cerca del centro membranal. A temperaturas fisiológicas, en la fase fluida, la región cercana a la superficie de las membranas es interrumpida y despliega un incremento pronunciado en la permeabilidad del oxígeno, tanto para membranas de L- α -dimiristoilfosfatidilcolina, como para membranas de fosfatidilcolina de yema de huevo (Yin *et al.* 1996). En conclusión, la FB₁ perturba relaciones complejas en la estructura membranal lipídica y que se puede manifestar de manera gruesa en cambios de permeabilidad.

En macrófagos, la FB₁ (1-10 μ M) mejora la fluidez de la membrana plasmática e incrementa la endocitosis de la peroxidasa de rábano, además de que induce un daño peroxidativo evidente por el aumento de la producción de malondialdehído (MDA, producto de la peroxidación de lípidos) (Ferrante *et al.* 2002). El daño membranal causado por la peroxidación lipídica puede contribuir al daño oxidativo del DNA, lo cual ha sido

implicado en el proceso de carcinogénesis en células de riñón de mono (Abado-Becognee *et al.* 1998).

Todos estos datos en la literatura señalan claras acciones de la FB₁ sobre los componentes de la membrana plasmática. Un modelo que se ha postulado para explicar la interacción molecular de la toxina con la membrana ha sido el derivado de su asociación con el colesterol (uno de los componentes más importantes de la membrana plasmática), basado en la observación de que la FB₁ (7.5-20 μM) incrementaba la tensión superficial de una capa monomolecular de colesterol en la interfase agua-aire, lo cual sugería una interacción específica entre la FB₁ y el colesterol. Esta interacción parece estar dada por la interacción del grupo amino protonado (pK_a 9.0-9.5) de la FB₁ con el grupo OH del colesterol a través de un puente de hidrógeno. Por este resultado y estudios de modelaje molecular, los autores sugirieron que la FB₁ se puede intercalar entre dos moléculas de colesterol, incrementando así la tensión superficial de la monocapa (Mahfoud *et al.* 2002).

IV. LA ATPasa de H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE PLANTAS

1. Estructura de la ATPasa de H⁺

La membrana plasmática de las células vegetales es una bicapa lipídica que rodea la célula con una permeabilidad selectiva a solutos como iones y moléculas polares, cuyo transporte del medio interno al apoplasto se realiza por proteínas transportadoras específicas localizadas en la membrana plasmática. Por ello, las células contienen en su membrana plasmática: 1) un gran número de proteínas formadoras de canales o acarreadoras (simportadores, si los nutrientes se cotransportan con H⁺ en la misma dirección, antiportadores, si los nutrientes y H⁺ son cotransportados en direcciones opuestas y uniportadores, si los nutrientes son la especie única transportada por la proteína) y 2) grandes cantidades de la ATPasa de H⁺, una bomba de protones. La bomba de protones exporta H⁺ del citoplasma al apoplasto a expensas de la energía derivada de la hidrólisis de ATP que ella misma realiza. Esta es la bomba que es responsable de la formación del gradiente electroquímico transmembranal (Palmgren, 2001; Arango *et al.* 2003).

Las principales bombas de iones en las plantas y hongos son las ATPasas membranales. En los animales, esta enzima no se encuentra, pero la enzima equivalente es la ATPasa de Na⁺/K⁺, la cual está ausente en plantas. Sin embargo, ambos tipos de bombas pertenecen a la superfamilia de ATPasas tipo P (Axelsen y Palmgren, 1998; Kuhlbrandt, 2004). Las bombas tipo P se caracterizan por formar un intermediario fosforilado (aspartil-fosfato) en el ciclo catalítico, por lo que la ATPasa de H⁺ difiere de otro

tipo de bombas en la célula de la planta incluyendo a la ATPasa de protones vacuolar, que energiza la membrana vacuolar. Las ATPasas tipo P pueden formar complejos de heterosubunidades tales como la ATPasa de Na^+/K^+ y de H^+/K^+ , las cuales están compuestas por una subunidad catalítica α y una subunidad glucosilada β o pueden comprender sólo una subunidad, como las ATPasas de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y de la membrana plasmática y como la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en plantas y hongos. Sin embargo todas ellas comparten una subunidad catalítica de aproximadamente 100 kDa. La unidad funcional de la ATPasa de H^+ de plantas es el monómero, aunque hay evidencias que sugieren que puede estar organizada en la membrana como dímero o en oligómeros, por lo cual la estructura cuaternaria *in situ* de la ATPasa de H^+ es una cuestión abierta (Bowman *et al.* 1985, Goormaghtigh *et al.* 1986).

A diferencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, provista con dos genes de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (Serrano *et al.* 1986), en las plantas hay más isoformas. Se ha demostrado en *Nicotiana plumbaginifolia* y *Arabidopsis thaliana* que varias de ellas se encuentran exclusivamente en la membrana plasmática de la célula y no en endomembranas (Lefebvre *et al.* 2004). Los genomas de la dicotiledónea *A. thaliana* y la monocotiledónea arroz, *Oryza sativa* han sido secuenciados, resultando en la identificación de 11 y 10 isoformas de la ATPasa de H^+ , respectivamente (Baxter *et al.* 2003). La expresión de estas isoformas es específica del tejido y del estadio de desarrollo de la planta, lo que pone en relieve la importancia de la enzima en la fisiología de la planta (Parets-Soler *et al.* 1990; Villalba *et al.* 1991; Samuels *et al.* 1992).

Los análisis de hidropatía de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas han proporcionado diferentes modelos que predicen de ocho a doce segmentos transmembranales de aproximadamente 20 aminoácidos cada uno, que podrían formar α -hélices transmembranales (Fig. 4) (Michelet *et al.* 1989). Éstos delimitan trechos hidrofílicos que constituyen aproximadamente el 80% de la proteína. Información adicional sobre los dominios transmembranales proviene principalmente de estudios de modelaje de la ATPasa de H^+ realizados sobre las estructuras cristalográficas de las ATPasa de Ca^{2+} y de Na^+/K^+ , en las que los trechos transmembranales 4, 5 y 6 parecen estar implicados en el transporte del catión (MacLennan *et al.* 1997, Jorgensen *et al.* 1998). El mecanismo para el transporte de H^+ aún no se ha determinado. Se ha predicho que sólo el 7% de la proteína está expuesta en la cara exterior de la membrana plasmática y que el resto, una gran región hidrofílica intermedia de la estructura primaria, tiene localización citoplásmica, al igual que los extremos amino y carboxilo (Wach *et al.* 1992). El asa citoplásmica grande contiene el residuo de aspartato que es fosforilado durante el ciclo

catalítico y el dominio de enlace para ATP (Briskin *et al.* 1983; Pardo *et al.* 1988). Se ha observado que este asa es esencial para la conducción de la proteína desde el Golgi hasta la membrana plasmática (Lefebvre *et al.* 2004). La función específica de la región amino terminal de la ATPasa de H⁺ tampoco se conoce. La pequeña asa citoplásmica correspondiente a la ATPasa de Na⁺/K⁺ y Ca²⁺, podría estar implicada en los cambios conformacionales durante el ciclo catalítico (Lutsenko *et al.* 1994). La región del carboxilo terminal tiene una función reguladora en levadura y en plantas, actuando como un dominio autoinhibitorio (Palmgren *et al.* 1990, 1991; Eraso y Portillo, 1994).

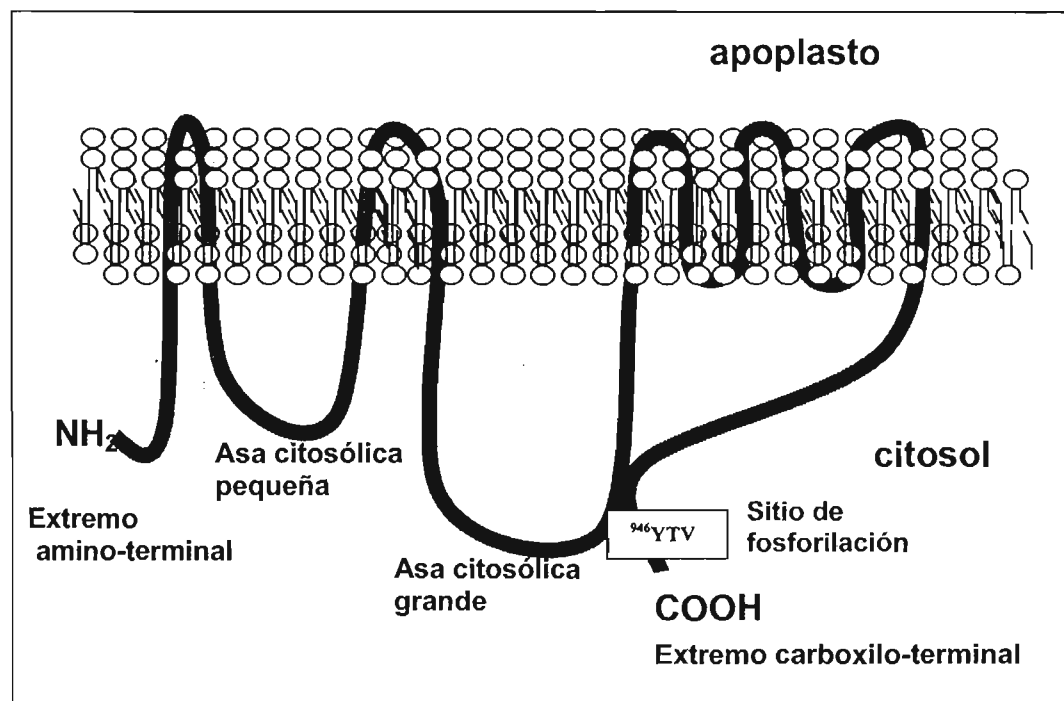


Fig. 4. Topología de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática según su perfil hidropático (modificada de Arango *et al.* 2003).

El sustrato para la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es el MgATP. En plantas, la K_m para MgATP varía entre 0.3 y 1.4 mM y el pH óptimo está alrededor de 6.6. La actividad específica en membranas purificadas de diferentes especies y tejidos se encuentra en el intervalo de 1-2 μmol Pi/min/mg, aunque se han reportado actividades fuera de este intervalo, como la reportada en la planta acuática *Vallisneria gigantea*, de 6.74 ± 0.80 μmol Pi/h/mg (Harada *et al.* 2002) y las de dos líneas isogénicas de cebada, cuyas VMP presentaban actividades de 0.184 y 0.171 μmol Pi/min/mg (Wevelsiep *et al.* 1993). Por otra parte, altas actividades como la de membranas plasmáticas de arroz

(2.548 $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$), se han reportado en presencia de Brij 58 al 0.02% (Batoko *et al.* 1998).

Se ha observado que varios compuestos afectan la actividad de esta enzima, como en el caso de toxinas (lo cual se discutirá en una sección introductoria posterior), de hormonas como las auxinas y de lípidos entre otros. Las auxinas aumentan la actividad de la enzima (Altabella *et al.* 1990), probablemente a través de la inducción de la expresión de genes de isoformas específicas (Frias *et al.* 1996). La lisofosfatidilcolina, (producto de ruptura de la fosfatidilcolina producida por la fosfolipasa A_2) incrementa la V_{max} , disminuyendo la K_m aparente y desplazando el pH óptimo (Palmgren *et al.* 1991). El colesterol y el estigmasterol estimulan la actividad de la enzima *in vitro*, mientras que otros esteroides la inhiben (Grandmougin-Ferjani *et al.* 1997).

Aunque no se ha encontrado que los esfingolípidos regulen la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas, se ha observado que concentraciones de 25 -100 μM de esfingosina inhiben a otra ATPasa tipo P, la ATPasa de Ca^{2+} , en microsomas de células de páncreas de rata (Pandol *et al.* 1994). La ATPasa de Na^+/K^+ de sinaptosomas de cerebro de rata y de eritrocitos de humano es inhibida por la esfingosina a concentraciones de 10 - 40 μM (Oishi *et al.* 1990).

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es regulada fisiológicamente por la luz azul. La luz azul es absorbida por receptores de la luz azul con actividad de cinasa (Kinoshita *et al.* 2001). En esta activación se fosforila a la ATPasa en el penúltimo residuo de treonina (^{947}T) y posteriormente se asocian proteínas 14-3-3 a ésta, lo cual aumenta la actividad de la ATPasa de H^+ . Se ha observado que al iluminar hojas de *V. gigantea* con luz roja, la K_m de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática disminuye, lo cual podría llevar a un incremento del componente electrogénico de hiperpolarización de la membrana y que estaría causado por la iluminación durante el proceso fotosintético (Harada *et al.* 2002).

2. Papeles fisiológicos de la ATPasa de H^+

Cualquier nutriente que se encuentre en el suelo debe hacer contacto con la raíz para entrar a la planta. Una vez ingresados al apoplasto, los nutrientes tienen que pasar a través de la membrana plasmática para ser transportados por el xilema. El transporte membranal es decisivo para la toma selectiva de nutrientes y el rechazo de iones tóxicos del ambiente. En la raíz, la endodermis tiene una función clave en la toma selectiva de nutrientes, lo cual es indicado por la presencia de altas cantidades de ATPasa de H^+ en la membrana plasmática, detectada por métodos inmunocitoquímicos (Parets-Soler *et al.*

1990). Los pelos radiculares, que sirven para incrementar el área de la interfase planta-suelo, generan grandes corrientes de H^+ a su alrededor. Estas corrientes pueden ser generadas por la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. En apoyo a esta hipótesis se ha inmunodetectado una gran concentración de ATPasa de H^+ en estas estructuras (Samuels *et al.* 1992; Janh *et al.* 1998). La enzima también puede estar implicada en la reabsorción de nutrientes desde el xilema y en la carga y descarga de nutrientes desde el floema. Esto es apoyado por la evidencia de cantidades abundantes de ATPasa de H^+ en el floema de *Arabidopsis thaliana* (Parets-Soler *et al.* 1990; Dewitt y Sussman, 1995).

Se ha propuesto que la ATPasa de H^+ pudiera estar implicada en la regulación o los cambios del pH intracelular. Cuando se acidifica el citosol se activaría la ATPasa de H^+ , aumentando la extrusión de protones, ya que se ha observado que el pH interno es mantenido constante a 7.5, y el pH óptimo de la enzima está por debajo de 7.0 (Kurkdjian y Guern, 1989). De acuerdo con la teoría del crecimiento ácido, la acidificación del apoplasto conduce a un proceso de ablandamiento de la pared celular y a la hiperpolarización de la membrana plasmática, induciendo una toma de K^+ . La toma de K^+ promueve cambios osmóticos, permitiendo el influjo de agua por acuaporinas de la membrana plasmática, lo cual favorece la elongación celular (Maurel, 1997):

Para la apertura de los estomas se requiere la acumulación de K^+ en las células guarda. Esta acumulación está dirigida por un potencial negativo en la cara interna de la membrana plasmática que es creado por ATPasas de H^+ . La fusicoccina (FC), una toxina fúngica producida por *Fusicoccum amygdali*, causa activación irreversible de la ATPasa de H^+ en células guarda y por tanto una apertura irreversible de estomas, lo cual resulta en el marchitamiento de las hojas y eventualmente en la muerte de la planta (Marrè, 1979).

Durante la germinación, las semillas movilizan la energía almacenada en moléculas como grasas, polisacáridos y proteínas que se encuentran en el endospermo y que son liberadas en forma de monómeros al apoplasto, de donde tienen que ser transportadas al floema del cotiledón joven. El papel de la ATPasa en este proceso está relacionado con la producción de un gradiente de H^+ , el cual es utilizado por el simportador H^+ /sacarosa y otros sistemas de transporte secundario (Williams *et al.* 2000).

3. La ATPasa de H^+ y las toxinas microbianas

La ATPasa de H^+ tiene un dominio carboxilo terminal auto-inhibitorio cuya pérdida por acción de la tripsina conduce a una activación de la enzima. La fitotoxina FC es un poderoso activador de la ATPasa de la membrana plasmática que induce una modificación conformacional de la enzima, desplazando la región del carboxilo terminal.

Cuando la fusicocina se enlaza a su proteína receptora se produce una fuerte activación de la ATPasa de H^+ . La proteína receptora de FC es una proteína de la familia de las proteínas 14-3-3, involucradas en vías de transducción de señales y en la regulación del ciclo celular en varios tipos celulares de eucariontes. Se ha demostrado que la unión de la FC a la proteína receptora 14-3-3 induce un aumento en la asociación con la ATPasa de H^+ (De Michaelis *et al.* 1996, Olivari *et al.* 1998; Rasi-Caldogno *et al.* 1993). En general, la interacción regulatoria de las proteínas 14-3-3 se induce por la fosforilación de residuos de Ser o Thr en la proteína blanco. En *Arabidopsis* se ha encontrado que el enlace de la proteína 14-3-3 con la ATPasa se realiza en la secuencia de aminoácidos ⁹⁴⁶YTV del carboxilo terminal de la ATPasa. En ausencia de la fusicoccina, la unión de la proteína 14-3-3 depende de la fosforilación de la Thr 947 de la enzima y en presencia de la toxina, la unión es independiente de la fosforilación (Svennelid *et al.* 1999). Por otro lado se ha observado que los inhibidores de las fosfatasa de tirosina impiden la activación de la ATPasa inducida por fusicoccina, así como la asociación de proteínas 14-3-3 a la ATPasa de H^+ , pero la activación se recupera cuando se agrega exógenamente proteína 14-3-3 (no fosforilada en residuos de tirosina), lo cual sugiere que es necesario un estado desfosforilado de tirosinas para la asociación entre las proteínas 14-3-3 y la ATPasa de H^+ (Olivari *et al.* 2000) (Fig. 5) .

Las toxinas producidas por *Pseudomonas fuscovaginae* como la siringotoxina y las fuscopeptinas A y B y por *Pseudomonas syringae* como la siringomicina producen inhibición de la actividad de la ATPasa de H^+ de arroz. Es interesante que la siringotoxina y su análoga la siringomicina tienen un efecto dual sobre la actividad de la enzima: a bajas concentraciones estas toxinas estimulan la actividad de ATPasa en vesículas que contienen a la enzima con el sitio catalítico de la ATPasa hacia el interior de la vesícula, mientras que cuando estas membranas quedan con el sitio catalítico de la enzima expuesto (son tratadas previamente con Brij 58), se inhibe la actividad de la enzima aún a bajas concentraciones de las toxinas (Batoko *et al.* 1998).

Con respecto a las toxinas fúngicas, dos péptidos producidos por el hongo *Rhynchosporium secalis* que inducen necrosis en cebada, activan a la ATPasa de H^+ (Wevelsiep *et al.* 1993). También las toxinas producidas por el hongo *Cercospora beticola* modifican la actividad de esta enzima. Por ejemplo, la beticolina 1 inhibe desde concentraciones micro molares la actividad de la ATPasa H^+ . Esta enzima purificada y solubilizada presenta una cinética de inhibición por beticolina 1 del tipo no-competitivo. Sin embargo, esta misma toxina inhibe a la ATPasa competitivamente cuando la enzima purificada se inserta en liposomas, sugiriendo que la cinética de inhibición de la enzima

por esta toxina depende del ambiente lipídico que rodea a la proteína (Simon-Plas *et al.* 1996).

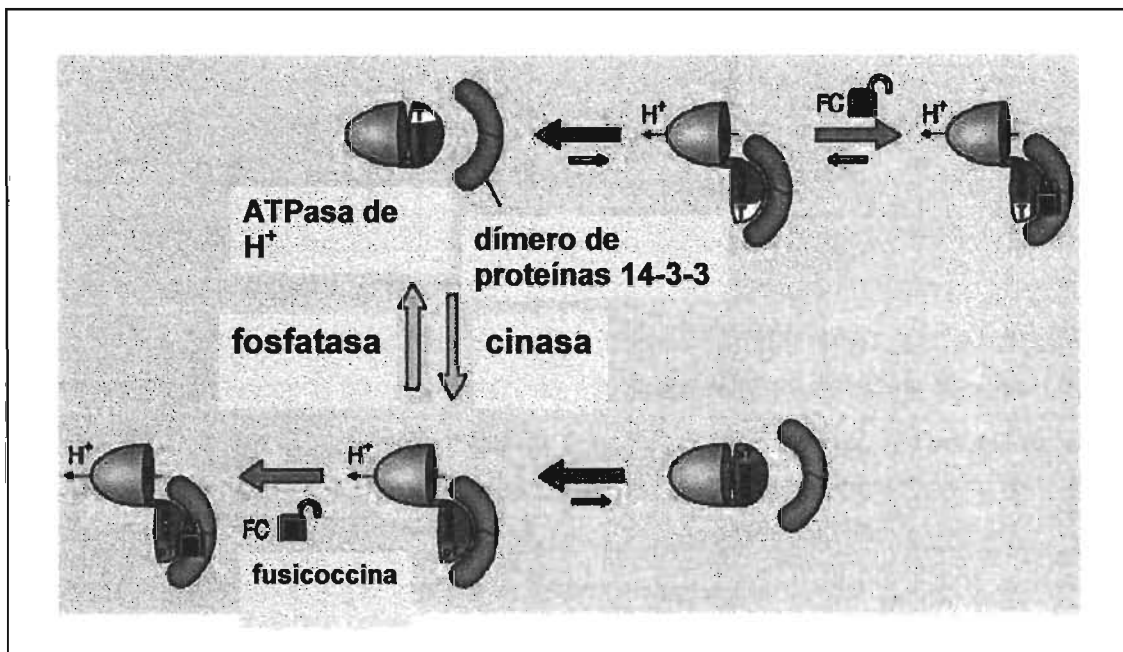


Fig. 5. Modelo propuesto para la regulación de la ATPasa de H^+ por las proteínas 14-3-3 y fusicoccina (FC). La ATPasa es regulada por un cambio en el estado de fosforilación de su penúltimo residuo de treonina ($^{947}T \circ$) en el carboxilo terminal. Cuando este residuo es fosforilado ($pT \bullet$) se incrementa la afinidad hacia las proteínas 14-3-3. La FC se enlaza a este complejo formado *in vivo*, estabilizando la enzima en su estado activado. Además en presencia de FC, la fosforilación del sitio de enlace no es necesaria (parte superior de la figura). FC favorece el equilibrio hacia la asociación de la proteína 14-3-3 con la ATPasa de H^+ (www.uni-tuebingen.de/plantphys/Oecking).

4. La ATPasa de H^+ y las respuestas de defensa contra patógenos

Se ha propuesto que una forma en que la planta enfrenta los efectos del estrés abiótico (salino, hídrico y metales) es a través de ajustes en la cantidad y/o actividad de proteínas como ATPasas que transportan H^+ , los canales iónicos y los transportadores, que aseguran el funcionamiento membranal en los compartimentos celulares, la homeostasis iónica y de pH (Niu *et al.* 1993). Como se ha descrito en la sección anterior, la actividad de la ATPasa se modifica por toxinas o evocadores producidos por patógenos que infectan a la planta lo cual puede llevar a un efecto dañino para la célula o, como se ha mostrado en algunos casos, a la prevención de la infección. La resistencia a patógenos fúngicos depende de la habilidad de la planta para reconocer al patógeno tempranamente en el proceso de infección. Este reconocimiento permite la expresión de una serie de respuestas de defensa, incluyendo cambios estructurales en la pared celular que pueden restringir al patógeno al sitio de infección, y la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas y compuestos antifúngicos que pueden detener el crecimiento del patógeno. El

reconocimiento de los evocadores fúngicos por los receptores de la membrana plasmática de la célula hospedera es considerado uno de los eventos más importantes que llevan a la activación exitosa de mecanismos de defensa (Keen, 1990). Estudios realizados en tomate sugirieron que los estimuladores fúngicos del patógeno *Cladosporium fulvum* eran reconocidos por un receptor en la membrana plasmática de células de tomate resultando en la inducción de la señal de la defensa contra el patógeno. Una de las respuestas observadas fue la rápida desfosforilación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática mediada por fosfatasas, dando como resultado un incremento de la actividad de la enzima y la acidificación del medio extracelular (Vera-Estrella *et al.* 1994a, 1994b). Sin embargo, se ha observado que esa desfosforilación es reversible, ya que después de la desfosforilación inicial de la ATPasa, a 1 o 2 horas después del tratamiento con el estimulador hay refosforilación de la enzima. Esta refosforilación sólo se ha observado *in vivo* pero *no in vitro*, utilizando vesículas de membrana plasmática aisladas, lo que sugiere que esta refosforilación es catalizada por una cinasa citosólica que se pudiera asociar a la membrana, como la proteína cinasa C. A tiempos posteriores, este proceso continúa por la acción de otra cinasa que es dependiente de Ca²⁺ (Xing *et al.* 1996). Es razonable esperar que la desfosforilación inicial se revierta, ya que varios procesos como el transporte de solutos y la regulación de pH intracelular dependen de la actividad de esta enzima. La desfosforilación inicial, que incrementa la actividad de la enzima, llevaría a la iniciación de los mecanismos de la defensa contra el patógeno, sin embargo la refosforilación de la enzima permitiría que los procesos que son dependientes de la actividad de la ATPasa en la célula no se vieran relativamente afectados (Xing *et al.* 1996). Oeking y Schaller (1999) observaron que al tratar células de tomate con sistemina (un mediador proteico en la respuesta de defensa en herida), el medio de crecimiento de estas células se alcalinizaba, mientras que al tratar las células con fusicoccina se acidificaba el medio de crecimiento de éstas. La alcalinización producida por sistemina y otros inhibidores de la actividad de la ATPasa de H⁺ correlacionaba con la inducción de genes de defensa contra herida, mientras que la fusicoccina suprimió la inducción de los genes de defensa contra herida producida por sistemina, activando la expresión de genes relacionados con la defensa contra patógenos. Los autores sugirieron que las dos vías de señalización para la defensa que llevan a la producción de proteínas de respuesta a herida o a patógenos son reguladas diferencialmente por la inhibición o activación de la ATPasa de H⁺ respectivamente, postulando que la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática sirve como un interruptor en la célula que enciende diferencialmente las vías de señalización que llevan a la defensa contra herida o contra un patógeno a través de su

capacidad generadora de un gradiente eléctrico y de pH que influencia flujos transmembranales de iones.

V. LOS ESFINGOLÍPIDOS Y LAS RESPUESTAS DE DEFENSA CONTRA PATÓGENOS EN PLANTAS

Un nuevo campo sobre las funciones de los esfingolípidos comprende las interacciones planta-patógeno. Varias reportes han mostrado que ciertos cerebrósidos aislados de hongos, anélidos y plantas estimulan la formación del cuerpo fructífero de *Schizophyllum commune*, un hongo involucrado en la degradación de la madera. Como ejemplo, las glucoceramidas activas del grano de trigo consisten de amidas con ácidos grasos C16 o C18 α -hidroxilados unidos a (4E,8Z)-esfinga-4,8-dienina ó (Z)-esfinga-8-enina. La hidrogenación de la glucoceramida que contiene (Z)-esfinga-8-enina mostró que el efecto estimulador de los cerebrósidos dependía de la presencia del doble enlace $\Delta 8$ (Kawai *et al.* 1986).

Estudios más recientes mostraron que los cerebrósidos fúngicos funcionaban como evocadores causando la muerte celular de la respuesta de hipersensibilidad, la acumulación de fitoalexinas y el incremento en la resistencia de la planta a infecciones subsecuentes por patógenos compatibles (Koga *et al.* 1998). Se ha encontrado que los cerebrósidos A y C aislados del hongo *Magnaphorte grisea* tienen actividad de evocadores induciendo la producción de fitoalexinas en arroz y de proteínas relacionadas con la patogénesis, estos evocadores tienen un grupo amida en grupos (3E)-2-hidroxihexadec-3-enoil ó (3)-2-hidroxiocetadec-3-enoil enlazados a (4E, 8E)-9-metil-esfinga-4,8-dienina (Koga *et al.* 1998). Cuando se preparó ceramida a partir de estos cerebrósidos, eliminando los residuos de glucosa, y posteriormente aplicándola a las plantas de arroz, se observó que la ceramida presentó por sí misma actividad evocadora. La aplicación de cerebrósidos a plantas de arroz las protegió contra la infección por *M. grisea*. En cultivos de células en suspensión de arroz, la actividad estimuladora de estos cerebrósidos fue mayor que la de otras moléculas como el ácido jasmónico y un oligómero de la quitina. Sin embargo, cuando se añadieron simultáneamente el oligómero de quitina y los cerebrósidos se presentó un efecto sinérgico en la respuesta estimuladora (Uemura *et al.* 2000, 2002). Es interesante que la hidrogenación del doble enlace $\Delta 8$ -(E) en la base esfingoidea de cadena larga o del doble enlace $\Delta 3$ -(E) en la parte del ácido graso de la amida del cerebrósido, no alteró la actividad evocadora, mientras que el doble enlace $\Delta 4$ -(E) de la base de cadena larga y el grupo metilo en C-9 fueron esenciales para la actividad evocadora. El grupo de glucosa no fue crucial, porque la ceramida libre

también mostró actividad evocadora aunque con efectividad reducida. La importancia del doble enlace en la formación del cuerpo fructífero fúngico o la del doble enlace y el grupo metilo en la respuesta de hipersensibilidad a fitopatógenos indica que algunas modificaciones estructurales de las bases de cadena larga contribuyen a diferentes respuestas celulares en interacciones planta-patógeno. La observación de que se incrementaba la expresión del gene de la serina palmitoil transferasa durante la respuesta de hipersensibilidad de plantas de papa resistente al tizón tardío a *Phytophthora infestans*, también señala la intervención de esfingolípidos en la patogénesis (Birch *et al.* 1999).

Existe evidencia adicional sobre la intervención de los esfingolípidos en estos procesos de defensa, por la demostración de que el gen IPT1 que codifica a la manosa-(inositol-fosfato)₂-ceramida sintetasa determina la sensibilidad de *S. cerevisiae* a una defensina antifúngica de la planta (Thevissen *et al.* 2000). Los resultados de este estudio apoyan el modelo en el que las balsas de lípidos de la membrana plasmática de la levadura que contienen glucosil-inositol-fosforilceramida pueden actuar como sitios de unión para defensinas de plantas o de reclutamiento de proteínas asociadas a membrana que interactúan con estos péptidos antimicrobianos. La interacción en estos sitios haría posible que las defensinas de la planta se insertaran en la membrana plasmática de una hifa fúngica conduciendo a la permeabilización de la membrana y a la elongación reducida de la hifa. Esto último es algo similar a lo que se ha encontrado en animales. En las membranas animales muchos componentes de la maquinaria de señalización de la membrana plasmática se encuentran en estos microdominios membranales enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, los llamados caveolas o balsas, los cuales pueden originarse de la miscibilidad diferencial de los lípidos que forman la membrana. Se piensa que la transducción de la señal a través de la membrana plasmática procede dentro de la caveola y puede ser influenciada por gangliósidos (Huwiler *et al.* 2000). Observaciones recientes sugieren que estructuras como las caveolas, las balsas de lípidos o los microdominios lipídicos son fases lipídicas ordenadas que están en un equilibrio dinámico con el ambiente membranal menos ordenado y que pueden ser alargadas y/o estabilizadas por enlaces cruzados, mediados por proteínas, de los componentes asociados a las balsas (Mongrand *et al.* 2004, Borner *et al.* 2005) Algunos patógenos usan estos dominios de balsas como plataformas de señalización y/o sitios de entrada hacia la célula (Van der Goot y Harder, 2001). Tal es el caso del virus del simio de bosque (Nieva *et al.* 1994; Phalen y Kielian, 1991), el virus SV40 (Stang *et al.* 1997) y de *Escherichia coli* (Baorto *et al.* 1997). Hay evidencia que sugiere que las toxinas aerolisina, del cólera y Shiga entran a las células de mamíferos vía balsas de lípidos (Tran *et al.* 1987; Abrami *et al.* 1999; Sandvig *et al.* 1996).

En plantas, específicamente en *A. thaliana* y *N. tabacum*, se han encontrado este tipo de dominios enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Se ha observado que están enriquecidos en proteínas específicas, entre ellas ATPasas de H⁺ de la membrana plasmática, proteínas 14-3-3 y proteínas relacionadas con respuesta de defensas contra patógenos. Se ha propuesto que estos dominios podrían tener un papel similar a las balsas de colesterol y esfingolípidos encontrados en animales, constituyendo plataformas de entrada de patógenos o de señalización para despertar la respuesta de defensa contra ellos (Mongrand *et al.* 2004, Borner *et al.* 2005).

Estos datos sugieren que ciertos esfingolípidos pueden estar asociados a respuestas de defensa, si bien la identidad de ellos y los mecanismos subyacentes no están completamente claros. El ejemplo que mejor se ha estudiado a este respecto es la ceramida.

Hay evidencias que apoyan la hipótesis de que diversos tipos de estrés en células animales generan ceramida, la cual actúa como segundo mensajero para activar vías de transducción de la señal intracelularmente. Dependiendo del tipo de estrés y del tipo celular, estas vías pueden producir arresto del ciclo celular, apoptosis o senescencia (Dickson, 1999). Hannun ha sugerido que la ceramida puede funcionar en un sentido más extenso, no simplemente como un segundo mensajero, sino como un componente de un biostato que mide e inicia las respuestas celulares al estrés. Esta sugerencia es hecha por dos razones. La primera es que a diferencia de muchos segundos mensajeros tales como el adenosin-3',5'-monofosfato (cAMP), la ceramida es un intermediario esencial en la síntesis de esfingolípidos. Segundo, los cambios en su concentración ocurren en tiempos largos, en el orden de horas, más que en tiempos cortos, en el orden de segundos o minutos, como se ha visto con cAMP y con muchos otros segundos mensajeros (Hannun, 1996).

La ceramida es un activador de la cascada de MAPKs en diferentes tipos celulares (Huwiler *et al.* 2000). En plantas se ha observado que las células responden a evocadores microbianos a través de cambios en el estado de fosforilación de proteínas (Dietrich *et al.* 1990; Felix *et al.* 1991). En células de tabaco se ha demostrado que al ser tratadas con un evocador fúngico derivado de la pared celular de *Phytophthora infestans*, se activa una proteína cinasa la cual tiene propiedades de MAPK (Suzuki y Shinshi 1995). En estas respuestas a estimuladores microbianos podrían estar implicados cambios en los niveles de ceramida como señal para la activación de MAPK. Además se ha observado que la esfingosina inhibe a la proteína cinasa C (PKC), por lo que no se puede descartar que los cambios en los niveles de bases esfingoideas como esfinganina promuevan cambios en

las actividades de cinasas y/o fosfatasas en respuesta a la infección por patógenos en plantas (Oishi *et al.* 1990).

Como puede verse, los esfingolípidos pueden estar implicados en respuestas de defensa contra patógenos a través de dos mecanismos fundamentalmente: como componentes membranales que interaccionan con patógenos o como componentes de vías de transducción de señales encendidos por la presencia de patógenos.

5 La Membrana Plasmática y su Importancia durante la Patogénesis en Plantas

NORA GUTIÉRREZ NÁJERA, CONSUELO ENRÍQUEZ
ARREDONDO, FRANCISCO JAVIER GARIBAY, SILVIA
PALACIOS BAHENA Y MARINA GAVILANES RUÍZ

Depto. de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

e-mail: noraan74@yahoo.com, gavilan@servidor.unam.mx.

El estudio de las interacciones entre plantas y patógenos es de gran importancia, pues tiene impacto en la producción agrícola y por lo tanto en la economía de la población humana. Sin embargo, desde el punto de vista de la agricultura y la biología, es un área fascinante que en los años recientes ha comenzado a examinarse con estrategias moleculares.

Una etapa fundamental en la infección de los tejidos de una planta, es la llegada del patógeno, o de sus productos, a la frontera de la célula vegetal hospedera, constituida por la membrana plasmática o plasmalema. La membrana plasmática de las células vegetales es una estructura continua y dinámica cuyos componentes, lípidos y proteínas, juegan papeles fundamentales en la interacción planta-patógeno, debido a su localización celular. Esto es importante durante las etapas iniciales de una infección por un patógeno, cuando la planta tiene que prepararse para la respuesta de defensa, desplegando una serie de estrategias de cuyo éxito depende la sobrevivencia de la planta. La acción del patógeno implica el desarrollo de estructuras invasivas y la producción de moléculas como toxinas, enzimas digestivas, proteínas permeabilizantes, etc., mismas que tendrán un efecto deletéreo en la célula hospedera. A su vez, la respuesta de defensa de la célula vegetal hospedera incluirá la formación de sustancias que le confieren resistencia mecánica, moléculas oxidativas y proteínas específicamente relacionadas con la patogénesis. Para que esta respuesta de defensa sea orquestada, se requieren de vías especiales cuyos componentes actúan en un orden específico. Estas vías contienen los grandes segmentos: membrana plasmática-núcleo-membrana plasmática, si bien en la mayoría de los casos los elementos y reacciones parciales entre cada eslabón no están descritos y son objeto activo de estudio.

Introducción

El ataque de patógenos a organismos vegetales ocurre con una alta frecuencia en la naturaleza en todas las especies de plantas, si bien la mayor importancia se le ha concedido a las enfermedades sufridas por especies cultivadas, en cualquiera de los estadios de su desarrollo. Este interés se deriva del impacto que tienen las pérdidas generadas por el ataque de plagas, en la economía de una comunidad de cualquier tamaño, ya que directa o indirectamente, los organismos vegetales constituyen la base de la alimentación humana y de muchos otros productos que son consumidos por una población.

Los microorganismos que atacan a las plantas produciéndoles enfermedades pertenecen a grupos taxonómicos diversos que incluyen virus, bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos. Juntos constituyen miles de especies que evolutivamente han desarrollado la habilidad de crecer a expensas de la planta a la que enferman. Esta habilidad está dada por un gran número de estrategias que utiliza el patógeno para invadir a la planta y que incluyen la formación de estructuras especiales que favorecen la colonización y el despliegue de una variada artillería química, las cuales facilitan la penetración del patógeno en los tejidos de la planta. Una vez que éste ha logrado vencer las barreras de las cutículas y las paredes celulares, el patógeno entra en contacto con la membrana plasmática, que constituye una estructura limítrofe extensa y compleja de la célula vegetal, en este caso, la célula hospedera. Las interacciones que se generan entre el patógeno y la membrana plasmática de la célula vegetal están escasamente estudiadas, a diferencia de lo que sucede en las asociaciones análogas de patógenos con células animales. Causa de ello es la dificultad experimental de acceder libremente a los espacios celulares y de obtener fracciones subcelulares (en especial la de la membrana plasmática), con una buena integridad. Estos son problemas impuestos por la presencia de la pared celular, cuya resistencia obliga al uso de procedimientos agresivos e invasivos para los tejidos de la planta.

Una vez que alguna de las estructuras o moléculas del patógeno hace contacto con la membrana plasmática de la célula hospedera, se desencadena en ésta un gran número de reacciones en las que están involucrados dos de los constituyentes más abundantes de la membrana: los lípidos y las proteínas. Éstos experimentan cambios en sus funciones de transporte de iones, de actividad enzimática, de unión a moléculas del patógeno de forma específica, etc. Es en la membrana plasmática en donde se perciben los primeros indicios de la presencia del patógeno y también en donde se generan los primeros eventos de los mecanismos que la célula implementa para responder al patógeno y que desembocan, o bien en una respuesta con el patrón de enfermedad, o bien de resistencia a la misma (Kauss, 1990). La membrana plasmática es también el sitio último de donde parten las respuestas expresadas por la planta ante la presencia del patógeno. La serie de elementos y reacciones parciales intracelulares que integran estos patrones de respuesta de resistencia o enfermedad son variados y dependen del patógeno y de la planta afectada, si bien hay una serie de estrategias generales de respuesta. En este capítulo presentamos una visión general y actualizada de los factores y procesos involucrados en la interacción de la membrana plasmática de la célula vegetal hospedera con los patógenos.

Los patógenos emplean varias estrategias para infectar una planta

Antes de alcanzar a las células de la planta, los patógenos deben allegarse a las regiones anatómicas en las que la infección pueda ser exitosa. Hay que tener en cuenta que la mayoría de las interacciones entre patógenos y especies vegetales, son no-compatibles, por lo que la infección no prospera. En la naturaleza, las infecciones son más excepción que regla.

La llegada de un patógeno a la planta hospedera tiene modalidades dependiendo de la naturaleza del hospedero. Algunos llegan de manera indirecta, arrastrados por el suelo, el viento o el agua y otros, en especial los virus y los micoplasmas, son transferidos a la planta de forma más específica por vectores que en general son insectos. Muchos patógenos son atraídos por los exudados naturales de regiones foliares o radiculares del hospedero, ya que estos fluidos son ricos en aminoácidos, azúcares y otros compuestos nutritivos (Agrios, 1997; Lucas, 1998).

Posterior a su llegada, los patógenos deben asentarse y penetrar en el tejido de la planta, algunos tienen una entrada pasiva, mientras otros despliegan una batería de estrategias agresivas para penetrar en los tejidos de la planta. Dentro de estas estrategias está la producción de enzimas digestivas que ablandan el tejido del hospedero. Las heridas en la superficie de los órganos de la planta son sitios iniciales de penetración de patógenos y se originan frecuentemente en condiciones naturales por factores como el choque de las partículas del suelo en contra de las superficies foliares, el roce con otras ramas, los sitios de alimentación de insectos, etc. La entrada a través de heridas de la planta puede ser en heridas frescas, no suberizadas y no tienen que ser necesariamente de gran tamaño (Goodman et al, 1967).

También aquellas aperturas naturales creadas en la superficie de los tejidos de la planta pueden ser utilizadas como vía de entrada de patógenos. Entre estas aperturas están diversas estructuras.

Las bacterias usan como vía de entrada aperturas naturales de la planta como estomas, hidátodos, lenticelas, tricomas, pelos, células nectarias y heridas. Los hidátodos son células glandulares que forman poros que liberan agua y que se encuentran usualmente en las orillas o puntas de las hojas en donde excretan agua cuando es necesario o la reabsorben cuando la humedad disminuye. Las células nectarias son glándulas que secretan gotas de néctar, el cual sirve de vehículo para el depósito de bacterias por parte de insectos polinizadores, allegándose luego al ovario y diseminando la población bacteriana. Los tricomas son pelos foliares que están formados por una o varias células y que se encuentran en las superficies de las hojas, pecíolos, tallos y frutos. La estructura de estos tricomas es muy compleja y frágil, por lo que al romperse, constituyen sitios de entrada para las bacterias (Kenaga, 1974; Sheffer, 1997).

En el caso de los hongos, algunos pueden entrar directamente a través de la epidermis o bien por los estomas, como en el caso de las esporas germinantes que forman estructuras llamadas apresorios o bien de las hifas mismas, que pueden generar finas prolongaciones llamadas haustorios y que engloban a la célula hospedera, absorbiendo sus nutrientes (Kenaga, 1974).

Finalmente, la penetración del patógeno se realiza atravesando la cutícula primero y en algunos casos, la epidermis de las estructuras anatómicas de la planta. De esta manera, el patógeno o alguno de sus productos queda accesible al apoplasto, que es el espacio en el que cada célula del tejido hospedero está rodeada de su pared celular, e inmediata a ella, se encuentra la membrana plasmática.

Las moléculas que forman la membrana plasmática de las células vegetales participan activamente en la interacción con los patógenos

La membrana plasmática o plasmalema de las células vegetales tiene las mismas características estructurales y funcionales que tienen las membranas de cualquier organismo vivo: es una lámina continua y cerrada formada por dos monocapas de fosfolípidos que se contraponen entre sí y en la que se insertan, en mayor o menor profundidad, proteínas. También existen carbohidratos asociados a la parte hidrofílica de estos lípidos y de estas proteínas. La fuerza que mantiene unido y estable a este arreglo supramolecular, se deriva de las interacciones hidrofóbicas cooperativas que se generan entre las porciones de ácidos grasos de cada fosfolípido o esfingolípido con los vecinos, con los de la monocapa opuesta y con las porciones hidrofóbicas de las proteínas membranales. Al igual que todas las membranas, las dos monocapas son asimétricas en composición, es decir, tienen los mismos elementos lipídicos pero en diferente concentración, así como en cuanto a las regiones proteicas, que no son idénticas en ambos lados de la membrana (Leshem et al, 1992). Los elementos estructurales que integran a la membrana plasmática le confieren sus propiedades y sus funciones. La parte lipídica le permite actuar como una envoltura impermeable al medio acuoso, pero con propiedades de microviscosidad y fluidez esenciales para que la membrana sea una estructura dinámica y plástica.

Las membranas plasmáticas de plantas también tienen propiedades eléctricas comunes a cualquier membrana biológica: a) tienen una carga de superficie de 8 a 30 mV conferida por los grupos polares de sus lípidos y por las porciones hidrofílicas de las proteínas membranales (Tabla I) y, b) tienen un potencial transmembranal ($\Delta\psi$), negativo en el lado citoplásmico, que tiene valores entre 10 y 100 mV o aún más, y el cual está generado principalmente por la actividad de la bomba de H^+ (Leshem et al, 1992).

Dentro de las proteínas que se encuentran en la membrana plasmática están las proteínas integrales y las periféricas, prácticamente todas las primeras están atravesando la membrana y las últimas están asociadas a uno u otro lado de la membrana. Como en cualquier proteína, las estructuras secundaria y terciaria son muy complejas y hasta la fecha ninguna proteína del plasmalema de plantas ha podido ser cristalizada con suficiente resolución. Las proteínas de la membrana plasmática de las células vegetales pueden tener cualquiera de estas funciones: enzimáticas, de translocación de iones y de unión de ligandos. Dentro de las primeras tenemos proteínas como peroxidasas, superoxidasas, cinasas, fosfatasa, sintetasas de

carbohidratos complejos, etc. En cada grupo de las enzimas mencionadas podemos encontrar el caso de proteínas que están involucradas en la respuesta a la infección por patógenos, por ejemplo, tenemos a la enzima formadora de H_2O_2 , molécula que funciona como una defensa y señal produciendo el “estallido” oxidativo (Piffanelli et al, 1999) o a la enzima que polimeriza glucosa para generar el polímero que concede resistencia a la pared celular ante el ataque del patógeno (Kauss, 1996). En el grupo de las proteínas translocadoras de iones están las proteínas acarreadoras y los canales. Entre ellas podemos ubicar a la ATPasa de H^+ y los canales iónicos de Ca^{2+} , los cuales están involucrados en el establecimiento de flujos de iones y potenciales eléctricos que pueden actuar como mediadores o transmisores de las señales generadas ante la presencia del patógeno (Kauss, 1987; Schaller y Oecking, 1999). Esto muestra que las proteínas le confieren a la membrana plasmática la permeabilidad específica y selectiva. Las proteínas receptoras de ligandos producidos y secretados directamente por el patógeno como en el caso de los estimuladores (elicitors), tienen también una participación fundamental en la reacción de la planta ante el patógeno (Callow y Green, 1996). Tanto la parte lipídica como la proteica se verán perturbadas por la interacción del patógeno con la célula hospedera, como se refiere a continuación (Knauf et al, 1989; Goudet et al, 1998).

Tabla I. Tipos de lípidos presentes en la membrana plasmática de células vegetales.

Característica de los lípidos	Tipo de lípido
Fosfolípidos electroneutros	Fosfatidilcolina, fosfatidiletanol, fosfatidiletanolamina
Fosfolípidos aniónicos	Fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinosítidos
Esfingolípidos	Cerebrósidos, gangliósidos
Esteroles	Sitosterol, campesterol y estigmasterol

Los patógenos de plantas sintetizan compuestos especiales para invadir a la célula de la planta hospedera

Los principales patógenos en plantas son las bacterias y los hongos. Después de la penetración, la siguiente etapa en la estrategia fúngica para colonizar una planta es la

producción de toxinas que manipulan la fisiología de la planta para el beneficio del patógeno. Las toxinas son productos microbianos, generalmente de bajo peso molecular, que pueden estar dañando directamente las células de la planta y a la vez estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad. Con base en la especificidad de estos metabolitos microbianos hacia la planta hospedera se han clasificado en toxinas selectivas o específicas de un hospedero y no selectivas o inespecíficas de un hospedero.

Las toxinas selectivas del hospedero sólo afectan especies de plantas o cultivos que son infectados por el patógeno que las produce. Estudios bioquímicos y genéticos han mostrado que estas toxinas son determinantes para la susceptibilidad (enfermedad) del hospedero invadido por el patógeno que las produce. En estudios con este tipo de toxinas, como las producidas por los géneros de hongos *Helminthosporium*, *Periconia* y *Alternata*, la susceptibilidad o resistencia de la planta hospedera hacia el hongo siempre se han visto correlacionadas con la sensibilidad o insensibilidad hacia la toxina.

Las toxinas no selectivas del hospedero afectan a un gran número de especies de plantas e incluso producen algunos síntomas de la enfermedad en especies que no son hospederas del patógeno que las produce, sin ser determinantes para el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, este tipo de toxinas no presentan ninguna especificidad hacia la planta hospedera. Entre ellas se encuentran toxinas de origen fúngico y bacteriano, las cuales presentan una gran diversidad de estructuras como las que se observan en la Figura 1. En el laboratorio estamos estudiando los efectos de una toxina llamada fumonisina B₁, producida por un hongo, *Fusarium moniliforme*. Ésta es una toxina de la cual se han reportado varios efectos tóxicos en plantas, mismos que se describen en la Tabla II, su estructura también se puede observar entre las toxinas no selectivas del hospedero (Figura 1).

Los patógenos de plantas producen una diversidad de señales potenciales, en una forma análoga a la producción de antígenos por los patógenos de mamíferos, algunas de estas señales son detectadas por las plantas. La planta inicia una respuesta de defensa eficiente contra el invasor cuando reconoce estas moléculas-señal denominadas estimuladores (elicitores), que pueden ser exógenos o endógenos. Los estimuladores exógenos son derivados de la superficie fúngica (fragmentos de quitina y glucano) o moléculas específicas secretadas por el patógeno (péptidos o proteínas). Los estimuladores endógenos son derivados de la pared celular de la planta (oligogalacturonatos). Por ejemplo, el hongo patógeno *Phytophthora sojae* produce distintas clases de estimuladores: un heptaglucano y un oligopéptido, éstos disparan la respuesta de defensa en soya y perejil respectivamente, a través de un mecanismo que se inicia con la unión de éstas moléculas a distintos receptores localizados en la superficie membranal de la célula de la planta (Knogge, 1996).

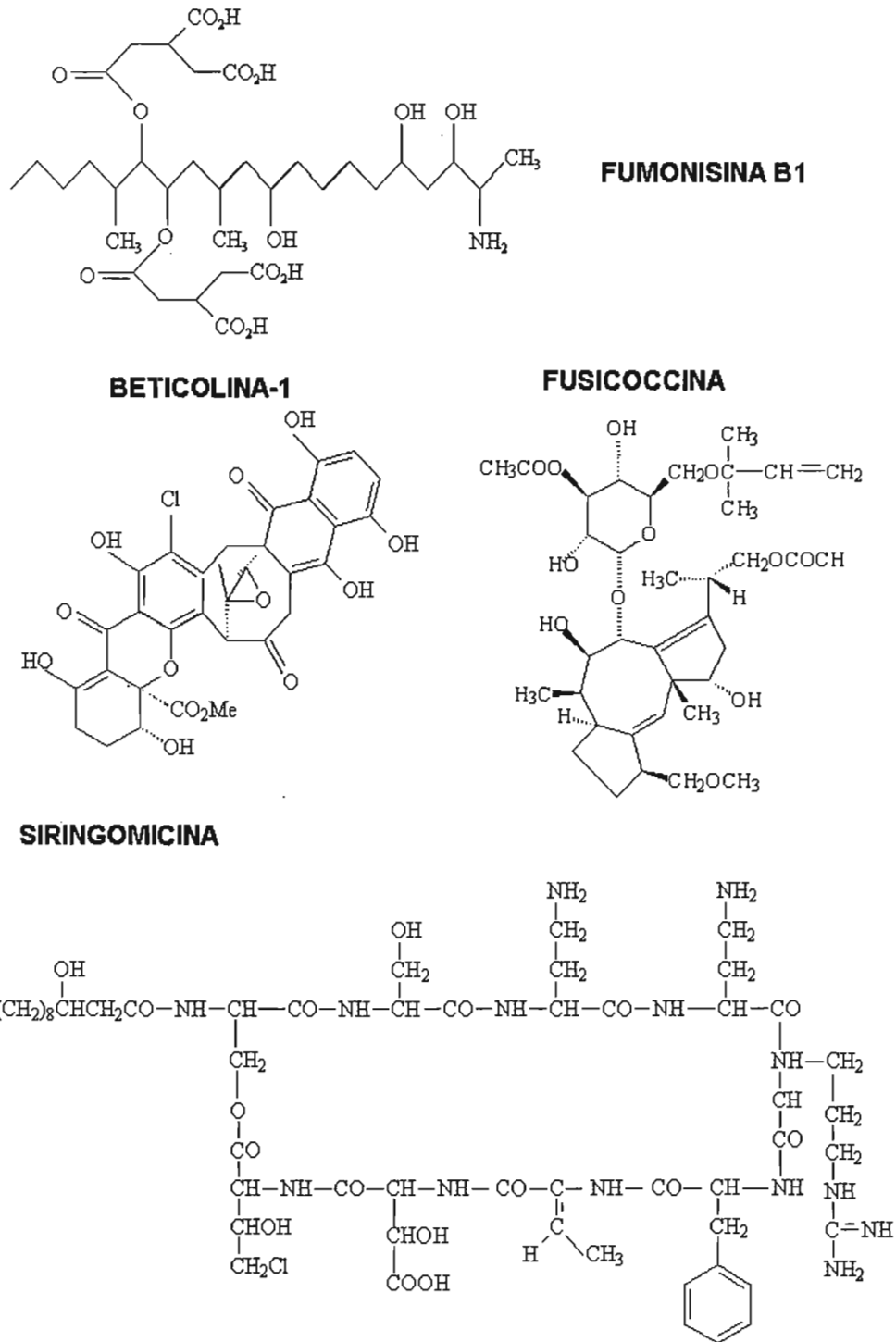


Figura 1. Toxinas de origen bacteriano y fúngico no selectivas del hospedero. Las tres superiores son producidas por los hongos *Fusarium moniliforme*, *Cercospora beticola* y *Fusicoccum amygdali* respectivamente y la inferior por la bacteria *Pseudomonas syringae*.

Tabla II. Efectos fisiológicos y celulares de la fumonisina B₁ en plantas.

Espece	Dosis	Efectos Macroscópicos	Efectos celulares o moleculares
Lenteja de agua (<i>Lemna minor</i>)	1 μ M	Reducción general del crecimiento	Reducción en la capacidad de sintetizar clorofila.
Maíz (<i>Zea mays</i>)	1.3-130 μ M	Reducción del crecimiento de la raíz y de los retoños. Podredumbre de raíz (planta adulta)	Inhibición de la ATPasa de H ⁺ Degradación del DNA Aumento de la actividad de la Glucan sintetasa II Modificación de los niveles de mRNA de quitinasa, y proteínas ricas en hidroxiprolina.
Toloache (<i>Datura stramonium</i>)	32.5 μ M	Podredumbre de hojas expuestas a la toxina. Manchas de necrosis y clorosis. Muerte general de la planta	Alteración estructural del citoplasma y cloroplasto Reducción de clorofila Fuga de electrolitos
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	5-70 μ M	Zonas de necrosis en hojas	Inducción de la apoptosis Incremento en bases esfingoideas Aumento en la fuga de electrolitos.
Lenteja acuática (<i>Lemna pausicostata</i>)	5-70 μ M	No descrito	Incremento en bases esfingoideas Aumento en la fuga de electrolitos.
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	5-70 μ M	No descrito	Incremento en bases esfingoideas Aumento en la fuga de electrolitos

Algunos de los compuestos producidos por un patógeno están codificados por genes de avirulencia (*Avr*). Cabe mencionar que estos genes forman parte del modelo gen por gen, el cual intenta explicar la especificidad entre un patógeno y su hospedero.

En la resistencia específica a una enfermedad, entre una cepa específica de un patógeno (raza) y una variedad particular de un cultivo (complementariedad denominada gen por gen), los genes *Avr* del patógeno codifican a estimuladores que pueden estar interactuando con elementos en la membrana plasmática, en el citosol o posiblemente en el núcleo (Somssich y Hahlbrock, 1998). La expresión de *Avr* causa que el patógeno produzca una señal que dispara una respuesta fuerte de defensa en una planta que contiene un gen de resistencia (*R*) apropiado. El producto del gen *R* complementa específicamente al producto del gen *Avr*, ya que el producto de este gen sirve de ligando para receptores que son codificados por los genes *R*. Una planta puede tener muchos genes *R* y un patógeno puede tener muchos genes *Avr* (Bent, 1996; Dangl y Jones, 2001). En la ausencia del gen *R* o del correspondiente gen *Avr*, el reconocimiento no ocurre y el patógeno es capaz de infectar a la planta. Obviamente el patógeno no expresa los genes *Avr* con la intención de disparar reacciones de defensa en la planta. La función primaria de los genes *Avr*, sin embargo, es desconocida en la mayoría de los casos, aunque en algunos, estos genes son requeridos para una completa patogenicidad. Sólo en los virus que infectan plantas se ha descubierto la función de los genes *Avr*, los cuales codifican a una proteína de cubierta, una replicasa o una proteína de motilidad. Existen hongos que realizan una colonización restringida a los espacios intercelulares de los tejidos del hospedero (apoplasto), y que producen pequeños péptidos capaces de estimular las respuestas de defensa dependientes del gen *R* aún en la ausencia del patógeno, como ejemplos están *Avr9* y *Avr4* de *Cladosporium fulvum* y NIP1 de *Rhynchosporium secalis* (Hammond-Kosack y Jones, 1997). Este tipo de genes se han estudiado extensamente en fitopatógenos bacterianos del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. El primer gen de avirulencia fue clonado en 1984 de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, un patógeno de soya. Desde entonces, más de 30 genes de avirulencia bacterianos han sido clonados, encontrándose que la mayoría de estos genes: 1) no tienen homología significativa con secuencias presentes en las bases de datos, 2) codifican proteínas completamente hidrofílicas y no tienen secuencias de un péptido señal en el extremo amino-terminal y 3) requieren genes adicionales en la bacteria (llamados *hrp*, de respuesta de hipersensibilidad y patogenicidad), para conferir la inducción específica (dependiente del gen *R*) de la respuesta de hipersensibilidad (HR) con una muerte celular localizada (Van den Ackerveken y Bonas, 1997). Tanto la HR como la muerte celular localizada son procesos que se llevan a cabo en las células de la planta y que resultan fundamentales para conferirle resistencia a la infección.

De la membrana plasmática de la célula hospedera parten señales para desplegar la respuesta de defensa contra el patógeno

Los microorganismos que estimulan una respuesta de la planta hospedera pueden encontrarse ante varias situaciones: la aceptación por parte del hospedero (como en el caso de los simbioses fijadores de nitrógeno del género *Rhizobium*), un reconocimiento tardío de la presencia del patógeno y defensas moderadamente efectivas (como para la mayoría de las interacciones que resultan en enfermedad), o una fuerte defensa que no permite que la infección se extienda. Esta última forma de resistencia en relación con la participación de la membrana plasmática es la que se describe en esta sección.

Hay dos tipos de respuesta de defensa de la planta a patógenos potenciales: la respuesta de defensa de un hospedero inespecífico (frecuente) y la respuesta de resistencia de un hospedero específico (rara). Esta última está genéticamente definida por la interacción directa entre el producto de un gen de resistencia *-R-* (dominante o semidominante) del hospedero y el producto complementario del correspondiente gen de avirulencia *-Avr-* (dominante) del patógeno. En contraste con esto, la resistencia del no-hospedero (incompatibilidad básica), se exhibe en todas las especies de plantas que responden a patógenos potenciales carentes de combinaciones aparentes del modelo genético *R/Avr*. Sin embargo, aparte de esta distinción, los procesos bioquímicos que ocurren en el hospedero en ambos tipos de resistencia son muy similares (Bent, 1996).

Junto con el reconocimiento del patógeno, las reacciones más tempranas de defensa se presentan en la membrana plasmática. Una de las respuestas identificadas es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$, probablemente vía la acción de una NAD(P)H oxidasa asociada a la membrana plasmática y/o a peroxidasas localizadas en el apoplasto (Xing et al, 1997). La producción de especies reactivas de oxígeno posiblemente impone un estrés oxidativo sobre las células de la planta ya afectadas por la infección, ante lo cual, la célula implementa medidas para circunscribir el daño al tejido de esa zona. Bajas concentraciones de ROS pueden actuar como señales para la inducción de mecanismos de desintoxicación de estos radicales libres y que involucran a las enzimas superóxido dismutasa y la glutatión-S-transferasa, además de constituir un estímulo hacia células vecinas para prepararse a la defensa. En grandes cantidades, las ROS pueden matar tanto al patógeno como a la célula de la planta (muerte celular hipersensible). Adicionalmente, cuando se induce un incremento en la producción de H_2O_2 , se produce en la pared celular un entrecruzamiento de sus proteínas estructurales a través de la actividad de una peroxidasa, reforzándose así las barreras físicas que coadyuvan a evitar la diseminación del patógeno. Después de la producción de ROS hay una producción importante de etileno, desintegración de la membrana y fuga de electrolitos. Posteriormente a estos eventos se producen la muerte celular (HR) y la necrosis del tejido (Tenhaken et al, 1995). La fuga de electrolitos y la pérdida de integridad de la membrana pueden estar asociadas a la peroxidación de lípidos inducida por el incremento de ROS y a la actividad de fosfolipasas. Se ha reportado inclusive que los ácidos grasos derivados de la lipólisis son oxidados por la acción de

lipoxigenasas, en particular los ácidos araquidónico (20:4) y linolénico (18:3) (Callow y Green, 1996).

La activación de canales iónicos de la membrana plasmática, en particular de Ca^{2+} , también se ha reportado en los estadios iniciales de la infección (Kauss, 1987; Dixon, 1986; Zimmerman et al, 1997). Aparentemente, la apertura de estos canales está influenciada por el potencial eléctrico transmembranal, mismo que es promovido por la actividad de la bomba de H^+ de la membrana. El incremento resultante de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} es fundamental para disparar la activación de cinasas y fosfatasa de proteínas, que a su vez modulan otras actividades enzimáticas relacionadas con los mecanismos de defensa de la célula hospedera, la cual por lo tanto, constituye una respuesta global que abarca un gran número de componentes intracelulares. Tras las acciones iniciales de defensa se presentan cambios rápidos en la polaridad de la membrana, en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} y H^+ y en las actividades de NADPH oxidasas, fosfolipasas, fosfatasa y cinasas de proteínas. Tales cambios tienen efectos inmediatos en varias vías metabólicas, por ejemplo: la inducción de la actividad de fosfolipasas que actúan sobre los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos en la membrana, lo que da como resultado una liberación de ácido linolénico, el cual sirve como un precursor de la síntesis de ácido jasmónico, metiljasmonato y otras moléculas relacionadas entre sí a través de una serie de reacciones enzimáticas. Se ha demostrado que estos compuestos y sus precursores actúan como moléculas-señal bajo diversas condiciones, incluyendo el ataque por patógenos. Tanto la cascada de reacciones de cinasas y fosfatasa, como las que desencadenan las ROS forman parte de la vía de transducción de la señal (Somssich y Hahlbrock, 1998). En conjunto, todos estos eventos a su vez pueden producir cambios en la composición membranal y en sus propiedades. En nuestro laboratorio hemos descrito efectos de este tipo en las membranas plasmáticas de embriones de maíz expuestos a la toxina Fumonisina B₁ añadida *in vivo*. En la Figura 2 se muestra cómo concentraciones crecientes de FB₁ inducen una disminución en la fluidez membranal. Actualmente, estamos investigando si esos cambios están relacionados con un efecto peroxidante de los lípidos producido por la toxina.

Durante la infección, particularmente por patógenos biótrofos, se modifica el transporte transmembranal de azúcares. Esto lleva a cambios en la partición de carbono en el hospedero, los cuales pueden ser regulados a través de una modulación de la expresión y/o actividad de varios acarreadores de pequeños solutos tales como iones y azúcares hacia dentro y fuera de las células de los tejidos infectados (Callow y Green, 1996).

Un aspecto relevante en el que está involucrada la membrana plasmática durante la interacción planta-patógeno está integrado por los cambios en la permeabilidad membranal debidos a la acción de toxinas, saponinas, ciertos elicitores o simplemente a cambios generados por degradación de componentes de la membrana plasmática y que desembocan en un incremento en la fuga de solutos hacia el apoplasto. Este es un factor muy importante, pues lleva a cambios en el potencial membranal y eventualmente, si se trata de niveles críticos, a la muerte de la célula. En estudios realizados con fumonisina B₁ hemos observado que embriones de maíz que han sido embebidos con esta toxina durante 24 horas tienen una mayor liberación de solutos en

agua desionizada, que los embriones que han sido embebidos sin esta toxina, lo cual sugiere que la toxina incrementa la permeabilidad de las membranas celulares de estos embriones (Figura 3).

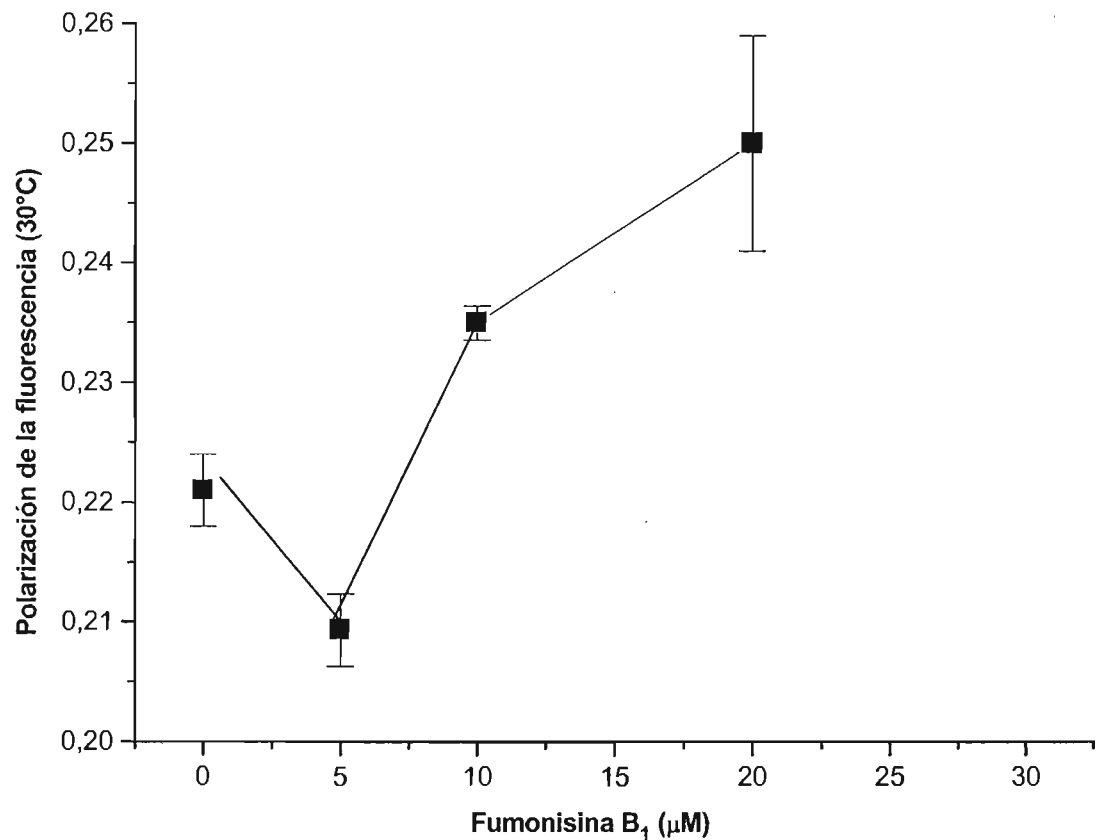


Figura 2. Modificación de la fluidez de la membrana plasmática por la toxina fumonisina B₁. Los embriones de maíz fueron embebidos 24 h en presencia de diferentes concentraciones de la FB₁ y posteriormente se aislaron vesículas de membrana plasmática. A éstas se les midió la fluidez membranal por medio de la polarización de la fluorescencia del difenilhexatrieno (DPH), una sonda hidrofóbica y fluorescente. Un aumento en la polarización indica una disminución en la fluidez del entorno membranal en donde se encuentra embebido el DPH.

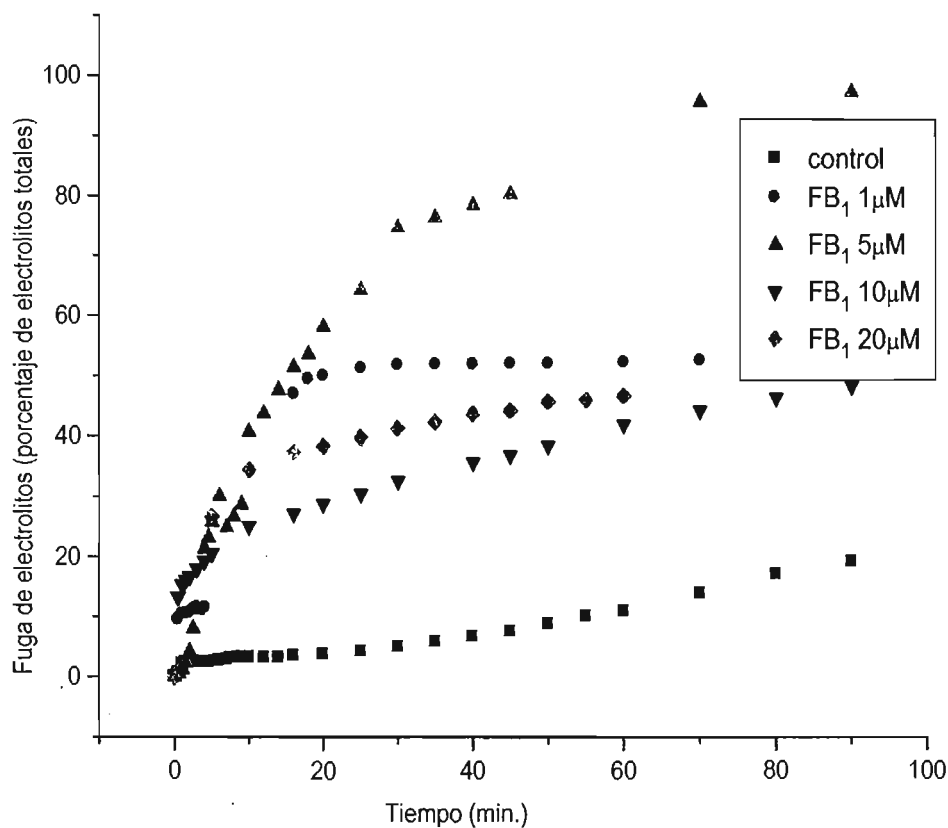


Figura. 3. Efecto de la fumonisina B₁ en la fuga de electrolitos de embriones de maíz. Los embriones de maíz fueron embebidos en presencia de diferentes concentraciones de la toxina por 24 h. Posteriormente, los embriones se transfirieron a agua desionizada y se midió la conductividad eléctrica del fluido como una medida de la fuga de electrolitos de los embriones con los diferentes tratamientos. Los electrolitos que difunden de los embriones son en su gran mayoría moléculas cargadas que afectan la conductividad eléctrica del agua, al no ser retenidos por las membranas celulares de los embriones.

Otro de los parámetros membranales afectados por la infección, es la actividad enzimática. En el caso de la síntesis de callosa, un polímero de glucosa que produce deposiciones en la pared celular que tienen como efecto el aumento de la resistencia mecánica ante el ataque de patógenos, se ha descrito que la sintetasa de callosa está embebida en la membrana plasmática, observándose que la callosa es sintetizada rápidamente en respuesta a la herida, estrés o infección por un patógeno (Delmer, 1990). La actividad de callosa es estimulada por Ca^{2+} , considerado un mensajero intracelular típico, por lo que ha surgido un gran interés por explorar las señales de

defensa asociadas a la activación de esta enzima durante la infección. Las síntesis rápida de callosa es una respuesta de resistencia a la infección por patógenos en plantas, la cual es favorecida por cualquier tratamiento que lleve directa o indirectamente a que la permeabilidad de la membrana plasmática a Ca^{2+} se incremente (como la acción por toxinas y elicitores). Cuando se exponen embriones de maíz durante la germinación a la fumonisina B_1 , hemos observado que se estimula la actividad de la enzima que sintetiza la callosa, la 1,3 β -sintetasa de glucanos (GSII).

Además de la activación de la síntesis de callosa, los incrementos de las concentraciones de Ca^{2+} conducen a la activación de cinasas de proteínas que son responsables de la modificación en los patrones de fosforilación de proteínas membranales y con ello, de la modulación de su actividad biológica. Los flujos iónicos como los de Ca^{2+} , están relacionados con cambios rápidos en el potencial eléctrico de la membrana plasmática en respuesta a estimuladores (elicitores) (Mayer y Ziegler, 1988). También se ha observado que el vanadato, un inhibidor de ATPasas de cationes tipo P, inhibe la acumulación de fitoalexinas en epicotilos de chícharo en los que se estimuló la defensa. Esto sugiere que las ATPasas pueden estar involucradas en la alcalinización del medio extracelular y en la correspondiente acidificación observada en células en cultivo que se han expuesto al estimulador (elicitor). El transporte de protones puede estar relacionado a la salida de K^+ (acompañada de una alcalinización del espacio extracelular) y a la entrada de Ca^{2+} observados en situaciones de infección. Esto también sugiere que la hiperpolarización de la membrana plasmática mediada por enzimas como la ATPasa de H^+ , así como la actividad misma de estas enzimas, contribuyen a la trasducción de la señal para la defensa global contra patógenos (Callow y Green, 1996; Schaller y Oecking, 1999). Varias toxinas fúngicas tienen como blanco la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, la cual desempeña un papel clave en muchas funciones celulares, además de su participación en la defensa contra la infección. Nuestro grupo ha demostrado que la fumonisina B_1 inhibe la actividad de esta enzima, sugiriendo que esto podría llevar a la modificación de procesos de defensa que dependen de su actividad. Algunos de los principales eventos a nivel de la membrana plasmática que se presentan durante la infección y que se describieron en esta sección se aprecian en la Figura 4.

La respuesta de defensa de la planta involucra cambios en el metabolismo celular y en la expresión de genes de resistencia contra el patógeno invasor

El entendimiento de las perturbaciones en la función de la membrana plasmática en la planta enferma es aún escaso, comparado con el conocimiento que se tiene de este tema en los sistemas animales. Una explicación a este respecto es la complejidad de la membrana plasmática, la cual posee una estructura excitable con una gran diversidad de proteínas receptoras, transportadoras y formadoras de canales que son capaces de responder a estímulos específicos e inespecíficos. Entre los últimos están aquellos que afectan la superficie de carga, el pH y factores mecánicos; tales estímulos no

específicos pueden presentarse durante la invasión por patógenos. Como ya se mencionó en la sección anterior, durante la respuesta de defensa se presentan fenómenos tales como la hiperpolarización, fuga de electrolitos, fallas de las células para desplasmolizarse después de la plasmólisis, etc., que son parámetros que pueden estar relacionados con una activación o inhibición de la actividad de la ATPasa de H^+ , de la apertura de canales iónicos y con factores como la producción de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica entre otros. La mayoría de estos fenómenos son rápidos y participan principalmente en el reconocimiento y transducción de la señal ante la presencia de un patógeno para activar los mecanismos de defensa de la planta. Sin embargo, corriente abajo de la señalización que comienza a nivel de la membrana plasmática se presentan otros eventos que transmiten y siguen una secuencia que lleva al éxito de la defensa global contra el patógeno invasor.

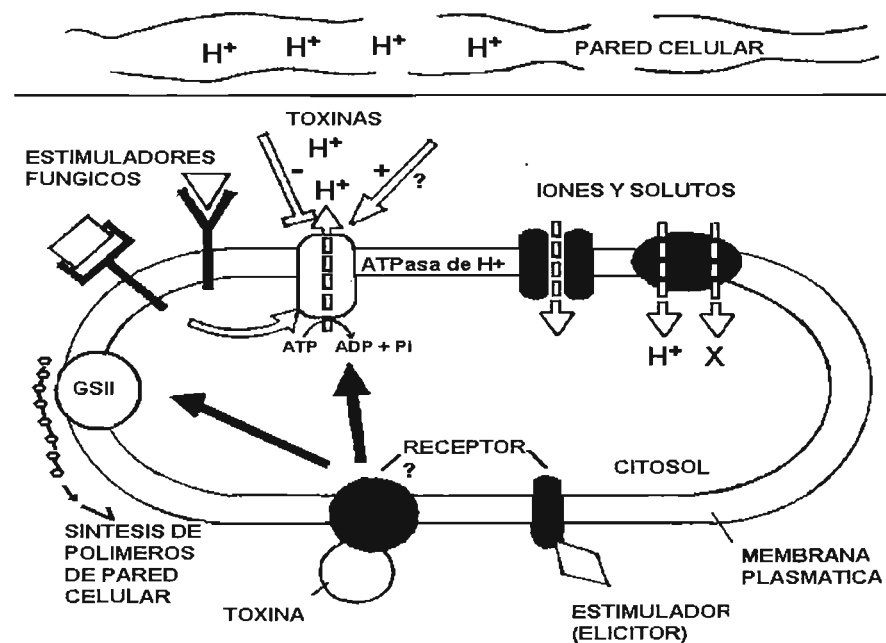


Figura. 4. Principales eventos en la membrana plasmática durante la invasión por un patógeno. El reconocimiento del estimulador (elicitador) desencadena una señalización que involucra la activación o inhibición de enzimas como la ATPasa de H^+ y la sintetasa de glucanos II (GSII) y flujos iónicos que modifican propiedades como el potencial eléctrico membranar. Las toxinas producidas por el patógeno también interactúan con componentes proteicos específicos de la membrana, así como con la porción lipídica de la membrana.

Es a nivel intracelular, más allá de la membrana plasmática, donde ocurre la serie de pasos ulteriores a la percepción y disparo de la señal inicial que partieron de la membrana. Muchas son reacciones que se realizan en el citosol o en otros organelos celulares. La mayoría de estas vías no está conocida cabalmente y esa es un área de estudio de las más activas en la fitopatología molecular. Sin embargo, se sabe que uno de los principales objetivos de las vías de transducción de señales (por ejemplo las que involucran a proteínas cinasas activadas por mitógenos, MAPKs, o al ácido salicílico), es el núcleo, en donde se pueden activar o reprimir varios genes que codifican para proteínas que están involucradas en la respuesta de defensa (Cardinale et al, 2000). Se ha encontrado que varios de estos genes están involucrados en vías de los metabolismos primario o secundario. A este respecto, el metabolismo secundario ha sido estudiado preferentemente, ya que muchos de sus productos exhiben diversas propiedades relacionadas directamente con la defensa, como en el caso de la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana, así como la capacidad de modificar características físicas de la pared celular. En plantas, uno de los principales flujos de carbono del metabolismo primario al secundario ocurre por la vía de los fenilpropanoides. Los genes que codifican varias enzimas de esta vía son activadas fuertemente, incluyendo las que están involucradas en la producción de compuestos fenólicos solubles (fitoalexinas) y enlazados a pared celular (lignina), que son compuestos que se acumulan en tejidos infectados o tratados con estimulador (elicitor) (Dixon, 1986). Una clase de estos compuestos, las fitoalexinas, sirven como antibióticos cuando se liberan en grandes concentraciones, ejemplos de este tipo de compuestos son la kievitona y la faseolina. Otros pueden servir como moléculas-señal importantes, como el ácido salicílico, el cual es un componente de señalización a larga distancia que resulta en la inmunidad de la planta ante una infección posterior, fenómeno llamado resistencia sistémica adquirida (SAR) (Ryals et al, 1996). Entre otros eventos relacionados con la respuesta de defensa están la deposición de lignina o de sustancias polifenólicas que son útiles para el reforzamiento de la pared celular y así evitar la invasión (Weaver y Herrmann, 1997). También se ha observado que se ha incrementado la expresión de las enzimas de la vía del shikimato (la cual conduce a la síntesis de fenilalanina que es el precursor de los fenilpropanoides), cuando se infecta el tejido o es tratado con elicitor. Esta vía utiliza como precursores a metabolitos que son intermediarios en las vías glucolíticas y de las pentosas fosfato. De hecho, estas vías se ven reguladas positivamente durante la infección. También se ha reportado que durante la respuesta de defensa las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) se inducen rápida y masivamente tanto alrededor del sitio de infección, como en sitios alejados del sitio de infección (sistémicamente) (Kombrink y Somssich, 1997). Sin embargo, la reprogramación celular que sucede durante el ataque de patógenos no sólo comprende mecanismos regulatorios positivos, sino también negativos, como por ejemplo la reducción de los niveles de RNA mensajero y de proteína de la Rubisco en papa cuando se presenta la infección, o la disminución de la expresión de varios genes que están involucrados en la proliferación celular y regulación del ciclo celular en perejil (Logemann et al, 1995). Tales efectos compensatorios en la inducción y represión de actividades metabólicas puede reflejar un estricto requerimiento para un

metabolismo global balanceado y ordenado durante la respuesta de la célula a la infección.

Como puede observarse, la información que se tiene alrededor de las vías de respuesta a la infección es fragmentaria y aunque hay elementos generales que operan ante varios patógenos, como el caso de la síntesis de fitoalexinas, hay también fenómenos muy específicos en los que participan elementos muy particulares de la pareja patógeno-hospedero (Somssich y Halbrock, 1998).

Conclusiones y perspectivas

La gran diversidad de especies de microorganismos patógenos y las especies de plantas que invaden es muy extensa, haciendo muy complejo el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en las interacciones planta-patógeno. Sin embargo, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los elementos moleculares del patógeno y de la célula hospedera que participan en el proceso de patogénesis, así como de los procesos celulares que median esta interacción. Indudablemente, la atención se ha concentrado en aquellas enfermedades que atacan especies económicamente importantes. Sin embargo, actualmente el campo que estudia las vías de transducción de la señal en la célula hospedera ante el ataque del patógeno, experimenta un desarrollo notable. Gracias a éste, estamos conociendo a los segmentos del proceso que comienza con la percepción de la llegada del patógeno en la membrana plasmática, hasta los productos con los que responde la célula vegetal para su defensa. El papel de la membrana plasmática es fundamental para el entendimiento de los procesos de infección y defensa, pues participa como punto inicial y final en ambos. Afortunadamente está en ascenso el número de trabajos que describen la participación de los elementos membranales y de sus propiedades en los procesos de patogénesis y defensa.

Con el conocimiento de los genomas de organismos patógenos, se hará un gran avance en la identificación de los genes involucrados en la infección y se abrirá una inmensa área de estudio que incluirá el análisis de aquellas proteínas que participan en el proceso, así como de los posibles mecanismos. Complementariamente, el conocimiento del genoma de *Arabidopsis*, también sentará la pauta para descifrar los componentes moleculares involucrados en la contraparte del patógeno.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por DGAPA-PAPIIT IN208300 y CONACyT 25131-B. NGN es becaria de CONACYT y DGEP, UNAM. FJG y SPB tuvieron becas de DGAPA, UNAM y MGR una beca sabática de DGAPA, UNAM.

Referencias

- Agrios GN** (1997) Plant Pathology. Fourth edition. Academic Press, New York. 43-54.
- Bent AF** (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**:1757-1771.
- Cardinale F, Jonak C, Ligterink W, Niehaus K, Boller T, Hirt H** (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* **275**:36734-36740.
- Callow JA, Green JR** (1996) The plant plasma membrane in fungal disease. En: *Membranes: specialized functions in plants*. Smallwood M, Knox JP, Bowles DJ (eds) Bios Scientific Publishers. Oxford. 543-562.
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**:826-833.
- Delmer DP** (1990) The role of the plasma membrane in cellulose synthesis. En: *The plant plasma membrane*. Larsson C, Moller IM (eds) Berlín. Springer-Verlag. 256-268.
- Dixon RA** (1986) The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol Rev* **61**:239-291.
- Goodman RN, Kiraly Z, Zaitlin M** (1967) The biochemistry and physiology of infectious plant disease. D. Van Nostrand Company, Inc. New York. 6-24.
- Goudet C, Véry AA, Milat ML, Ildefonse M, Thinbaud JB, Sentenac H y Blein JP** (1998) Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from beticolin 0 a non-peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. *Plant J* **14**:359-364.
- Hammond-Kosack KE y Jones JDG** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:575-607.
- Kauss H** (1987) Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **38**:47-72.
- Kauss H** (1990) Role of the plant plasma membrane in host-pathogen interactions. En: *The plant plasma membrane. Structure, function and molecular biology*. Larsson C, Moller IM (eds) Springer Verlag. New York. 320-350.
- Kauss H** (1996) Callose synthesis. En: *Membranes: specialized functions in plants*. Smallwood M, Knox JP, Bowles DJ (eds) Bios Scientific Publishers. Oxford. 77-102.
- Kenaga CB** (1974) Principles of Phytopathology. Edition 2. Balt Publishers. Lafayette, Indiana. 198-215.
- Knauf GM, Welter K, Müller M, Mendgen K** (1989) The haustorial plant parasite interfase in rust-infected bean leaves after high pressure freezing. *Physiol Mol Plant Pathol* **34**:519-530.
- Knogge W** (1996) Fungal infection of plants. *Plant Cell* **8**:1711-1722.
- Kombrink E, Somssich IE** (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. En: *The Mycota (Part A, Plant Relationships)*. Carroll G, Tudzynski P (eds) Springer. 107-128.

- Leshem YY, Shewfelt RL, Willmer C, Pantoja O** (1992) Plant membranes. A biophysical approach to structure, development and senescence. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1-110.
- Logemann E, Wu SC, Schroder J, Schmelzer E, Somssich IE, Hahlbrock K** (1995) Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *Plant J* **8**:865-876.
- Lucas JA** (1998) Plant Pathology and plant pathogens. 3rd ed. Blackwell Science. London. 97-122.
- Mayer MG y Ziegler E** (1988) An elicitor from *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* influences the membrane potential of soybean cotyledonary cells. *Physiol Mol Plant Pathol* **33**:397-407.
- Piffanelli P, Devoto A, Schulze-Lefert P** (1999) Defence signalling pathways in cereals. *Curr Opin Plant Biol* **2**:295-300.
- Ryals JA, Nevenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**:1809-1819.
- Schaller A, Oecking C** (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* **11**:263-72.
- Sheffer RP** (1997) The nature of disease in plants. Cambridge University Press. 9-14.
- Somssich I E, Hahlbrock K** (1998) Pathogen defence in plants-a paradigm of biological complexity. *TIPS* **3**:86-90.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci* **92**:4158-4163.
- Van den Ackerveken G, Bonas U** (1997) Bacterial avirulence proteins as triggers of plant disease resistance. *TIM* **5**:394-398.
- Weaver LM, Herrmann KM** (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *TIPS* **2**:346-351.
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E** (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* **9**:249-259.
- Zimmerman S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich H, Scheel D** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci* **94**:2751-2755.

HIPÓTESIS

La FB₁ es una molécula que por su naturaleza química y su efecto en la biosíntesis de esfingolípidos altera la composición, estructura y propiedades de la membrana plasmática y de sus componentes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la FB₁, explorando sus posibles mecanismos de acción, en algunos componentes tanto lipídicos como proteicos de la membrana plasmática de embriones de maíz en germinación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Determinar el efecto de la FB₁ en los siguientes parámetros de la parte lipídica de la membrana:
 1. Composición de ácidos grasos, esfinganina y fitoesfingosina.
 2. Permeabilidad.
 3. Fluidez.
- II. Determinar los efectos de los siguientes compuestos en la ATPasa de H⁺, como ejemplo de componente proteico de la membrana:
 1. Esfinganina, fitoesfingosina, ceramida y bajas concentraciones de FB₁
 2. Realizar los análisis cinéticos.

RESULTADOS

EL MODELO BIOLÓGICO

El efecto de la FB₁ en la germinación del maíz había sido reportado por Doehlert *et al.* (1994) utilizando semillas enteras. En este trabajo, se encontró que la FB₁ inhibía la elongación radicular y la actividad de las isoformas de α -amilasa de bajo pH. Con este antecedente, en el presente trabajo de tesis se usaron embriones de maíz con base en cuatro consideraciones: a) por ser el modelo que se ha venido empleando en el laboratorio, conociéndose su manejo y fisiología; b) por ser un sistema vegetal sensible a la FB₁, ya que su esfinganina N-acil transferasa se inhibe por la toxina; c) porque los embriones están desprovistos de testa y endospermo almidonoso, lo cual facilita el acceso de la FB₁ al embrión en la semilla completa; d) por el efecto reportado de la FB₁ en la elongación de la radícula (Doehlert *et al.* 1994), el cual ya era sugerente de que un blanco directo de la FB₁ podía ser la ATPasa de H⁺, pues esta enzima está involucrada en el fenómeno de la elongación celular en tejidos vegetales en crecimiento (Rayle y Cleland, 1992).

Se seleccionó un tiempo de 24 horas para la imbibición de los embriones de maíz, ya que a este tiempo, el porcentaje de germinación de la población de embriones fue del 50% o ligeramente mayor, siendo además un tiempo al cual se presentaba un menor riesgo de contaminación o crecimiento de microorganismos en los embriones o en el medio de imbibición. De los embriones germinados se obtuvieron las vesículas de membrana plasmática utilizadas en estos estudios.

LOS ENFOQUES *IN VITRO* E *IN VIVO*

Para estudiar el efecto de la FB₁ en la membrana plasmática se realizaron experimentos con dos tipos de enfoque experimental: 1) Los experimentos *in vivo* comprendieron la adición de la toxina a los embriones en el medio durante las 24 h de imbibición. En estos experimentos era de esperarse que la toxina alcanzara la membrana plasmática e ingresara a las células, en donde podía tener varios blancos, muy probablemente entre ellos, la esfinganina N-acil transferasa. La acción de la FB₁ sobre esta enzima podía resultar determinante en la estructura y función de la membrana plasmática, pues altera el balance de esfingolípidos membranales, y con ello, podría modificar la estructura y función de la membrana plasmática. Este tipo de experimentos no excluía una acción directa de la toxina sobre la membrana. Como se indicará más adelante en los resultados de esta tesis, se encontró que a este tiempo de imbibición de los embriones en FB₁, la toxina ya no se detectaba en la membrana. 2) Los experimentos

in vitro se realizaron añadiendo a la FB₁ directamente a las membranas plasmáticas purificadas y aisladas de embriones que nunca habían sido expuestos a la toxina. En este tipo de experimentos se podía considerar la acción de la toxina sólo sobre los componentes membranales, ya que esta preparación no contiene componentes citosólicos o intracelulares, descartándose así cualquier contribución relacionada con el efecto de la FB₁ sobre la esfinganina N-acil transferasa u otros blancos intracelulares, a los efectos encontrados.

ORGANIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los experimentos hechos bajo los dos enfoques mencionados se han organizado en los dos artículos que se presentan en la sección de Resultados de esta tesis. El primer artículo, intitulado **“Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase”** (Gutiérrez-Nájera et al. 2005, *Planta* 221: 589-596), incluye la caracterización del efecto de la FB₁ en la cinética de la ATPasa y en la fluidez de la membrana cuando la toxina es estudiada en condiciones *in vitro*. El segundo artículo intitulado **“Fumonisin B₁ inhibitory effects *in vivo*: decrease of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity is due to diminished levels of ceramide”** (en preparación para publicación en la revista *Journal of Biological Chemistry*, 2005), refiere los resultados de la adición de la toxina *in vivo*, describiendo los efectos observados en la actividad de la ATPasa, la fluidez y la permeabilidad membranales, la peroxidación de lípidos y la composición de esfingolípidos y ácidos grasos membranales. También se incluye un tercer manuscrito para ser publicado en las memorias del “XII. Internacional Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions” (Mérida diciembre 14-18, 2005) y que se titula **“Interplay at the interphase: fumonisin B₁, a fungal toxin and its effects on the plasma membrana from maize embryos”**. Adicionalmente, en el apéndice se incluye un capítulo de libro intitulado **“La membrana plasmática y su importancia en la patogénesis en plantas”** (En: *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas*. I. Bernal-Lugo y H. Loza-Tavera eds. UNAM. pp. 55-73. 2001).

Nora Gutiérrez-Nájera · Rosario A. Muñoz-Clares
Silvia Palacios-Bahena · Jorge Ramírez
Sobeida Sánchez-Nieto · Javier Plasencia
Marina Gavilanes-Ruiz

Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase

Received: 24 June 2004 / Accepted: 15 November 2004 / Published online: 10 February 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Fumonisin B₁ (FB₁) is an amphipathic toxin produced by the pathogenic fungus *Fusarium verticillioides* which causes stem, root and ear rot in maize (*Zea mays* L.). In this work, we studied the action of FB₁ on the plasma membrane H⁺-ATPase (EC 3.6.1.34) from germinating maize embryos, and on the fluidity and lipid peroxidation of these membranes. In maize embryos the toxin at 40 μM inhibited root elongation by 50% and at 30 μM decreased medium acidification by about 80%. Irrespective of the presence and absence of FB₁, the H⁺-ATPase in plasma membrane vesicles exhibited non-hyperbolic saturation kinetics by ATP-Mg, with Hill number of 0.67. Initial velocity studies revealed that FB₁ is a total uncompetitive inhibitor of this enzyme with an inhibition constant value of 17.5 ± 1 μM. Thus FB₁ decreased V_{max} and increased the apparent affinity of the enzyme for ATP-Mg to the same extent. Although FB₁ increased the fluidity at the hydrophobic region of the membrane, no correlation was found with its effect on enzyme activity, since both effects showed different FB₁-concentration dependence. Peroxidation of membrane lipids was not affected by the toxin. Our results suggest that, under in vivo conditions, the plasma membrane H⁺-ATPase is a potentially important target of the toxin, as it is inhibited not only by FB₁ but also by its structural analogs, the sphingoid intermediates, which accumulate upon the inhibition of sphinganine N-acyltransferase by this toxin.

Keywords Fumonisin B₁ · Maize embryos · Plasma membrane H⁺-ATPase · Membrane fluidity

Abbreviations BRIJ 58: Polyethylene glycol hexadecyl ether · BSA: Bovine serum albumin · CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone · DTE: 2,3-dihydroxybutane-1,4-dithiol · DPH: 1,6 diphenyl-1, 3, 5-hexatriene · EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid · MES: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid · TEA: Triethanolamine · TLCK: 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-L-2-heptanone · TPCK: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone · TRIS: 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

Introduction

Fumonisin B₁ (FB₁) is a toxin produced by *Fusarium verticillioides* and other *Fusarium* species which are common and ubiquitous pathogens of maize causing root, stalk and ear rot (Leslie 1996). FB₁ phytotoxic activity produces bleaching, electrolyte leakage and cell autolysis in *Datura stramonium* leaves (Abbas et al. 1992) and *Lemna paucicostata* fronds (Abbas et al. 1998), and also causes reduction of maize callus growth (Van Asch et al. 1992). FB₁ is structurally related to the AAL-toxin produced by the fungus *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Both toxins are potent inhibitors of the sphinganine N-acyltransferase, an endoplasmic reticulum enzyme (Wang et al. 1991), leading to disruption of ceramide biosynthesis and an accumulation of the sphingoid bases sphinganine and phytosphingosine (Abbas et al. 1994). Because of its amphipathic nature (Fig. 1), FB₁ promotes changes in fluidity and lipid peroxidation in liposomes and in animal cells (Yin et al. 1996a and b; Yin et al. 1998; Abado-Becognee et al. 1998; Ferrante et al. 2002). These results, together with the pleiotropic effects caused by FB₁ on the various systems tested, suggest that the toxin affects plasma

N. Gutiérrez-Nájera · R. A. Muñoz-Clares
S. Palacios-Bahena · S. Sánchez-Nieto · J. Plasencia
M. Gavilanes-Ruiz (✉)
Departamento de Bioquímica, Conj. E. Facultad de Química,
UNAM Cd. Universitaria, 04510 México DF, México
E-mail: gavilan@servidor.unam.mx
Tel.: + 52-55-56225275
Fax: + 52-55-56225329

J. Ramírez
Departamento de Genética Molecular,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM,
Apdo Postal 70242, 04510 México DF, México

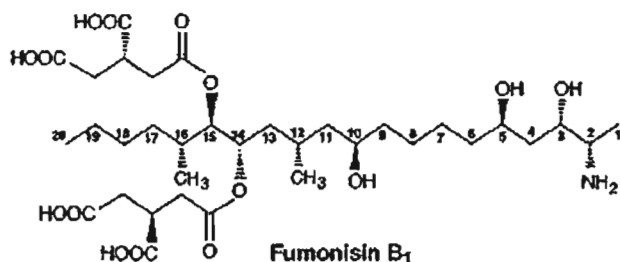


Fig. 1 Absolute configuration of FB₁ (Momany and Dombrink-Kurtzman 2001)

membrane enzymes also. Till date there are no reports in this respect.

The H⁺-ATPase is a 100 kDa protein with a soluble region and ten to twelve transmembrane stretches (Morsomme and Boutry 2000). It is the most abundant and important primary pump in the plant plasma membrane, hydrolyzing ATP to export H⁺ from the cytosol to the apoplastic space. The ΔpH and Δψ generated across the membrane are used to drive secondary transport of solutes and to facilitate cell elongation and stomata opening among other processes (Arango et al. 2003). This enzyme is a target for several fungal toxins and elicitors, which either inhibit or stimulate its activity (Wevelsiep et al. 1993; Marra et al. 1996; Simon-Plas et al. 1996; Xing et al. 1996). In this work, we describe the effect of FB₁ on the plasma membrane H⁺-ATPase in vesicles isolated from maize embryos, an experimental system that precludes the action of the toxin on intracellular targets thus allowing to study its early effects on the plasma membrane.

Materials and methods

Biological material

Maize embryos were manually dissected from dry seeds (hybrid H-355, obtained from PRONASE, Cortázar) and imbibed in petri dishes (18 cm diameter) with a layer of thick filter paper moistened with 10 ml of imbibition buffer (2% (w/v) sucrose, 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, and 10 μg/ml chloramphenicol). FB₁ (Sigma, St. Louis), dissolved in H₂O or H₂O/ acetonitrile (v/v) to obtain a 1 mM stock solution, was added to the imbibition buffer at the indicated final concentrations. Plates were incubated at 29°C in the dark for the indicated time periods. An embryo was considered as germinated when radicle length reached 2 mm as measured with vernier.

Purification of plasma membrane vesicles from maize embryos

Embryos imbibed for 24 h were frozen in liquid nitrogen in a mortar and homogenized until obtaining a fine

powder, which was suspended in a buffer containing 250 mM sucrose, 70 mM Tris-HCl (pH 8.0), 15 mM β-mercaptoethanol, 4 mM DTE, 2 mM EDTA, 1 mM ATP, 100 μg/ml TPCK, 50 μg/ml TLCK and 7 μg/ml chymostatin which were added fresh. Plasma membrane vesicles were purified by a two-aqueous polymers partitioning system as described by Sánchez-Nieto et al. (1997, 1998). Typically, the U2 fraction obtained had an ATPase activity that was 75–85% vanadate-sensitive.

Liposome preparation

Asolectin phospholipids (2.94 mg) from soybean (Sigma, St. Louis) were first washed with ether and acetone followed by mixing with 3.0 ml of 10 mM Hepes-Tris (pH 7.0) and sonication in an ice bath using a Branson Sonifier 250 (Danbury) with a 1 cm tip at 40 watts in 10 s pulses for 1 min.

Determination of medium acidification

Maize embryos previously imbibed in the presence or absence of FB₁ (as described under the Biological material section) were placed in 10 ml of medium containing 250 mM sucrose, and 2 mM MES-TEA, pH 6.0. Electrode potentials were continuously measured using a pH electrode (Cole Parmer 606428) connected to an ion analyzer (Beckman Selection 2000) and a computer. The pH electrode was previously equilibrated with the same solution. Calibration of the electrode was done by titrations with 0.1 N NaOH or HCl solutions. All assays were done at 30°C.

Determination of ATP hydrolysis

Five to ten microgram of membrane protein was added to 150 μl of medium containing 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM ATP-Tris (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 1 mM NaN₃, 7 μM CCCP, 0.015% (w/v) BRIJ 58 with and without FB₁ at the indicated concentrations and incubated for 1 h at 30°C. The reaction was stopped by the addition of 150 μl of 24% (w/v) SDS, and phosphate was quantified as described by González-Romo et al. (1992). Phosphate release was linear up to 2 h of incubation, both in the presence and absence of FB₁ and at all six substrate concentrations as indicated later. In all experiments, blanks to estimate non-enzymatic ATP hydrolysis were included. As azide (an inhibitor of the contaminant mitochondrial ATPase) was present in the assay, initial velocity data exclusively reflect the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase, as it was previously established in our system by Sánchez-Nieto et al. (1997, 1998) and therefore, the effect of FB₁ on this activity. Preincubation of the plasma membrane vesicles with FB₁ did not modify the effect of the toxin on ATPase activity.

For the saturation kinetics experiments, the amounts of ATP and $MgCl_2$ necessary to obtain the desired concentration of substrate-metal complex and free Mg^{2+} were calculated as described in Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares (1990) and Sánchez-Nieto et al. (1992, 1998), using the stability constants determined by O'Sullivan and Smitters (1979). The predominant complex in our conditions was $MgHATP^-$, which was varied from 0.05 mM to 8.11 mM while keeping free Mg^{2+} at 35 μM . Initial velocity data of ATP hydrolysis were analyzed using the nonlinear regression program Microcal Origin (Microcal Software, Inc., Northampton).

Determination of reversibility of FB_1 inhibition on the H^+ -ATPase activity

Plasma membrane vesicles (33.3 $\mu g/ml$) were exposed to 10 μM and 20 μM FB_1 dissolved in H_2O /acetonitrile 1/1 (v/v) in 1.5 ml of medium A: 250 mM sucrose, 20 mM MOPS-BTP (pH 7.0), 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM NaN_3 and 7 μM CCCP. After 1-h incubation at 30°C, the membranes were diluted in three volumes of 350 mM sorbitol, 2 mM HEPES-MES (pH 7.6), 1 mM KCl and 1 mM DTE. This suspension was centrifuged for 1 h at 80,000 g and 4°C, and the pelleted membrane vesicles were resuspended in 1.35 ml of medium A. ATPase activity was determined at time zero of incubation and after removal of the toxin. An additional wash step was performed for vesicles incubated with 40 μM FB_1 to ensure complete removal of toxin. Control membrane vesicles were similarly treated in parallel.

Measurement of plasma membrane fluidity

Membrane fluidity was measured by fluorescence depolarization of 1,6 diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) at excitation and emission wavelengths of 340 nm and 417 nm, respectively.

Plasma membrane vesicles (300 μg) isolated from maize embryos were added to a medium with 20 mM HEPES-TEA (pH 7.0) and 1 μM DPH up to a final volume of 2.0 ml, and incubated for 15 min before measuring fluidity at 30°C. Then, 1–50 μM FB_1 was directly added to the plasma membranes and fluorescence polarization was immediately recorded using a SLM-AMINCO 48000 spectrofluorometer (SLM Instruments Inc., Urbana).

Measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed by quantitating malonaldehyde-thiobarbituric acid adduct according to Ottolenghi (1959), or by measuring conjugated dienes as described by Recknagel and Glende (1984).

Protein determination

This was done according to the procedure of Peterson (1977) using BSA as standard.

Statistical analyses

All the experiments were performed at least in triplicate. Wherever indicated, the data were analyzed by the Student's *t* test ($P \leq 0.05$). Analysis of variance and comparison of means were performed using the Statistix Version 4 Analytical software (Tallahassee).

Results

Fumonisin B_1 phytotoxic effects

To test whether FB_1 was phytotoxic to isolated maize embryos, we measured the effect of FB_1 on radicle elongation, which is inhibited by the presence of toxin in the maize seeds (Dohelert et al. 1994). After 24-h of imbibition, radicle growth was 1.53 ± 0.18 cm in the control embryos and 0.72 ± 0.23 , 0.92 ± 0.18 , and 0.68 ± 0.11 cm in embryos imbibed in the presence of 10, 20 and 40 μM FB_1 , respectively.

Maize embryos exposed to the toxin showed a marked decrease in medium acidification, which at 28 min reached 78% inhibition as compared to the control, suggesting that the H^+ -ATPase from plasma membrane was a possible target of the FB_1 (Fig. 2).

Effect of FB_1 on ATP hydrolysis by the plasma-membrane H^+ -ATPase

H^+ -ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from maize embryos was measured, both in the absence or presence of micromolar concentrations of

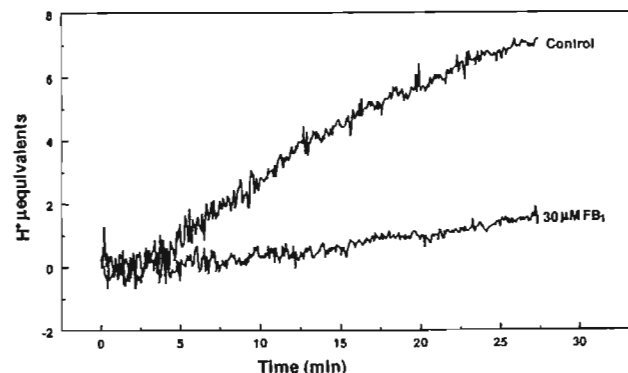


Fig. 2 Effect of fumonisin B_1 on medium acidification by maize embryos. Thirty maize embryos previously imbibed in the presence or absence of 30 μM FB_1 were added to the acidification medium and pH recording was carried out for the indicated time, as described under Materials and methods

Table 1 Reversibility of the inhibition of the maize embryo plasma membrane H⁺-ATPase by FB₁

FB ₁ (μM)	ATPase activity (nmol Pi mg ⁻¹ h ⁻¹)	
	-wash	+ wash
0	3216 ± 138	3,287 ± 61 ^a
10	2,733 ± 56	3,344 ± 76 ^a
40	2,207 ± 46	2,452 ± 173 ^a 3,008 ± 314 ^b

Plasma membrane vesicles were isolated from 24 h imbibed maize embryos and ATP hydrolysis was assayed in presence or absence of 10 μM or 40 μM FB₁. After that, plasma membrane vesicles were diluted 1/4 (v/v) with washing medium and concentrated by centrifugation. ATP hydrolysis was measured in washed vesicles

^aValues obtained after the first wash.

^bValues obtained after second wash. Data are means of three independent experiments ± SD

FB₁. Data in Table 1 shows that ATPase activity was inhibited 15% and 30% in the presence of 10 μM and 40 μM FB₁, respectively, and that the inhibition was reversible, as the original activity was totally restored after the removal of the toxin from the assay medium.

The saturation kinetics of the plasma membrane H⁺-ATPase by ATPHMG in the presence of FB₁ was determined in order to ascertain the type and degree of inhibition. The response of the enzyme to the inhibitor is depicted in Fig. 3. The best fit of the initial velocity data was obtained with the Hill equation (Eq. 1)

$$v = V_{\max} S^n / (S_{0.5}^n + S^n) \quad (1)$$

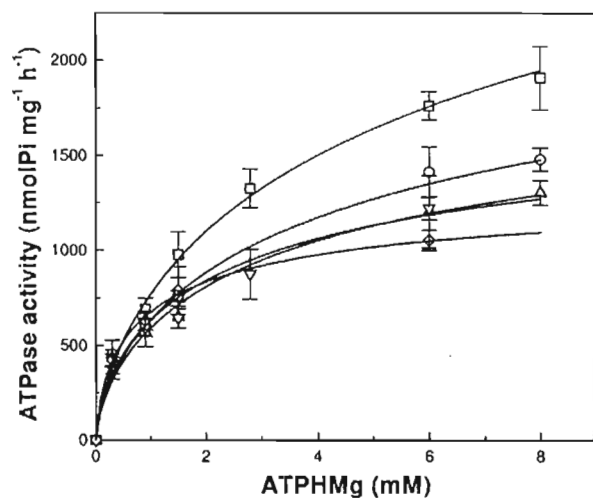


Fig. 3 Effect of FB₁ on the kinetics of the plasma membrane H⁺-ATPase from maize embryos. ATP hydrolysis was measured in a medium containing 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM ATP-Tris (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 1 mM NaN₃, 7 μM CCCP and 0.015% (w/v) BRIJ 58. The hydrolysis reaction was started by adding 10 μg of membrane protein. The extent of reaction was measured by quantifying the phosphate released at the indicated ATPHMG concentrations in the presence of: 0 (■), 5 (●), 10 (▲), 20 (▼) and 50 (◆) μM FB₁. Points are the means ± SD of experimental data from six independent experiments. Lines are the result of the best fit of the data to Eq. 1

where V_{\max} is the maximum velocity, S is the substrate concentration, n is the Hill number, and $S_{0.5}$ is the substrate concentration that gives half maximum velocity.

Hill numbers of 0.67 were obtained in all saturation curves, suggesting negative cooperativity. Although most of the kinetics studies on this enzyme have reported a Michaelian behavior, negative cooperativity has also been described (Ramos et al. 1994; Roberts et al. 1995). However, no experimental evidence supporting the mechanism underlying this negative cooperativity has been provided. Regardless of the mechanism, it appears not to be altered by FB₁, as the toxin did not modify the Hill number.

Fumonisin B₁ caused a reduction in both V_{\max} and $S_{0.5}$ values, suggesting an uncompetitive inhibition (Fig. 4), which is explained through the interaction of the inhibitor with the enzyme substrate complex. If the toxin binds to the enzyme in a non-cooperative manner, as it would be shown later, and the inhibition is total, the velocity data could be fitted to a modified Hill equation (Eq. 2), which accounts for uncompetitive inhibition in the case of cooperative binding of the substrate:

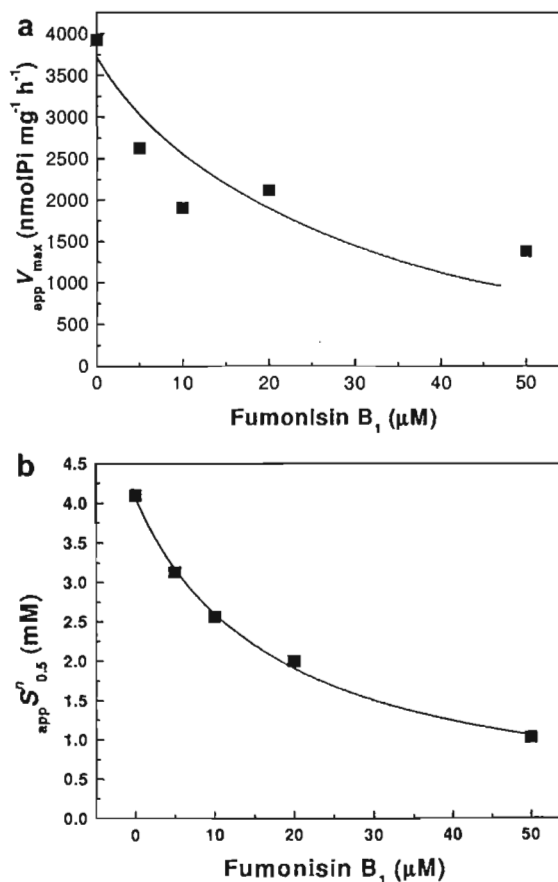


Fig. 4 Replots of app V_{\max} (a) and app $S_{0.5}$ (b) values versus FB₁ concentration. Points are the apparent kinetic parameters estimated from the fit of the experimental data shown in Fig. 3 to Eq. 1. Lines are the result of the best fit of the data to Eq. 3 or 4, as appropriate

$$v = V_{\max} S^n / \{S_{0.5}^n + S^n(1 + I/K_{iu})\} \quad (2)$$

where I is the inhibitor concentration, K_{iu} is the uncompetitive inhibition constant, and the other parameters are as defined above.

From Eq. 2 it can be seen that V_{\max} and $S_{0.5}^n$ values are decreased by $(1 + I/K_{iu})$, leading to an apparent increase in the affinity of the enzyme for the substrate in the presence of the toxin. Replots of the apparent values for the kinetic parameters, obtained in the presence of the inhibitor, versus inhibitor concentration can be used to estimate K_{iu} by using either Eq. 3 or 4:

$$\text{app}V_{\max} = V_{\max}/(1 + I/K_{iu}) \quad (3)$$

$$\text{app}S_{0.5}^n = S_{0.5}^n/(1 + I/K_{iu}) \quad (4)$$

The plot in Fig. 4a shows that V_{\max} values can be fitted to Eq. 3, giving a K_{iu} of $19.15 \pm 7.93 \mu\text{M}$. Also, the $\text{app}S_{0.5}^n$ values described a hyperbola and can be accurately fitted to Eq. 4, giving a very similar, but much better defined, K_{iu} , $17.51 \pm 0.99 \mu\text{M}$ (Fig. 4b).

Effect of FB₁ on membrane fluidity

In order to correlate the effects of FB₁ on the plasma membrane H⁺-ATPase with other membrane phenomena affected by the toxin, we measured the fluidity of plasma membrane vesicles in the presence of the toxin. In liposomes, DPH fluorescence was not affected by interaction with FB₁ (Fig. 5a), whereas in plasma membrane vesicles FB₁ produced a concentration-dependent, exponential decrease of membrane rigidity, which reached a plateau at concentrations above 2.5 μM FB₁ (Fig. 5b). FB₁ concentration producing half of the maximal change in fluidity after 15 min of incubation was estimated at $0.77 \pm 0.2 \mu\text{M}$. The kinetics of the fluorescence polarization changes at low (2.5 μM), and high (50 μM) fumonisin B₁ concentrations (Fig. 6a) were pseudo-first order, and the data fitted well to a single exponential decay equation (Eq. 5):

$$P = P_0 e^{-kt} + P_1 \quad (5)$$

where P , P_0 , and P_1 are the fluorescence polarization values at time t , zero, and infinite, respectively, after FB₁ addition, and k is the rate constant of the change in fluorescence polarization. The half-time for the change in fluidity was 0.92 min. Interestingly, the FB₁ effect on membrane fluidity was saturable, as shown by the hyperbolic replots of the maximum fluidity change, P_1 , versus toxin concentration (Fig. 6b). The FB₁ concentration that produced half of the maximum change was estimated to be $0.92 \pm 0.14 \mu\text{M}$, which is much lower than the K_{iu} values found in the inhibition experiments.

Effect of FB₁ on lipid peroxidation

It has been reported that FB₁ promotes lipid peroxidation in liposomes (Yin et al. 1996a, 1998) and cell

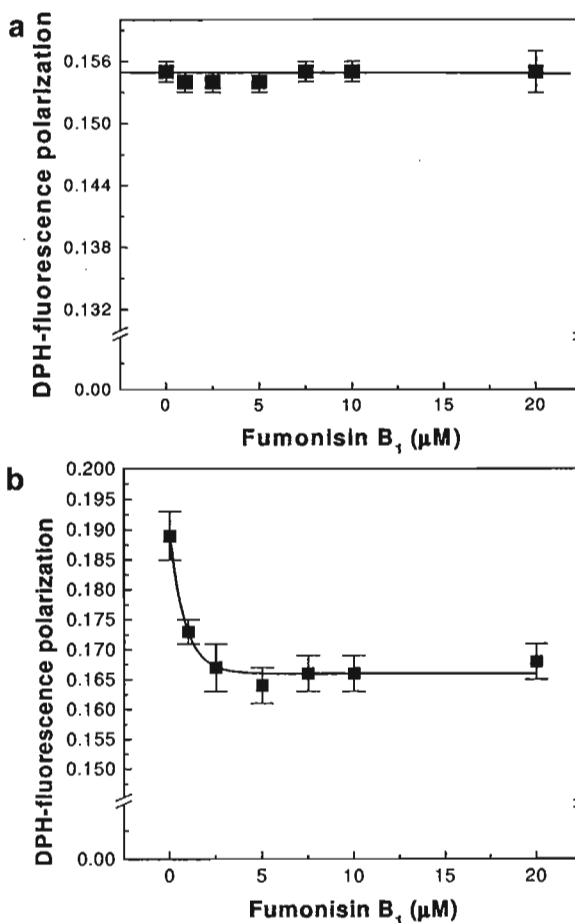


Fig. 5 Effect of FB₁ concentration on fluidity of liposomes (a) and maize embryos plasma membrane (b). Soybean phospholipids (0.975 mg/ml) were sonicated to obtain liposomes. After addition of the indicated FB₁ concentration, DPH-fluorescence polarization was measured. Plasma membrane vesicles were obtained as described under Materials and methods and preincubated with DPH for 15 min. Then, the indicated concentrations of FB₁ were added and DPH-fluorescence polarization was immediately measured. Points are the means \pm SD of experimental data from six independent experiments. In Fig. 5b, the line is the result of the best fit of the data to a single exponential decay equation

membranes (Abado-Becognee et al. 1998; Ferrante et al. 2002). However, we did not find any effect of FB₁ in plasma membrane vesicles from maize embryos at the concentrations tested: conjugated dienes levels were $0.471 \pm 0.008 \text{ ODU mg}^{-1}$ protein in control plasma membrane vesicles, and 0.453 ± 0.018 , and 0.476 ± 0.011 in vesicles exposed to 10 μM or 20 μM FB₁, respectively.

Discussion

The H⁺-ATPase activity from plasma membrane has been reported to participate in the elongation process of maize coleoptiles (Hager et al. 1991; Frias et al. 1996; Rober-Kleber et al. 2003). It is then possible that the 50% decrease of radicle elongation observed in FB₁-

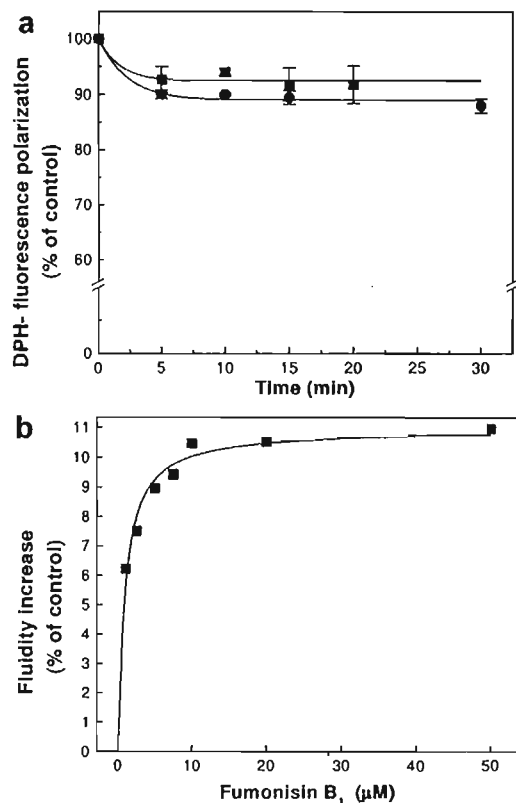


Fig. 6 Time-course of the FB₁ effect on the fluidity of maize embryos plasma membrane. **a** Plasma membrane vesicles were exposed to 2.5 (■), and 50 (●) μM FB₁. DPH-fluorescence was measured at the times indicated after toxin addition. The data were fitted to Eq. 5. **b** Replot of the percentage of fluidity increase at infinite time (P_1) versus FB₁ concentration. Data were fitted to the equation of a rectangular hyperbola

treated maize embryos is, at least in part, due to the inhibition of this enzymatic activity by the toxin, as it is also supported by the FB₁ inhibition on medium acidification. However, the pleiotropic action of the toxin *in vivo* and the many biochemical pathways involved in the elongation process may include other cell targets of the toxin as well (Abbas et al. 1994). Thus, the inhibiting action of FB₁ on α -amylase secretion during root emergence (Dohelert et al. 1994) can be other factor that participates in the inhibition of radicle elongation in whole seeds.

We found that FB₁ inhibits this enzyme with a K_i value within the concentration range in which orthovanadate, a standard inhibitor of this ATPase, inhibits (O'Neill and Spanswick 1984). Fumonisin B₁ is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase from maize embryos, not only because of its high affinity for the enzyme, but mainly for the uncompetitive nature of the inhibition. Uncompetitive inhibition is the most effective type of inhibition, and it has been reasoned that it is extremely rare in nature because of the risk it poses for metabolism (Cornish-Bowden 1986).

Uncompetitive ATPase inhibition indicates an interaction of the toxin with a region of the enzyme different

from the active site. The activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is profoundly affected (inhibited or activated) by exogenous amphiphiles (Sandstrom and Cleland 1989; Palmgren et al. 1990; Kasamo et al. 1995), which apparently interrupt the continuity between specific lipids and the protein. Therefore, instead of a direct interaction with the protein, the toxin may intercalate between the enzyme and bound phospholipids or sterols required for its activity (Kasamo 1990; Cooke et al. 1994; Burgos and Donaire 1996), thus producing inhibition.

A similar interpretation was given for the fungal toxin beticolin-1, which displays two different types of H⁺-ATPase inhibition depending on the lipid environment of the enzyme (Simon-Plas et al. 1996). This possible mechanism of action is supported by the following evidences: (i) In our conditions, FB₁ is able of interacting with the hydrophobic region of the membrane, as shown by the toxin-induced changes in membrane fluidity, and (ii) FB₁ can be inserted into liposome bilayers (Yin et al. 1996b) and interacts with polar and non-polar regions of cholesterol and taurocholate in monomolecular films (Mahfoud et al. 2002), thus one toxin molecule might also be inserted between two adjacent cholesterol molecules. A third alternative mechanism involving the action of FB₁ on regulatory proteins of the ATPase cannot be ruled out at present, and deserves further study. This kind of mechanism of action has been shown for the fusicoccin activation of the H⁺-ATPase (Olsson et al. 1998).

Fumonisin B₁ has a fluidifying effect in plant plasma membranes, similar to that documented in animal cells (Abado-Becognee et al. 1998; Ferrante et al. 2002) and liposomes (Yin et al. 1996b; Yin et al. 1998). However, FB₁ inhibitory activity on plasma membrane H⁺-ATPase was not dependent on the changes observed on membrane fluidity since the two phenomena showed distinct FB₁-concentration responses. This is in agreement with reports showing that plasma membrane H⁺-ATPase activity is not affected by changes in membrane fluidity (Cooke et al. 1994; Burgos and Donaire 1996). FB₁-mediated increase in membrane fluidity is not likely due to binding of the toxin to membrane sterols, as saturation was observed at very low toxin concentrations and sterols are very abundant in maize plasma membranes (Cowan et al. 1993; Bohn et al. 2001). Lipid peroxidation can be discarded also, as conjugated dienes levels were not modified in isolated maize-embryo plasma membranes at the toxin concentrations employed. Our results are in contrast with the reports of increased lipoperoxidation induced by FB₁ in liposomes (Yin et al. 1996a, 1998) and mammalian cells (Abado-Becognee et al. 1998; Ferrante et al. 2002). However, it must be pointed out that the former authors employed millimolar toxin concentrations, and that the latter carried out lipid peroxidation measurements in total membrane fractions. Differences in lipid composition cannot be excluded either.

The observed effects of FB₁ in our in vitro experiments suggest analogous effects in vivo shortly after the exposure of plasma membranes to toxin. In addition, it must be considered that in intact tissues, FB₁ inhibits sphinganine N-acyltransferase, leading to an increase in the endogenous sphingoid bases sphinganine and phytosphingosine (Abbas et al. 1994), which are structural analogs of FB₁. Preliminary results in our laboratory indicate that sphinganine or phytosphingosine do inhibit the plasma membrane H⁺-ATPase from maize embryos (results not shown), and that this inhibition is not additive to that caused by FB₁. It is relevant that sphingosine is a potent inhibitor of animal ATPases, such as the plasma membrane Na⁺/K⁺ ATPase (Oishi et al. 1990) and the Ca²⁺ ATPase (Pandol et al. 1994). Therefore, it seems possible that both FB₁ and the endogenous sphingoid compounds inhibit the enzyme in vivo. If this is the case, the toxin would alter the enzyme by two mechanisms: indirectly by rising the levels of the endogenous sphingoid compounds (through its action on sphinganine N-acyltransferase), and directly by the uncompetitive inhibition documented in this study.

Many physiological processes such as cell nutrition, elongation, and ion homeostasis can be impaired by the inhibition of the plasma membrane H⁺-ATPase (Morsomme and Boutry 2000; Arango 2003). In addition, the H⁺-ATPase has been considered a "switch" participating in signal transduction pathways in response to pathogens (Schaller and Oecking 1999). Therefore, it will be relevant to reveal if the action of FB₁, or of its endogenous structural analogs sphinganine and phytosphingosine on the ATPase activity forms part of the plant responses to the pathogen interaction. It remains to be established whether this could be one, as yet not described, of the possible roles for the cell sphingoid compounds (Worrall et al. 2003).

Acknowledgements We thank C. Enríquez-Arredondo and L. Fabila-Ibarra for technical assistance, Dr. Antonio Peña for the use of his facilities at the Instituto de Fisiología Celular, and Drs. R. Moreno-Sánchez and A. Gómez-Puyou for discussion and critical revision of the manuscript. This project was financed by DGAPA-PAPIIT (grants No. IN204097 and IN208300) and CONACyT (grant No. 25131-B and 40311-Q). NGN was recipient of a fellowship from CONACyT and DGAPA, UNAM, México.

References

- Abado-Becognee K, Mobio TA, Ennamany R, Fleurat-Lessard F, Shier WT, Badria F, Creppy EE (1998) Cytotoxicity of FB₁: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. *Arch Toxicol* 72:233–236
- Abbas HK, Paul RN, Boyette CD, Duke SO, Vesonder RF (1992) Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can J Bot* 70:1824–1833
- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges I, Sessions AE, Wang E, Merrill AHJr, Riley R (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 106:1085–1093
- Abbas HK, Duke SO, Merrill AHJr, Wang E, Shier WT (1998) Phytotoxicity of Australifungin, AAL-toxins and FB₁ to *Lemma paucicostata*. *Phytochemistry* 8:1509–1514
- Arango M, Gévaudant F, Oufattole M, Boutry M (2003) The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 216:355–365
- Bohn M, Heinz E, Lutge S (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L) roots. *Arch Biochem Biophys* 387:35–40
- Burgos PA, Donaire JP (1996) Phospholipids, free sterols, fluidity and ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles from sunflower and jojoba roots. *Plant Physiol Biochem* 34:315–324
- Cooke DT, Burden RS, James CS, Seco T, Sierra B (1994) Influence of sterols on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. *Plant Physiol Biochem* 32:769–773
- Cornish-Bowden A (1986) Why is uncompetitive inhibition so rare? A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides. *FEBS Lett* 203:3–6
- Cowan DSC, Cooke DT, Clarkson DT, Hall JL (1993) Lipid and sterol composition of plasma membranes isolated from stele and cortex of maize roots. *J Exp Bot* 44:991–994
- Doehlert DC, Knutson CA, Vesonder RF (1994) Phytotoxic effects of FB₁ on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127:117–121
- Ferrante MC, Meli R, Raso JM, Esposito E, Severino L, Di Carlo G, Luscisano A (2002) Effect of fumonisin B₁ on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicol Lett* 129:181–187
- Frías I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviñó JP, Culiñeaz-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8:1533–1544
- González-Romo P, Sanchez-Nieto S, Gavilanes-Ruiz M (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem* 200:235–238
- Hager A, Debus G, Edel H-G, Stransky H, Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185:527–537
- Kasamo K (1990) Mechanism for the activation of plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L) culture cells by molecular species of a phospholipid. *Plant Physiol* 93:1049–1052
- Kasamo K, Sakakibara Y (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci* 111:117–131
- Leslie JF (1996) Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In: Jackson LS, De Vries JW, Bullerman LB (eds) Fumonisin in food advances in experimental medicine and biology vol 392. Plenum Press, New York, pp 153–164
- Mahfoud R, Maresca M, Santelli M, Pfohl-Leszkoewicz A, Puigserver A, Fantini J (2002) pH dependence interaction of fumonisin B₁ with cholesterol: physicochemical and molecular modeling studies at the air-water interphase. *J Agric Food Chem* 50:327–331
- Marra M, Fogliano V, Zambardi A, Fullone MR, Nasta D, Aducci P (1996) The H⁺-ATPase purified from maize root plasma membranes retains fusicoicin in vivo activation. *FEBS Lett* 382:293–296
- Momany FA, Dombrink-Kurtzman MA (2001) Molecular dynamics simulations on the mycotoxin fumonisin B₁. *J Agric Food Chem* 49:1056–1061
- Morsomme P, Boutry M (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:1–16
- Oishi K, Zheng B, Kuo JF (1990) Inhibition of Na, K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J Biol Chem* 265:70–75

- Olsson A, Svanellid FEB, Sommarin M, Larsson C (1998) A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H^+ -ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol* 118:551-555
- O'Neill SD, Spanswick MR (1984) Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol* 75:586-591
- O'Sullivan WJ, Smithers GW (1979) Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol* 63:294-336
- Ottolenghi A (1959) Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophys* 79:355-363
- Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskov P, Larsson C (1990) Effect of detergents on the H^+ ATPase activity of inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1021:133-140
- Pandolfi SJ, Scheffield-Payne MS, Gukovskaya AS, Rutherford RE. (1994) Sphingosine regulates Ca^{2+} ATPase and reloading of intracellular Ca^{2+} stores in the pancreatic acinar cell. *Biochim Biophys Acta* 1195:45-50
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356
- Ramos RS, Caldeira MT, Aruda P, de Meis L (1994) The two K_m 's for ATP of corn root H^+ -ATPase and the use of glucose-6-phosphate and hexokinase as an ATP regenerating system. *Plant Physiol* 105:853-859
- Recknagel RO, Glende EA (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 105:331-337
- Rober-Kleber N, Albretchová JTP, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Fischer-Iglesias C (2003) Plasma membrane H^+ -ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol* 131:1302-1312
- Roberts G, Berberian L, Beaugé L (1995) Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H^+ -ATPase from higher plants. *Plant Physiol* 108:813-819
- Rodríguez-Sotres R, Muñoz-Clares RA (1990) Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 276:235-238
- Sánchez-Nieto S, Rodríguez-Sotres R, González-Romo P, Bernal-Lugo I, Gavilanes-Ruiz M (1992) Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize lines of high or low vigour. *Seed Sci Res* 2:105-111
- Sánchez-Nieto S, García-Rubio O, Pacheco-Moisés F, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes-Ruiz M (1997) Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiol Plant* 101:157-164
- Sánchez-Nieto S, Tuena de Gómez-Puyou M, Rodríguez-Sotres R, Carballo A, Gavilanes-Ruiz M (1998) Comparison of plasma membrane H^+ -ATPase in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim Biophys Acta* 1414:175-187
- Sandstrom RP, Cleland RE (1989) Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. *Plant Physiol* 90:1524-1531
- Schaller A, Oecking C (1999) Modulation of plasma membrane H^+ -ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11:263-272
- Simon-Plas F, Gomès E, Milat ML, Pugin A, Blein JP (1996) *Cercospora beticola* toxins X Inhibition of plasma membrane H^+ -ATPase by beticolin-I. *Plant Physiol* 111:773-779
- Van Asch MAJ, Rijkenberg FHJ, Coutinho TA (1992) Phytotoxicity of FB_1 , moniliformin, and T-2 corn callus cultures. *Phytopathology* 82:1330-1332
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* 266:14486-14490
- Wevelslep L, Rüpping E, Knogge W (1993) Stimulation of barley plasmalemma H^+ -ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol* 101:297-301
- Worrall D, Ng CK, Hetherington AM (2003) Sphingolipids, new players in plant signalling. *Trends Plant Sci* 8:317-320
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E (1996) Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Cell* 8:555-564
- Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA (1996a) Effects of fumonisin B_1 on oxygen transport in membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 225:250-255
- Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Troy AL, Page SW, Sphon JA (1996b) Effects of FB_1 and (hydrolyzed) fumonisin backbone API on membranes: A spin-label study. *Arch Biochem Biophys* 335:13-22
- Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA (1998) Effects of FB_1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1371:134-142

FUMONISIN B₁ INHIBITORY EFFECTS *IN VIVO*: DECREASE OF PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPase ACTIVITY IS DUE TO DIMINISHED ENDOGENOUS LEVELS OF CERAMIDE

Nora Gutiérrez-Nájera¹, Laura Carmona-Salazar¹, Liliana Noyola-Martínez¹, Christian Vázquez-Vázquez¹, Mohammed El Hafidi², Javier Plasencia¹ and Marina Gavilanes-Ruiz¹

From ¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Cd. Universitaria. 04510, México D. F. México. ²Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano 1. 14080, Tlalpan, México D. F. México.

Running title: Plant H⁺-ATPase activity is inhibited by FB₁

Correspondence address to: Marina Gavilanes-Ruiz, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Conj. E., Cd. Universitaria. 04510 México, D. F., México. Tel. 5255 5622-5275; Fax. 5255 5622-5329; E-mail: gavilan@servidor.unam.mx

Fumonisin B₁ (FB₁) is a mycotoxin that modifies the lipid phase properties of membranes and inhibits the sphinganine N-acyl transferase, perturbing the sphingolipid cell balance. The aim of this work was to determine the effect of FB₁ on the plant plasma membrane, when the toxin is added to germinating maize embryos. Plasma membrane fluidity was measured by DPH-fluorescence polarization and permeability by measuring electrolyte leakage from the embryos. FB₁ addition to the maize embryos diminished plasma membrane fluidity and increased electrolyte leakage. Treatment with FB₁ also caused a 7-fold increase in sphinganine, whereas phytosphingosine and fatty acid composition remained unvaried. FB₁ addition to the maize embryos caused a 30% inhibition on the plasma membrane H⁺-ATPase activity, which was not associated to the other observed changes in the membrane and that was relieved by the simultaneous addition of FB₁ and ceramide. H⁺-ATPase was immuno-detected in detergent-resistant membranes isolated from the plasma membrane embryos. These results indicate that exposition of the plant cell to the toxin elicits disruptive alterations in the membrane and reveal that ceramide is a lipid physiologically required for the plasma membrane H⁺-ATPase activity. This is in agreement with recent findings that indicate that this enzyme resides in detergent-resistant plasma membrane domains.

The plant plasma membrane is the boundary of the cell and constitutes an important barrier against pathogenic microorganisms. Changes in the plasma membrane during fungal infection may be produced by secondary metabolites, such as toxins synthesized by the pathogen (1). Microbial toxins, such as

syringomicin, fusiccocin and beticolins, as well as fungal elicitors modify some properties and enzymatic activities of the plasma membrane from the host (2-6). Fumonisin B₁ (FB₁) is a mycotoxin produced by *Fusarium verticillioides*, the major ear rot fungus of corn and an important pathogen of stored grains worldwide (7). FB₁ inhibits radicle elongation and amylase production in germinating seeds (8). In animals, FB₁ produces equine leucoencephalomalacia, porcine pulmonary edema, and rodent hepatic cancer among other toxic effects (9, 10, 11). Consumption of *F. verticillioides*-contaminated corn has been correlated with increased risk of human esophageal cancer in Southern Africa (12). Three molecular targets of the FB₁ have been described in plants so far: sphinganine N-acyl transferase (SAT) (13), low pHi α -amylase isoforms (8), and the plasma membrane H⁺-ATPase (14).

FB₁ is the diester of propane-1,2,3-tricarboxylic acid and 2-amino-12,16-dimethyl, 3,5,10,14,15-pentahydroxyicosane with both C-14 and C-15 hydroxy groups esterified to the terminal carboxy groups of the acids (9, 15). FB₁ interacts with lipid bilayers. Experiments with liposomes have shown that FB₁ perturbed membrane order, and increased the permeability to oxygen and lipid peroxidation (16-18). In addition, FB₁ produces changes in cholesterol levels and in the fatty acid profile of membrane phospholipids from rat hepatocytes (19). We have determined that FB₁ directly interacts with plant plasma membranes, increasing the fluidity in the hydrophobic region of the bilayer and inhibiting the plasma membrane H⁺-ATPase (14). This enzyme is a key enzyme in the plant cell physiology, since it produces a transmembrane H⁺ gradient which drives secondary transport of

solutes for cell nutrition, promotes cell elongation and stomata opening (20, 21).

It is well established that FB₁ disrupts the biosynthesis of sphingolipids by inhibiting the sphinganine *N*-acyl transferase (SAT), therefore increasing the levels of precursor long chain bases (LCB) and decreasing ceramide, the product of the reaction, in both plant and animal cells (13, 22).

In this work, we added FB₁ to maize embryos in order to evaluate the effects of the toxin on isolated plasma membrane vesicles, demonstrating that FB₁ induces plasma membrane alterations through the perturbation of sphingolipid biosynthesis: a decrease in endogenous ceramide levels caused a H⁺-ATPase inhibition and an increase in sphinganine levels altered plasma membrane properties.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials-FB₁, sphinganine, phytosphingosine, and N-Hexanoyl-D-Erythro-sphingosine (C6:0 ceramide), were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and N-Palmitoyl-D-Erythro-sphingosine (C16:0 ceramide) from ICN (Irvine, CA). Optiprep and 1,6 diphenyl-1,3,5-hexatrieno (DPH) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Triton X-100 was purchased from Pierce (Rockford, Ill). Antibody against the beet plasma membrane H⁺-ATPase was a kind gift from Dr. Luis E. González de la Vara (CINVESTAV, Irapuato, México). Antibody against 14-3-3 β isoform was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Phosphatase alkaline-conjugated goat anti-rabbit IgG was obtained from Sigma (St. Louis, MO). Uridine diphosphate glucose, [glucose-1-³H] was purchased from NEN Life Sciences Products, Inc. (Boston, MA). All the other chemicals were of the highest purity available.

Imbibition of maize embryos-Maize (*Zea mays*, landrace Chalqueño) embryos were manually dissected from dry seeds, imbibed and supplemented with FB₁ dissolved in H₂O or with sphinganine, phytosphingosine or ceramide dissolved in ethanol and incubated at 29 °C for 24 h as described previously (14).

Measurement of electrolyte leakage-Maize embryos (20 embryos) were imbibed with or without FB₁ for 24 h and then were transferred to deionized water, where electrical conductivity

was measured with a conductimeter CONMET1 (Hanna Instruments, Padova, Italy) for 1-1.5 h at 25 °C and compared to the conductivity of deionized water. When the measurement was finished, the sample of water and embryos was boiled for 10 min, cooled to 25 °C and the electric conductivity was determined and used as total electrolytes of the sample in order to calculate the percent of electrolytes released into the deionized water, during the period of measurement.

Isolation of plasma membrane vesicles-Embryos imbibed for 24 h were frozen and homogenized as described previously (14) and then plasma membranes were isolated by the procedure in (23) until the obtention of the U₂ fraction. The membrane suspension had an ATPase activity that was 4-fold enriched in GSII activity (a plasma membrane marker) (24) and was 75-85% vanadate-sensitive. This plasma membrane fraction was aliquoted and stored at -70 °C.

Isolation of solubilization-detergent-resistant membranes-Purified plasma membrane vesicles obtained from maize embryos were resuspended in TNE buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA) supplemented with Triton X-100 at a final concentration of 1 % and then incubated at 4 °C for 30 min. An Optiprep solution was added to give a final concentration of 40% followed by addition of 1.2 ml of a 30% Optiprep solution in TNEX buffer (TNE buffer plus 1% Triton X-100 final concentration) and 0.2 ml of TNEX solution. Samples were centrifuged at 250,000 x g at 4 °C for 2 h. The resulting gradient was divided in six equal-volume fractions and the first upper fraction was centrifuged at 100,000 x g at 4 °C for 1 h and the resulting pellet (detergent resistant membranes or DRM) was resuspended in TNE solution supplemented with a cocktail of protease inhibitors (complete from Roche, Nutley NJ) at 40 µg/ml. Samples were kept at -70 °C until use.

Determination of ATP hydrolysis-This was done in the conditions used previously (14), quantitating phosphate release from ATP as described (25). Phosphate release was linear up to 2 h of incubation, both in the presence and absence of FB₁ or the sphingolipids. Blanks to estimate non-enzymatic ATP hydrolysis were included and preincubation of the plasma membrane vesicles with FB₁ or the sphingolipids did not modify the effect on ATPase activity. The amounts of ATP and MgCl₂ necessary to

obtain the desired concentration of substrate-metal complex and free Mg^{2+} were calculated as described (26-28), using the stability constants determined by O'Sullivan and Smitters (29). The predominant complex in our conditions was $MgHATP^-$, whose concentration was 8.11 mM while keeping free Mg^{2+} at 35 μ M.

Measurement of plasma membrane fluidity-Plasma membrane fluidity was measured by fluorescence depolarization of 1,6 diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) as reported (14).

Determination of glucan synthase (GSII) activity-Glucan synthase activity was measured by incorporation of glucose monomers into glucan chains as follows: plasma membrane vesicles (40 μ g protein) were added to 100 μ l of reaction medium containing 330 mM sucrose, 20 mM cellobiose, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 16% glycerol, 0.02% digitonine, 5 mM $CaCl_2$, 2 mM spermine, 2 mM DTT, and 5 mM $MgCl_2$, 4 mM EGTA, 2 mM UDPG-glucose and 0.02 μ Ci UDPG-(3H)-glucose. After 30 min incubation at 30 °C, reaction was arrested by addition of 70% cold ethanol and 2 mM UDPG-glucose, then incubated at 4 °C for 30 min and overnight at -20 °C. The precipitate was then recovered and dried in 3 MM Whatman filter paper circles washed twice with 70% cold ethanol. When dry, filters were washed twice with a fresh solution of 0.5 M ammonium acetate in 30% ethanol (pH 3.6). The filters were allowed to dry and radioactivity counted in 4 ml scintillation liquid. Appropriate blanks were introduced in the assay.

Determination of FB_1 -Extraction of FB_1 was carried out from plasma membranes vesicles (300-500 μ g of membrane protein in 200 μ L) isolated from control or FB_1 -imbibed maize embryos and supplemented with 1mL of acetonitrile/water (60/40, v/v) and vortexed for 15 min. This mixture was centrifuged at 12000 rpm during 15 min in a microcentrifuge (Sorvall, MC12), the supernatant was transferred to a vial and evaporated with hot air under nitrogen flow to dryness. The residue was resuspended in 100 μ L of acetonitrile/water (1/1, v/v), supplemented with 400 μ L of 1% KCl, mixed and loaded to a solid-phase extraction cartridge (Sep-Pak C_{18} , Waters/Millipore, Milford MA), that was previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of 1% KCl (w/v). After the sample passed through the column, this was washed with 2 mL of 1% KCl and then with 2 mL of acetonitrile-water (1/5, v/v). FB_1 was eluted with

2 mL of acetonitrile/water (7/3, v/v), collected and evaporated to dryness. The residue was resuspended in 100 μ L of acetonitrile/water (1/1, v/v). FB_1 recovery was assessed adding 4 nmol of FB_1 to control membranes at the start of the procedure and then determined after the extraction procedure was followed. Quantitation of FB_1 was done by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) essentially based on the method previously reported (30). Briefly, the separation of the samples was conducted using a SuperCosil LC-18-Si reversed-phase column (15 cm x 4.6 mm, particle size 5 μ m) and an isocratic solvent system (methanol/ NaH_2PO_4 0.1 M, pH 3.3, at 68/32, v/v, with phosphoric acid). FB_1 from the sample or the standard solution (1 mM dissolved in acetonitrile/water 1/1, v/v) reacted with o-phthalaldehyde (OPA) reagent (2.5 mg OPA dissolved in 50 μ L of ethanol, 2.45 ml of 3% boric acid, pH 10.5 and 2.5 μ l of 2-mercaptoethanol) to obtain the fluorescent derivatives. The reaction mixture contained 10 μ L of sample, 50 μ L of OPA solution, 190 μ L of mobile phase without phosphoric acid and 50 μ L of 5 mM K_2HPO_4 . It was incubated one min and then injected to a Shimadzu chromatograph (model LC-10AD) with a fluorescence detector, using 335 and 440 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. A standard curve of FB_1 dissolved in acetonitrile/water (1/1, v/v) in the range from 0.0166 to 0.0667 pmol was done.

Measurement of LCB from plasma membranes-LCB bases were measured by the procedure previously described (31). 100 μ g of microsomal or plasma membrane protein were supplemented with 1.5 ml of a solution containing 9 mM KCl, 19 mM KOH and the mixture was extracted with 4 ml of ethyl acetate by gentle rotation for 40 min. The phases were separated by centrifugation at 1000 x g for 15 min. The organic phase was recovered and evaporated to complete dryness at room temperature under N_2 . The residue obtained was resuspended in 200 μ l of absolute ethanol. An aliquot of 1-20 μ l was taken for OPA derivatization. This was done by mixing OPA reagent (2.5 mg OPA, 50 μ l of ethanol, 2.5 μ l of 2-mercaptoethanol and 3% boric acid solution adjusted to pH 10.5 with KOH up to a final volume of 1.5 ml). An aliquot of 1-20 μ l of lipid residue resuspended in ethanol and 50 μ l of the reactive OPA was added to the mobile phase (methanol/5mM phosphate buffer pH 7.8, at 89/11, v/v) to complete a total volume

of 500 μ l. The mixture was stirred 2 min under dark conditions, sonicated for 12 min and maintained in the bath for 18 min more. Then, the mixture was kept on ice for 30 min before LCB quantification by HPLC using a C_{18} column, (15 cm x 4.6 mm, 5 μ m). The derivatives were analyzed by HPLC with fluorescence detection (excitation and emission wavelengths of 337 and 448 nm, respectively). The flow-rate was maintained at 1.3 ml/min using the mobile phase of methanol/5mM phosphate buffer, pH 7.8, at 89/11, v/v. 600 pmol of sphingosine or sphinganine (a mixture of threo- and erythro-isomers of 59 and 39%, respectively) as internal standards were also added.

Measurement of fatty acids from plasma membranes-1-2 mg of plasma membrane protein were supplemented with 50 μ l of L- α -diheptodecanoyl phosphatidylcholine (1 mg/ml) as internal standard. Then, one ml CH_3OH , 500 μ l of 0.9% NaCl (w/v) and 2 ml $CHCl_3$ were added to plasma membranes, vortexed 30 sec and centrifuged for 2 min at 5000 rpm. A second chloroform (2 ml) extraction was done and both phases collected and supplemented with methanol (200 μ l). Anhydrous Na_2SO_4 was added to eliminate residual water. Chloroform was evaporated under nitrogen and the residue solubilized with 100 μ l of toluene, 1960 μ l of methanol and 40 μ l of concentrated H_2SO_4 . The reaction mixture was incubated at 90 $^{\circ}C$ for 2 h. At the end of the reaction, 1ml of 5% NaCl and 2 ml of hexane were added, stirred and the organic phase recovered. Hexane (2 ml) was added to the aqueous phase and both organic phases pooled and evaporated under nitrogen. This residue was sealed and stored at -20 $^{\circ}C$. All steps were performed at 4 $^{\circ}C$ and all organic solvents were mixed with 0.02% (w/v) BHT.

To dissolve the fatty acid residue from the extract, 100 μ l of hexane were added to the dry residue and a 1/10 dilution with hexane was done. Two μ l of this dilution was used to inject a gas chromatograph Carlo Erba (Milan, Italy) with a column of CP SIL 88 using an injector temperature of 230 $^{\circ}C$, an oven temperature of 190 $^{\circ}C$, a helium gas vector and a hydrogen burner. The chromatogram was analyzed with the Chrompac-Running computer software from Varian (Palo Alto, CA).

Immunoblotting assays-Proteins from membrane fractions were resolved in 1 mm thick tricine-

SDS PAGE using 10% T, 6% C and 10%, 3% gels for ATPase and 14-3-3 protein separation, respectively, and electrophoresed at 60 v for 0.5 h and 90 v for 2 h. Then, gels were electrotransferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane in a chamber containing 15 mM phosphate buffer, pH 6.9, 20% methanol and 0.05% SDS at 25 v for 2.25 h. The PVDF membrane was incubated with the first antibody (antibody vs. plasma membrane H^+ -ATPase was used in a 1:4000 dilution and antibody vs. 14-3-3 protein was used in a 1:1000 dilution) in a TBS buffer containing 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 2% skimmed milk (overnight at 4 $^{\circ}C$ for the anti H^+ -ATPase antibody or at room temperature for the 14-3-3 antibody). The second antibody (goat antirabbit IgG alkaline phosphatase conjugate) was used in a 1:1000 dilution in TBS buffer containing 5% skimmed milk, incubating the PVDF membrane for 2 h at room temperature. The reaction was developed as described (32).

Electron microscopy-Purified plasma membrane vesicles or DRM fractions were pelleted at 100,000 x g and the resulting pellets were covered with 3% glutaraldehyde in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), at 4 $^{\circ}C$ for 2 h. After rinsing, 1% osmium tetroxide was added and incubated for 2 h at 4 $^{\circ}C$. Samples were dehydrated and infiltrated with propylene oxide for 24-36 h and then embedded in epon at 60 $^{\circ}C$ for 48 h. Ultrathin sections of 100 nm thick were done in a Reichert Ultramicrotome and collected on 200-mesh copper grids, stained with uranyl acetate and observed with a Jeol 1200 EXII electron microscope operated at 60 Kv.

Protein determination-This was done according to the procedure of Peterson (33) using BSA as standard.

Statistical analyses-Experiments were carried out at least in triplicate, and included two or more membrane preparations. Where indicated, experimental data were analyzed statistically by the Origin program, version 4.10 (Microcal software) and with LSD (T) comparison of means using the Statistix Version 4 Analytical software (Tallahassee, FL).

RESULTS

FB₁ addition to the maize embryos inhibits the plasma membrane H^+ -ATPase activity, but this is not related to the presence of the toxin in the

membrane-One strategy to explore how endogenous sphingolipids affect a membrane enzyme component is to perturb sphingolipid biosynthesis by addition of FB₁ and then measure the activity of a plasma membrane integral protein as the H⁺-ATPase. Table I shows that the H⁺-ATPase activity from plasma membrane vesicles isolated from maize embryos exposed to FB₁ was inhibited 35 and 24% with 10 and 20 μM FB₁, respectively. Since FB₁ inhibits the H⁺-ATPase activity from plasma membrane *in vitro* at the same extent in an acompetitive mechanism (14), we tested the possibility that FB₁ present in the membrane was responsible of this inhibition, therefore, measurements of FB₁ levels in the isolated plasma membranes and microsomal fractions were carried out and the results are shown in Table I. It was found that microsomes isolated from embryos exposed to 10 μM of the toxin for 24 h contained low levels of FB₁, but the toxin was absent in the correspondent plasma membranes and only increased to trace levels when the embryos were exposed to 20 μM FB₁. Thus, the H⁺-ATPase inhibition observed when 10 μM FB₁ was added to the maize embryos was not associated to FB₁ remaining in the membrane.

LCB levels increase in membrane fractions of maize embryos exposed to FB₁-The FB₁ inhibition on the plasma membrane H⁺-ATPase could be due to a membrane accumulation of LCB, the amphipathic substrates of the sphinganine *N*-acyl transferase, an intracellular target of FB₁ (13, 22). To explore this possibility, endogenous levels of phytosphingosine and sphinganine were measured in the plasma membrane and in microsomes upon FB₁ addition to the embryos. Table II shows that plasma membranes from the FB₁ imbibed embryos increased their sphinganine content 7.3-fold while no variation in the phytosphingosine amount was observed. On the contrary, phytosphingosine increased 8.5-fold in the microsomal membranes derived from the embryos exposed to 10 μM FB₁ and no changes in sphinganine levels were found (results not shown). When the same values were expressed per mg of fatty acid (see Table III for fatty acid content), the raise in SN corresponded to 10.5-fold in plasma membranes. However, the overall amount of PS and SN was much higher in the plasma membrane than in microsomes, either in

the absence of FB₁ (10031 pmol/mg protein of PS plus SN in plasma membrane, vs. 1318 pmol/mg protein of PS plus SN in microsomes), or in the presence of FB₁ (15030 pmol/mg protein of SN plus PS in plasma membrane vs. 3735 pmol/mg protein of SN and PS in microsomes). As a result of the presence of FB₁ on the increase of SN in microsomes and of PS in plasma membranes, the molar ratio of these two bases per mg of fatty acids in the respective membranes increased: in the microsomal fraction from 1.7 to 2.2 and in the plasma membrane from 4.6 to 9.3. These results suggested that the sphinganine increase in the plasma membrane could be associated to the inhibition of the H⁺-ATPase activity.

Sphinganine elevation in the plasma membrane as a result of FB₁ addition to the maize embryos promotes an increase in the permeability and a decrease in fluidity-The massive incorporation of endogenous sphinganine could be affecting the bilayer properties and this changes in turn could be contributing to the observed plasma membrane H⁺-ATPase inhibition. Therefore, we measured the permeability levels of the maize embryos exposed to FB₁ and the fluidity of the plasma membranes isolated from FB₁-imbibed embryos. Fig. 1A shows that FB₁ increased the non-specific electrolyte loss from the maize embryos more than 2-fold. When membrane fluidity was assessed with the polarization fluorescence of DPH as a function of temperature, the resulting profile showed that membrane fluidity of maize embryos imbibed with FB₁ always was less fluid than the control, in the range of temperatures assayed (Fig. 1B). We also tested the effect of different FB₁ concentrations in the maize embryos imbibition medium, on the plasma membrane fluidity determining DPH polarization fluorescence at 30 °C, the same temperature at which ATPase activity was measured. Results in Fig. 1C show that membrane fluidity diminished upon FB₁ treatment and that the largest effect was with 10 μM of FB₁. Higher toxin concentrations did not increase fluidity proportionally.

FB₁ addition does not modify the profile of the plasma membrane main fatty acids-It is known that membrane fatty acids composition is one of the major factors influencing membrane permeability. We measured the fatty acid composition of the plasma membranes from maize embryos imbibed with or without FB₁.

Data in Table III show that four were the main species of fatty acids identified in every condition: palmitic, stearic, oleic and linoleic acids. The amount of total fatty acids remained the same in the plasma membranes from maize embryos imbibed with FB₁ as compared to the control membranes and the ratio of the saturated fatty acids to unsaturated fatty acids did not change with or without FB₁. Therefore, the bond index remained unchanged in the presence of the toxin. From these results, FB₁ at 10 μ M did not decrease the fatty acid/protein ratio in plasma membranes. These results indicated that changes in fluidity and permeability could not be assigned to the composition of the main membrane fatty acids.

LCB but not ceramide inhibit H⁺-ATPase activity when directly added to the plasma membrane-FB₁ has an inhibitory effect on the plasma membrane H⁺-ATPase when directly added to isolated plasma membranes (14). Given the structural similarity of sphinganine with the toxin and the high levels of sphinganine in the plasma membrane as a consequence of FB₁ addition, we assayed the *in vitro* effect of sphinganine and of phytosphingosine as well, on the H⁺-ATPase activity. Table IV shows that both LCB and FB₁ inhibited ATPase activity at about the same extent, i.e. 30%. When two ceramides, C6:0 ceramide and C16:0 ceramide were tested in the same system, neither one showed an inhibitory effect on the H⁺-ATPase activity. Taken together, these results suggested that the endogenous sphinganine increase in the plasma membrane after the toxin addition to the maize embryos, could be associated with the H⁺-ATPase inhibition.

Ceramide releases the FB₁ inhibition on the plasma membrane H⁺-ATPase activity, when both compounds are added together to the maize embryos-Since the decrease in the ceramide levels is another consequence of FB₁ inhibition on the SAT, it was necessary to verify that a deficit of this compound could be affecting the H⁺-ATPase activity. The rationale behind our experiment was that if a decrease in the endogenous ceramide driven by the FB₁ addition was responsible at some extent of the H⁺-ATPase inhibition, the simultaneous supplementation of FB₁ and ceramide to the maize embryos could result in a correspondent recovery of the activity. The results shown in Table V confirm that this was the case. Whereas

FB₁ produced the 30% inhibition previously observed, ceramide added together with FB₁ restored the activity to the control values. Surprisingly, when sphinganine, phytosphingosine or ceramide were added to the embryos, H⁺-ATPase activity did not vary with respect to the control, in contrast with the inhibitory action of the LCB when directly added to the isolated plasma membranes. This finding indicated that a decline in the endogenous ceramide levels was responsible of the H⁺-ATPase inhibition observed by the addition of FB₁ to the maize embryos. Levels of the enzyme were the same in the membranes obtained from maize embryos imbibed both in the absence or presence of FB₁ (results not shown), discarding the possibility that an FB₁ inhibition on protein synthesis (34) could be decreasing H⁺-ATPase levels in the plasma membrane.

Plasma membrane H⁺-ATPase is present in detergent-resistant membrane domains in maize embryos-Ceramide is an important structural block of plasma membrane complex sphingolipids and may exist in free form as well (35, 36). The two isolated reports on the existence of lipid microdomains in plant membranes have reported that the plasma membrane H⁺-ATPase is a resident protein in these regions (37, 38). We isolated a fraction of plasma membrane vesicles from maize embryos that was resistant to Triton X-100 solubilization. The preparation showed the same morphology reported for plasma membrane microdomains from yeast (39), *Nicotiana tabacum* (37), and mammals (40) (Figs. 2A, 2B). Plasma membrane H⁺-ATPase was enriched in these fractions, even though no differences in the levels of the enzyme were obtained from microdomains isolated from embryos exposed to FB₁ or from control embryos (Fig. 2C).

DISCUSSION

The present work provides experimental evidence that plasma membrane H⁺-ATPase requires endogenous ceramide to fully express its activity. It also brings insights on the effects of the fungal toxin FB₁ on the plant plasma membrane: how the lipid bilayer is affected, how the plasma membrane H⁺-ATPase activity is decreased (constituting a target of the toxin) and how these effects can be envisioned in terms of

the interaction of the pathogen with the plant cell.

Our system of maize embryos exposed to the toxin allows to study its effects on cell components beyond the plasma membrane, since at 10 μM FB_1 and 24 h of imbibition, the toxin was no longer present in the plasma membrane, but could still influence the structure-function of the bilayer. This is an important fact to be considered, given the pleiotropic effects that FB_1 has shown in all the living systems tested (8, 13, 14, 41-43). Previous experiments carried out with FB_1 directly added to the plasma membranes (*in vitro*) can be interpreted in terms of the effects that can take place at the early times of exposure of the plant cell to the pathogen toxin (14).

Effect of FB_1 on the lipid bilayer of the plasma membrane from maize embryos-As a consequence of FB_1 inhibition on the SAT, accumulation of LCB in plants (13) yeast (44), and animal cells (45) has been reported, but no allocation of these compounds has been ascribed to specific cell compartments. In maize embryos, we found a massive accumulation of LCB in the membrane fractions after FB_1 treatment. Whereas phytosphingosine increased levels were determined in the microsomal fraction, most probably in the ER membranes where sphingolipid synthesis takes place, sphinganine was selectively displaced to the plasma membrane fraction. The increase of sphinganine in the plasma membrane (7-fold in terms of LCB per mg protein or 10-fold in terms of LCB per mg fatty acid, as compared to the control values) contributed to decreased fluidity and increased membrane permeability. This is consistent with the structure of sphinganine, which has a small polar head group that can form hydrogen bond networks as those reported for ceramides (46). Increased sphinganine levels in the membrane could be forming regions with decreased acyl motion, that possibly form lateral phase separation that could increase membrane permeability, as described in model systems (46, 47). Host-nonspecific toxins like FB_1 often cause an increase in cellular ions and water loss (48). The maize embryos imbibed with FB_1 showed an increase in the leakage of electrolytes that decreased at concentrations of the toxin above 10 μM FB_1 . These results contrast with those obtained with leaves of *Datura stramonium* treated with FB_1 (1-100 μM), where

the electrolyte leakage increased proportionally to the toxin concentration (41).

Changes in fluidity produced by FB_1 addition were not related to changes in the major fatty acids present in the membrane. However, our results and the action of FB_1 on SAT (49) suggest a decline in endogenous ceramides upon FB_1 addition to the maize embryos, therefore, we can not discard that the endogenous levels of complex sphingolipids could also be contributing to the observed changes on membrane properties. These changes could be due to a combined effect of two closely related processes: i) A large drop in total ceramide plasma membrane content reflected as a raise in fluidity, due to the ordering effect of this lipid on membrane structure (50, 51). ii) A sphinganine excess in the membrane, that would have increased membrane rigidity. This is consistent with the DPH signal obtained in our experiments, that indicated that the prevalent effect of FB_1 addition on membrane fluidity was a raise in rigidity.

Effect of FB_1 on the plasma membrane H^+ -ATPase activity from maize embryos-Our experiments testing FB_1 effects on the maize embryos revealed that the plasma membrane H^+ -ATPase requires endogenous ceramide for activity. In our system, 24 h of imbibition were enough for embryo cells to incorporate ceramide. The addition of ceramide together with FB_1 erased the inhibitory effect of the toxin on the plasma membrane H^+ -ATPase activity. In a previous communication, we had reported that the fungal toxin FB_1 added directly to isolated plasma membranes exerts an acompetitive inhibition on the plant plasma membrane H^+ -ATPase (14). In the present work, no traces of FB_1 were found in the membrane, ruling out the possibility that residual toxin in the membrane was responsible of the inhibition. The inhibitory action of the toxin could not be interpreted either as an effect on protein synthesis as it has been previously described (34), or to an altered protein insertion in the membrane as a result in sphingolipid synthesis, as it has been found for the Pma1p H^+ -ATPase isoform from yeast (52), because equal levels of the enzyme were present in plasma membranes from embryos exposed to the toxin and in controls (results not shown). Also, the decrease in plasma membrane fluidity upon a large elevation of sphinganine levels does not provide an explanation of decreased ATPase

activity, since we and other groups have proved that changes in membrane fluidity do not correlate with the inhibition of this enzyme (14, 53). This work also showed that the abundance of sphinganine in the plasma membrane generated by FB₁ addition was not the cause of the H⁺-ATPase inhibition, as it was indicated by the experiments wherein exogenous sphinganine was added *in vivo* and no effect on the H⁺-ATPase activity was found. It could be argued that incorporation of this exogenous compound to the membrane is inefficient, but it has been reported that LCB are easily taken up into the membranes. In contrast, ceramides seem to require longer times (54). However, it is important to notice that even if addition of sphinganine to the embryos did not affect the plasma membrane H⁺-ATPase activity, when directly added to isolated membranes, it did inhibit the enzyme. This suggests that LCB added to the embryos are not homogeneously distributed in the membrane, probably due to heterogeneous partition in membrane regions and /or to different lipid sorting pathways (55, 56). In this scenario, it had to be assumed that free sphinganine, even when present at elevated concentrations in the membrane, was not accessible to the enzyme.

Ceramide requirement for H⁺-ATPase activity may be related to two major aspects: ceramide as an immediate neighbor membrane lipid of the enzyme or ceramide as an effector of specific regulatory components of the enzyme (14, 57). A third possibility combining these two aspects could be conceivable as well. Concerning immediate neighboring contacts, it has recently been found that the plasma membrane H⁺-ATPase resides in detergent-resistant membranes of plasma membranes from yeast and plants (37-39). In fact, some authors consider this enzyme as a microdomain marker. Our results showing the presence of detergent-resistant membranes enriched in H⁺-ATPase confirm the association of the enzyme with lipid microdomains. The components of these membrane regions are sphingolipids, sterols and some phosphoglycerolipids, whose structure favors a tight intermolecular packing, making these regions resistant to solubilization by detergents as Triton X-100 (58, 59). Microdomains in plant plasma membranes may play a role in plant-pathogen interactions (37, 38, 60). One plausible interpretation for our data

is that ceramide, free or as the backbone of membrane complex sphingolipids, is in close contact with the plasma membrane H⁺-ATPase and is required for its activity, conferring an adequate lipid microenvironment for optimal catalytic motion, condition that has been described for several membrane enzymes (61). The lack of effect of the exogenous sphinganine on the H⁺-ATPase activity suggests that the enzyme was not accessible to the LCB and/or that it was secluded in these microdomains, wherein it could be surrounded by free ceramides or other sphingolipids and sterols. This model can also be supported by a large body of experimental evidence that shows a requirement of sterols for the catalytic activity of the H⁺-ATPase (53, 62, 63), that sterols are in close association with ceramide containing lipids in membrane microdomains (37, 38, 64) and that maize plasma membranes have a high content of sterols (65).

An alternative interpretation for our data is that ceramide or one of its phosphorylated derivatives interfered with a H⁺-ATPase regulatory protein, such as a kinase or the regulatory proteins 14-3-3. It has been described that low activity states of the plasma membrane H⁺-ATPase correlate with a low phosphorylation state of the enzyme and a decrease in the association of the 14-3-3 protein (6, 57). It is noteworthy that 14-3-3 proteins have been consistently detected in plant plasma membrane microdomains (37, 38). Nevertheless, the possibility that endogenous ceramide or its phospho-derivatives or complex sphingolipids could be activating some dephosphorylating system acting on the H⁺-ATPase can not be discarded, since several lines of evidence have proposed that sphingolipids as sphingosine-1P or phytosphingosine-1P are mediators in signal transduction pathways in plant cells (66, 67), similarly to what happens in animal systems (54, 69, 70).

Whether ceramide requirement for H⁺-ATPase activity is related to a pattern of defense response against pathogens where membrane microdomains are involved, remains to be established. Nevertheless, works describing the activity of this primary pump as a switch for plant defense responses must be considered (71). In addition, it is tempting to speculate that disruption of membrane structure induced by a physiological imbalance of endogenous

membrane sphingolipids (produced by a toxin that perturbs sphingolipid metabolism in the present work) could be part of the last phases of a localized plant programmed cell death (PCD), which is displayed as the most efficient process of plant defense against pathogens. This view can be supported by several reports in the literature suggesting a role of sphingolipids in plant defense (72-74) and reports on PCD elicited by FB₁ (75).

Relevance of the effects of FB₁ in the plant-pathogen interaction-Altogether, these results indicate that FB₁, recognized as a virulent factor of *Fusarium verticillioides* has the plant plasma membrane as an important target, modifying its composition, fluidity, permeability and the activity of the most important primary pump of the membrane. These effects are produced through a direct action of the toxin on the membrane *in vitro* (14) and through an interaction of the toxin with the de novo synthesis of sphingolipids *in vivo*. The inhibition of the plasma membrane H⁺-ATPase produced both by the FB₁ molecule itself (14), and by an elicited ceramide deficiency is consistent with the inhibition of radicle elongation and medium acidification observed by *in vivo* treatment with FB₁ (8, 14). The kinetics of toxin production by the pathogen and of the toxin uptake by the plant cell will determine the extent of the FB₁ deleterious effects on the plasma membrane *in vivo*.

REFERENCES

1. Callow, J.A., and Green, J.R. (1996) *Membranes: Specialized Functions in Plants*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK
2. Bidway, A.P., Zhang, L., Bachmann, R.C., and Takemoto, J.Y. (1987) *Plant Physiol.* **83**, 39-43
3. Rasi-Caldogno, F., and Pugliarello, M. C. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 280-285
4. Gomès, E., Gordon-Weeks, R., Simon-Plas, F., Pugin, A., Milat, M-L., Leigh, R. A., and Blein, J-P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1285**, 38-46
5. Goudet, C., Véry, A-A., Milat, M-L., Ildefonse, M., Thibaud, J-B., Sentenac, H., and Blein, J-P. (1998) *Plant J.* **14**, 359-364
6. Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Higgins, V. J., and Blumwald, E. (1994) *Plant Physiol.* **104**, 209-215
7. Shier, W. T. (1992) *J. Toxicol.* **11**, 241-257
8. Doehlert, D. C., Knutson, C. A., and Vesonder, R. F. (1994) *Mycopathologia* **127**, 117-121
9. Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., and Horak, R. M. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1806-11
10. Marasas, W. F., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., and van der Lugt, J. J. (1988) *Onderstepoort J. Vet. Res.* **55**, 197-203
11. Gelderblom, W. C., Galendo, D., Abel, S., Swanevelder, S., Marasas, W. F., and Wild, C.P. (2001) *Cancer Lett.* **169**, 127-37
12. Nelson, P. E., Desjardins, A. E., and Plattner, R. D. (1993) *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 233-252
13. Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, O. S., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, H. A., Jr. and Riley, R. T. (1994) *Plant Physiol.* **106**, 1085-1093
14. Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R. A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sanchez-Nieto, S., Plasencia J., and Gavilanes-Ruíz, M. (2005) *Planta* **221**, 589-596
15. Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Alleman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G. and Vleggaar, R. (1988) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **11**, 743-745
16. Yin, J-J., Smith, M. J., Eppley, R. M., Troy, A. L., Page, S. W., and Sphon, J. A. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 13-22
17. Yin, J-J., Smith, M. J., Eppley, R. M., Page, S. W. and Sphon, J. A. (1996) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **225**, 250-255
18. Yin, J-J., Smith, M. J., Eppley, R. M., Page, S. W., and Sphon, J. A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1371**, 134-142
19. Gelderblom, W. C., Smuts, C. M., Abel, S., Snyman, S. D., Cawood, M. E., van der Westhuizen, L., and Swaneveder, S. (1996) *Food Chem. Toxicol.* **34**, 361-369
20. Michelet, B., and Boutry, M. (1995) *Plant Physiol.* **108**, 1-6
21. Sondergaard, T. E., Schulz, A., and Palmgren, M. G. (2004) *Plant Physiol.* **136**, 2475-82
22. Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., and Merrill, A. H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14486-14490
23. Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, F., Carballo, A., Rodríguez-Sotres, R., and Gavilanes-Ruíz, M. (1997) *Physiol. Plant.* **101**, 157-164
24. Larsson, C., Sommarin, M., and Widell, S. (1994) *Methods Enzymol.* **228**, 451-469
25. González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S., and Gavilanes-Ruíz, M. (1992) *Anal. Biochem.* **200**, 235-238.
26. Rodríguez-Sotres, R., and Muñoz-Clares, R. A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 235-238
27. Sánchez-Nieto, S., Rodríguez-Sotres, R., González-Romo, P., Bernal-Lugo, I., and Gavilanes-Ruíz, M. (1992) *Seed Sci. Res.* **2**, 105-111
28. Sánchez-Nieto, S., Tuena de Gómez-Puyou, M., Rodríguez-Sotres, R., Carballo A., and Gavilanes-Ruíz, M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 175-187
29. O'Sullivan, W. J., and Smithers, G. W. (1979) *Methods Enzymol.* **63**, 294-336
30. Sydenham, E. W., Shephard, G. S., and Thiel, P. G. (1992) *JAOAC Int.* **75**, 313-318
31. Castegnaro, M., Garren, L., Galendo, D., Gelderblom, W.C.A., Chelule, P., Dutton, M.F., and Wild, C.P. (1998) *J. Chromatogr. B* **720**, 15-24
32. Enríquez-Arredondo, C., Sánchez-Nieto, S., Rendón-Huerta, E., González-Halphen, D., Gavilanes-Ruíz, M., and Díaz-Pontones, D. (2005) *Plant Sci.* **169**, 11-19
33. Peterson, G. L. (1977) *Anal. Biochem.* **83**, 346-356

34. Abado-Becognee, K., Mobio, T. A., Ennamany, R., and Creppy, E. E. (1998) *Arch. Toxicol.* **72**, 233-236
35. Holthuis, J.C., Pomorski, T., Riggers, R. J., Sprong, H., and Van Meer, G. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 1689-723
36. Pascher, I. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 433-451
37. Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J-P., Hartmann, M-A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., and Bessoule, J-J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 36277-36286
38. Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., and Dupree, P. (2005) *Plant Physiol.* **137**, 104-116
39. Idkowiak-Baldys, J., Grilley, M. M. and Takemoto, J. Y. (2004) *FEBS Lett.* **569**, 272-276
40. Braccia, A., Villani, M., Immerdal, L., Niels-Christiansen, L. L., Nystrom, B.T., Hansen, G. H., and Danielsen, E. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15679-15684
41. Abbas, H. K., Paul, R. N., Boyette, C. D., Duke, S. O., and Vesonder, R. F. (1992) *Can. J. Bot.* **70**, 1824-1833
42. Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., and Ausubel, F. M. (2000) *Plant Cell* **12**, 1823-1835
43. Stone, J. M., Heard, J.E., Asai, T. and Ausubel, F.M. (2000) *Plant Cell* **12**, 1811-1822
44. Wu, W. I., McDonough, V. M., Nickels, J. T. Jr., Ko, J., Fischl, A. S., Vales, T. R., Merrill, A. H. Jr., and Carman, G. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13171-13178
45. Desai, K., Sullards, M. C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E. M., Hartl, M., Humpf, H. V., Liotta, D. C., Peng, Q. and Merrill Jr., A. H. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 188-192
46. Massey, J. B. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1510**, 167-184
47. Montes, R. L., Ruíz-Argüello, M. B., Goñi, F. M., and Alonso, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11788-11794
48. Kauss, H. (1990) *The Plant Plasma Membrane*. Springer-Verlag, Berlin, Germany
49. Lynch, D. V. (1999) *Methods Enzymol.* **311**, 131-149
50. Brown, R. E. (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 1-9
51. London, M., and London, E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9997-10004
52. Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L. and Schneiter, R. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 22515-22522
53. Cooke, D. T., Burden, R. S., James, C. S., Seco, T., and Sierra, B. (1994) *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 769-773
54. Smith, W., and Merrill, Jr. A. H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25841-25842
55. Sprong, H., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 504-512
56. van Meer, G., and Lisman, Q. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25855-25858
57. Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J. L., and Boutry, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11675-11680
58. Lommerse, P. H. M., Spaink, H. P., and Schmidt, T. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1664**, 119-131
59. Simons, K., and Vaz, W. L. C. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 269-295
60. Bhat, R. A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., and Panstruga, P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 3135-3140
61. Fantini, J. (2003) *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1027-1032
62. Cowan, D. S. C., Cooke, D. T., Clarkson, D. T. and Hall, J. L. (1993) *J. Exp. Bot.* **44**, 991-994
63. Burgos, P. A. and Donaire, J. P. (1996) *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 315-324
64. Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., and London, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33540-33546
65. Bohn M., Heinz, E., and Luthje, S. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 35-40
66. Ng, C. K.-Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., and Hetherington, A. M. (2001) *Nature* **410**, 596-599
67. Coursol, S., Le Stunff, H., Lynch, D. V., Gilroy, S., Assmann, S. M., and Spiegel, S. (2005) *Plant Physiol.* **137**, 724-737
69. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1485**, 63-99
70. Hannun, Y., Luberto, C., and Argraves, K. M. (2001) *Biochemistry* **40**, 4893-4903
71. Schaller, A., and Oecking, C. (1999) *Plant Cell* **11**, 263-272
72. Birch, P. R. J., Avrova, A. O., Duncan, J. M., Lyon, G. D., and Toth, R. L. (1999) *Mol. Plant Microbe-Interact.* **12**, 356-361

73. Spassieva, S. D., Markham, J. E., and Hille, J. (2002) *Plant J.* **32**, 561-72
74. Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J. T. (2003) *Genes Dev.* **17**, 2636-41
75. Stone, J.M., Liang, X., Nekl, E.R. and Stiers, J.J. (2005) *Plant J.* **41**, 744-754

FOOTNOTES

We thank Consuelo Enríquez-Arredondo and Laurel Fabila-Ibarra for their technical help and Jorge Sepúlveda and Rodolfo Hernández for the electron microscopy work and to Dr. Antonio Peña-Díaz, whom let us work in his laboratory where the measurements of membrane fluidity were done. The revision of the manuscript by Drs. David Krogmann, Diego González-Halphen and Armando Gómez-Puyou is profoundly appreciated. This work was financed by grants IN208300 from DGAPA-PAPIIT, UNAM, 40311-Q from CONACyT, Mexico and CN-03-118 from the University of California-CONACyT (UC-MEXUS). NGN was recipient of a fellowship from CONACyT, México and DGEP, UNAM.

The abbreviations used are: ATP, adenosine 5'triphosphate; BHT, butylated hydroxytoluene (2, (6)-Di-tert-Butyl-p-cresol); DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; DTT, dithiothreitol; DTE, dithioerythritol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; OPA, o-phthalaldehyde; PEG, polyethylene glycol; HEPES, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethane-sulfonic acid]; TEA, triethanolamine; Tris, Tris[hydroxymethyl]aminomethane; TPCK, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; TLCK, Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effect of FB₁ on permeability and fluidity of plasma membranes from maize embryos. A. Twenty embryos were imbibed with or without 0 (●), 10 (▲), 20 (■) μM FB₁, then transferred to deionized water and electric conductivity measured as described under Experimental Procedures. Data represent means ± S.D. from 5-10 independent assays with at least 3 different embryo batches. B, C. Plasma membrane fluidity was measured in plasma membranes isolated from maize embryos imbibed in the absence (■) or presence of 10 μM (●) (B) or 2.5, 5, 10 or 20 μM FB₁ (C) for 24 h. Then fluidity was measured by DPH polarization fluorescence from 5 to 35 °C (B) or at 30 °C (C). Data represent means ± S.D. of at least 3 experiments done with a minimum of 3 different plasma membrane preparations.

Fig. 2. Ultrastructure of plasma membrane vesicles and DRM from maize embryos. H⁺-ATPase enrichment in DRM. A, B. Plasma membrane vesicles and DRM were isolated from maize embryos and processed as ultrathin sections as described under Experimental Procedures. C. Maize embryos were imbibed in the absence or presence of 10 μM FB₁ for 24 h and microsomal fraction (MF), plasma membrane vesicles (PM) and DRM were isolated. Ten μg of protein from these membranes were loaded to SDS-PAGE, electroblotted to PDVF membranes and stained as described under Experimental Procedures. Experiment representative of a set of two with different membrane preparations.

Table I.

Effect of FB₁ on the plasma membrane H⁺-ATPase activity and determination of the toxin in the plasma membrane.

Maize embryos were imbibed with or without FB₁ at the indicated concentrations during 24 h. Then, plasma membranes were isolated and ATPase activity and FB₁ levels were measured by colorimetry or fluorescence emission, respectively, as described under Experimental Procedures. Data are the means ± S.D. of three independent experiments with at least three different membrane preparations.

μM FB ₁	Plasma membrane ATPase activity		FB ₁ (pmol/mg prot)	
	(μmol/Pi min/mg)	% of inhibition	Microsomes	Plasma membrane
0	1.025 ± 0.13	0		
10	0.669 ± 0.19	35	50 ± 17	Not detected
20	0.781 ± 0.18	24	Not determined	0.34 ± 0.03

Table II.

Levels of LCB in microsomes and plasma membranes from maize embryos exposed to FB₁.

Maize embryos were exposed to 10 μM FB₁ for 24 h and microsomal and plasma membranes fractions were isolated, lipid extracts obtained and sphingoid bases determined. All technical details are described under Experimental Procedures. Data are the means ± S.D. of six independent experiments with at least three different membrane preparations.

μM FB ₁	Plasma membrane			
	Phytosphingosine nmol/mg/prot	Sphinganine nmol/mg/prot	Phytosphingosine nmol/mg fatty acid	Sphinganine nmol/mg fatty acid
0	9.0 ± 0.73	1.04 ± 0.21	14.44 ± 1.17	1.66 ± 0.34
10 μM	7.46 ± 1.75	7.57 ± 0.960	14.32 ± 3.36	17.44 ± 2.21

Table III.

Composition of the main fatty acids from microsomes and plasma membranes from embryos exposed to FB₁.

Maize embryos were imbibed with 10 μM FB₁ for 24 h, their plasma membrane fractions isolated, membrane lipids extracted, derivatized to obtain the correspondent methyl esters and analyzed by gas chromatography. Data are the means ± S.D. of 3-5 independent experiments.

Treatment	Total fatty acids μg/mg/prot	Fatty acids μmol/mg/prot (% of the respective control)			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Control	623 ± 100 (100)	0.500 ± 0.144 (21)	0.074 ± 0.018 (3)	0.560 ± 0.100 (36)	0.620 ± 0.100 (38)
10 μM FB ₁	521 ± 51 (100)	0.390 ± 0.040 (19)	0.07 ± 0.007 (3)	0.640 ± 0.140 (35)	0.690 ± 0.100 (37)

Table IV.

Effects of FB₁, sphinganine, phytosphingosine, C₆ ceramide and C₁₆ ceramide on the H⁺-ATPase activity of isolated plasma membranes.

Maize embryos were imbibed in the absence of FB₁ for 24 h, then plasma membranes were purified and exposed to each compound at the indicated concentrations. Five to 10 µg of membrane protein was used to assay ATP hydrolysis. ATPase activity in the absence of any compound was of $1.71 \pm 0.17 \mu\text{mol Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Means and SE (n=3) of enzymatic determinations are expressed, followed by letters indicating whether concentration of each compound had a significant ($P < 0.05$) influence on ATPase activity as determined by the *t* student comparison of means.

µM	ATPase activity (µmol Pi/h/mg)				
	FB ₁	Sphinganine	Phytosphingosine	C ₆ Ceramide	C ₁₆ Ceramide
0	1.710 ± 0.17	1.71 ± 0.17	1.71 ± 0.17	1.71 ± 0.17	1.71 ± 0.17
1	1.70 ± 0.010	1.25 ± 0.14 ^a	1.68 ± 0.03	1.56 ± 0.06	1.68 ± 0.16
2.5	1.21 ± 0.03 ^a	1.37 ± 0.14	1.30 ± 0.16	1.51 ± 0.04	1.40 ± 0.05
5	1.35 ± 0.05 ^a	1.04 ± 0.017 ^a	1.08 ± 0.03 ^a	1.43 ± 0.09	1.25 ± 0.05 ^a
10	1.21 ± 0.14 ^a	1.20 ± 0.19 ^a	1.25 ± 0.17	1.67 ± 0.05	1.51 ± 0.01
20	1.32 ± 0.01 ^a	1.13 ± 0.13 ^a	1.21 ± 0.09 ^a	1.52 ± 0.20	1.90 ± 0.20

Table V.

Exogenous-ceramide releases the H⁺-ATPase inhibition induced by FB₁.

Maize embryos were exposed to the sphingoid compounds and inhibitors at the indicated concentrations for 24 h. Then, plasma membrane vesicles were isolated and ATP hydrolysis measured as phosphate release as described under Experimental Procedures. Data are means of three independent experiments ± S.D.

Treatment	ATPase activity	
	(µmol Pi / mg/h)	% of the control
Control	3.42 ± 0.34	100
20 µM phytosphingosine	3.84 ± 0.68	112
20 µM sphinganine	2.98 ± 0.22	87
20 µM ceramide	3.25 ± 0.29	95
20 µM FB ₁	2.24 ± 0.21	66
20 µM FB ₁ + 20 µM ceramide	3.32 ± 0.24	97

Figure 1

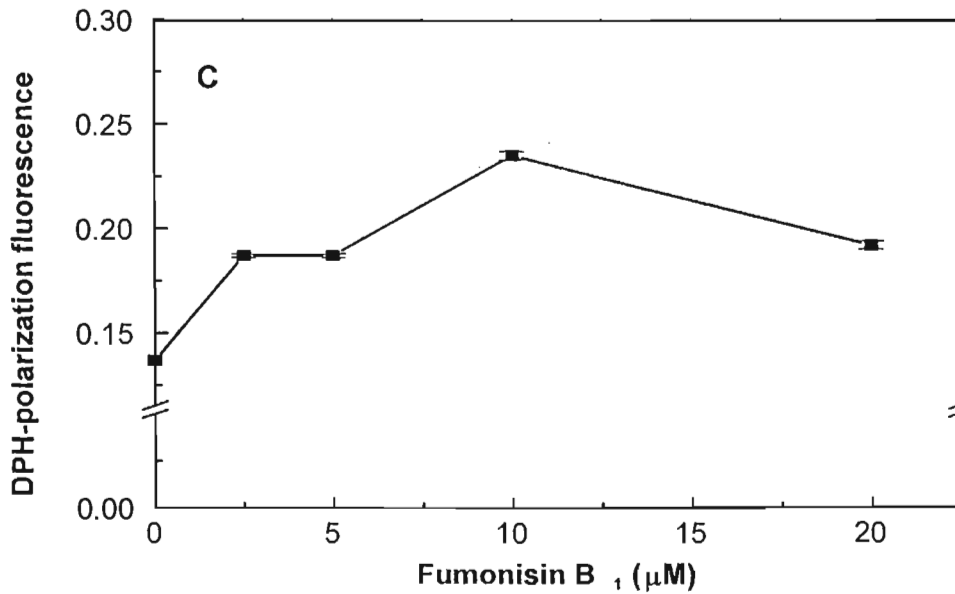
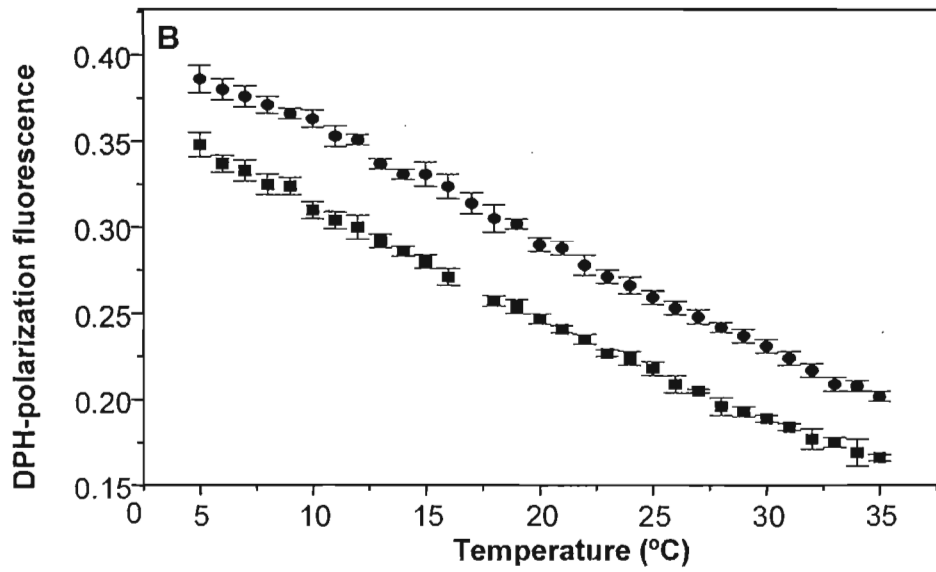
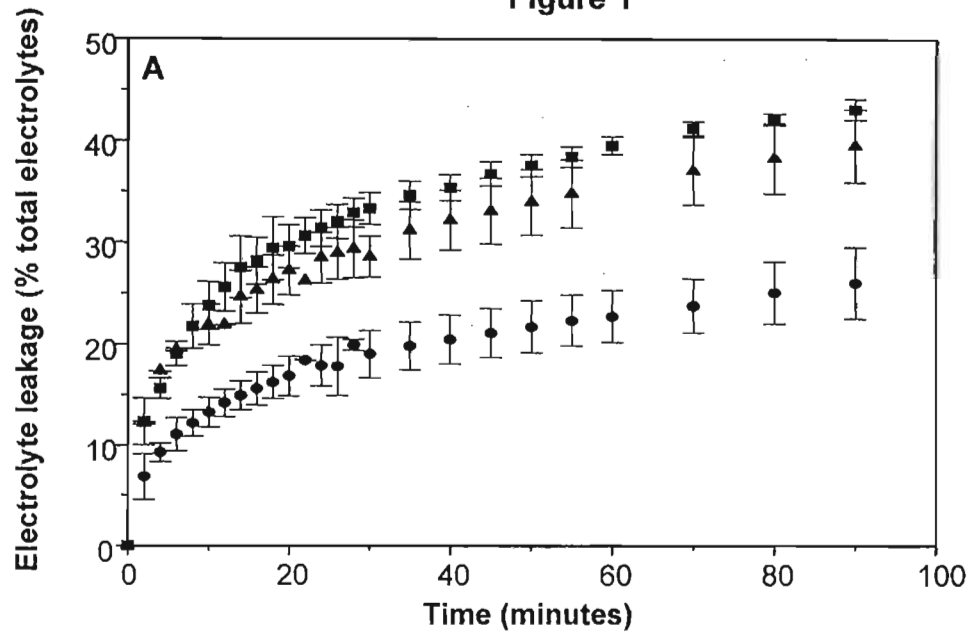
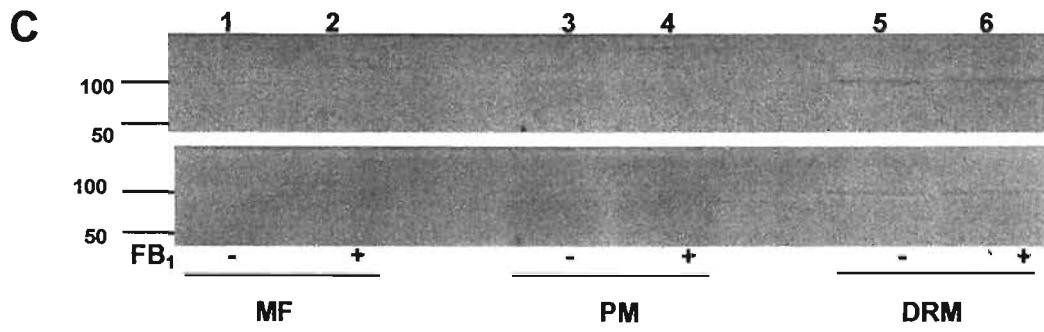
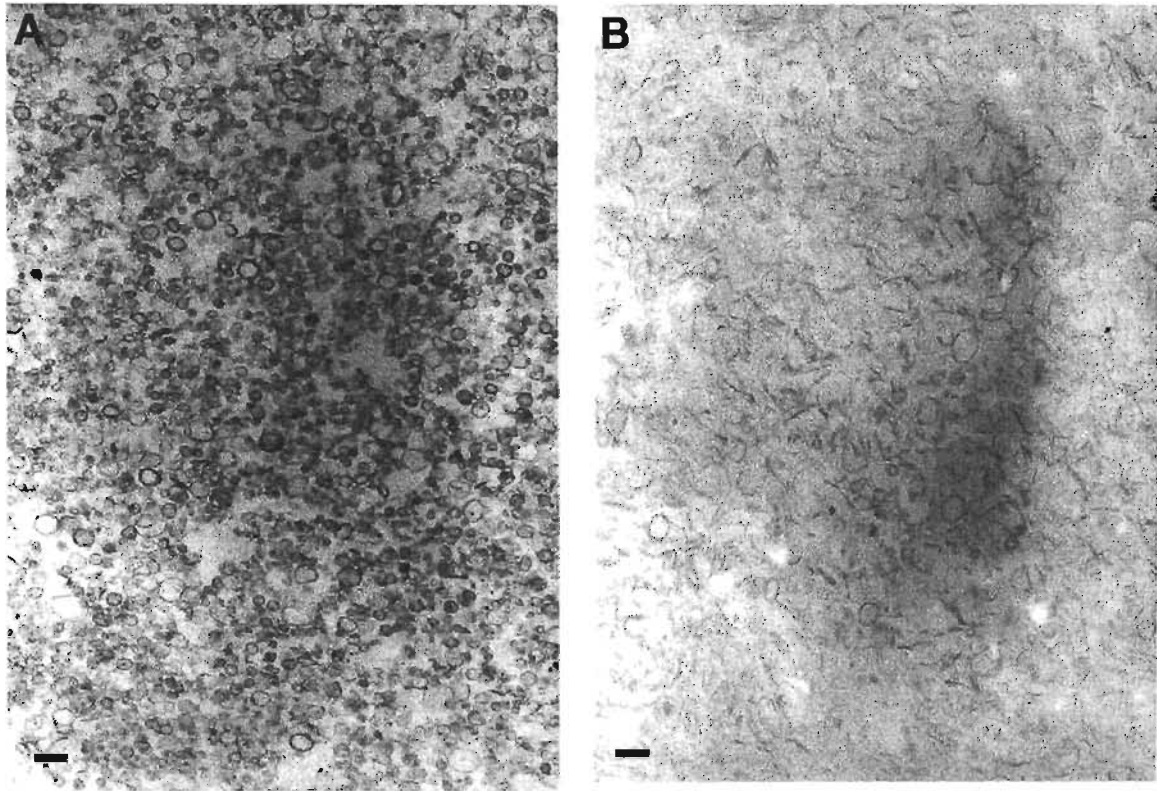


Figure 2



INTERPLAY AT THE INTERPHASE: FUMONISIN B₁, A FUNGAL TOXIN, AND ITS EFFECTS ON THE PLASMA MEMBRANE FROM MAIZE EMBRYOS

Gutiérrez-Nájera, N.¹, Rodríguez-Mejía, P.¹, Palacios-Bahena, S.¹, Carmona-Salazar, L.¹, Saucedo-García, M.¹, Noyola-Martínez, L.¹, Enríquez-Arredondo, C.¹, Vázquez-Vázquez, C.¹, Plasencia, J.¹, Cruz-Ortega, R.² and Gavilanes-Ruíz, M.¹.

¹Dept. Bioquímica, Fac. de Química. Conj. E; ²Instituto de Ecología, UNAM. Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510 México, D. F.

Pathogens display strategies that have the cell wall/plasma membrane as a primary sensor to the pathogen, but also as a final executor of the cell reactions evoked by the pathogen. Both functions may belong to the defense pattern or to the capitulation route, depending on the type of pathogen-host interaction (Kauss, 1990). Toxin emission is one of the most common ways of pathogen offensive. Toxins display chemical interactions with the host plasma membrane components, producing unspecific deleterious effects and/or specific intracellular defense responses. Fumonisin B₁ (FB₁) is a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, a prevalent fungal pathogen of corn and other grains worldwide. FB₁ inhibits ceramide synthase, an enzyme involved in the synthesis of complex sphingolipids in yeast, animal and plant cells in both *in vitro* and *in vivo* conditions (Merrill et al, 2001). FB₁ inhibits the H⁺-ATPase from plant plasma membranes as well (Gutiérrez-Nájera et al, 2005). The ability of FB₁ to perturb sphingolipid biosynthesis predicts additional effects on the membrane. In this work, we report a dual action of FB₁ on the plasma membrane from maize embryos: a direct interaction of the toxin with the membrane, and an indirect one, in which the membrane is affected by changes in the levels of sphingolipids promoted by the inhibition of ceramide synthase by FB₁.

PLASMA MEMBRANE RESPONSES ELICITED BY A DIRECT ACTION OF FB₁

In order to know the responses that FB₁ may produce in the plasma membrane from maize embryos, we followed two approaches: In the first one, the *in vitro* approach, FB₁ was directly added to the plasma membrane vesicles, providing information about fast and direct interactions of the toxin with the membrane components. We found that the hydrophobic core of the membrane immediately became more fluid, and the plasma membrane H⁺-ATPase was acompetitively inhibited (Gutiérrez-Nájera et al, 2005). In addition, other membrane enzyme activities were inhibited by FB₁ addition: At least six membrane polypeptides decreased their phosphorylation level and GSII showed a maximal inhibition of 29.8% ± 6.0 at 10 and 40 μM FB₁ respectively. Therefore, FB₁ directly affects important plasma membrane enzymes: kinases, GSII, and H⁺-

ATPase as well. Membrane fluidity may contribute to the observed changes in enzyme activities. However, this was not the case for the *in vitro* inhibition of the H⁺-ATPase (Gutiérrez-Nájera et al, 2005).

PLASMA MEMBRANE RESPONSES ELICITED BY INTRACELLULAR FB₁ TARGETS

The second approach, *in vivo* studies, consisted in the FB₁ addition to the whole embryos, wherein plasma membranes were isolated and the toxin effects investigated. In this condition, other non-membrane toxin targets that became affected and that had a repercussion in the membrane structure-function could be visualized. It was possible to discard an FB₁ effect on the membrane in this condition, since no traces of the toxin were detected in the membrane as measured by HPLC. Under this experimental situation, FB₁ diminished about 50 % radicle elongation (Fig. 1A). Analysis of their PM revealed a 2-fold increase in permeability (Fig. 1B), and a 44 % inhibition on membrane lipid peroxidation (Fig. 1C). PM capacity to form superoxide, presumably driven by NADPH oxidase, decreased 36% at 10 μM FB₁ (Fig. 1D). In all cases, effects of FB₁ were not linearly dependent on toxin concentration. In *in vivo* conditions, ceramide synthesis was impaired by FB₁, leading to a sphingolipid imbalance in the membrane. This fact conducted to a diminish in permeability and fluidity, which in turn could affect membrane enzyme catalysis. Such possibility could stand for the observed NADPH oxidase inhibition *in vivo*.

CONCLUSIONS

It has been described that FB₁ is able of interacting with artificial and animal plasma membranes, modifying the order and permeability of the lipid bilayer (Yin et al, 1998; Ferrante et al, 2002). We have been able of identifying several sites of action of FB₁ in plasma membranes from maize embryos. The H⁺-ATPase activity inhibition observed under all circumstances was consistent with the inhibition of radicle elongation.

It is clear that the overall response of the tissue to the toxin will be determined by the relative contribution of direct and indirect actions of FB₁ on different cell targets. This in turn will depend on factors as kinetics and extent of toxin production by the pathogen, exposure/penetration of the toxin into the cell and nature of the plant variety.

Acknowledgments. This work has been supported by grants from CONACYT, México (40311-Q), DGAPA-UNAM, México (IN208300) and UC-MEXUS, University of California, USA and CONACYT, México (CN-03-118).

LITERATURE CITED

Ferrante, M.C., Meli, R., Mattace-Raso, G., Esposito, E., Severino, L., Di Carlo, G. and Lucisano, A. (2002) Effect of fumonisin B1 on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicol. Lett.* 129, 181-187.

Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J. and Gavilanes-Ruíz, M. (2005) Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*. 221, 589-596.

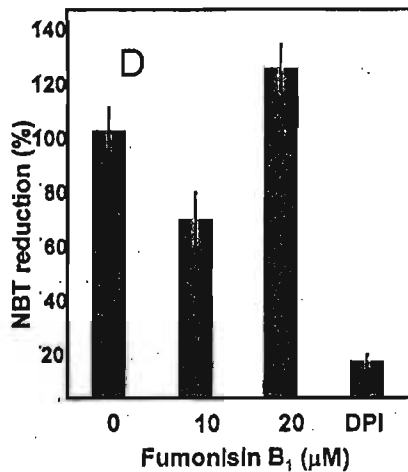
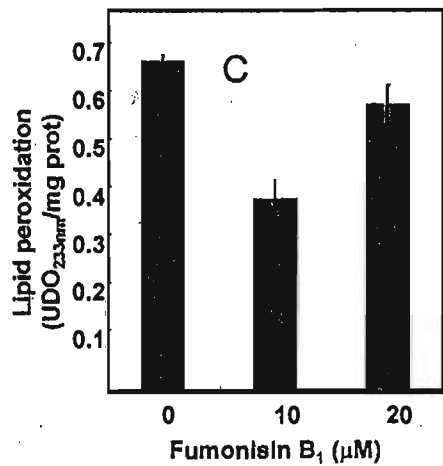
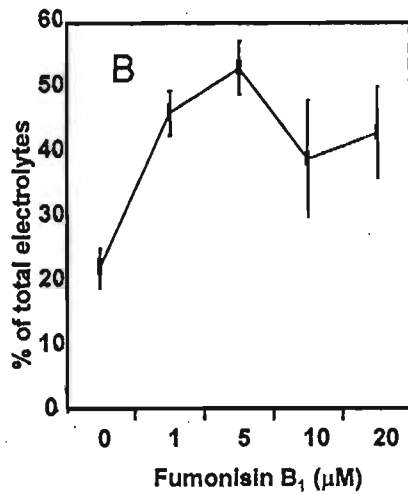
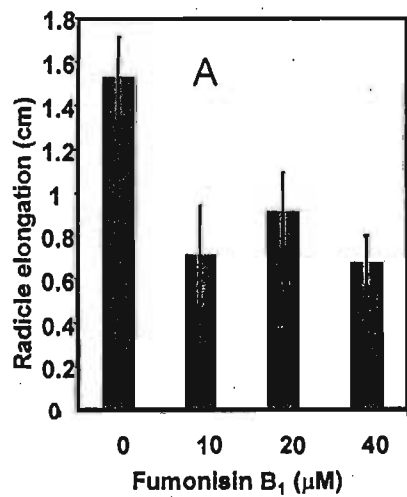
Kauss, H. (1990) Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. In: *The plant plasma membrane* (Larsson, C. and Møller, I. M. eds.), pp. 320-350, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Merrill Jr. A.H., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K.A. and Riley, R. T. (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption. *Env. Health. Perspectives* 109, 283-289.

Yin, J-J., Smith, M. J., Eppley, R. M., Page, S. W. and Sphon, J. A. (1998) Effects of fumonisin B₁ on lipid peroxidation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1371, 134-142.

Figure legends

Fig. 1. Effects of FB₁ the plasma membrane from maize embryos. Maize embryos were imbibed in the presence of the indicated FB₁ concentrations. After 24 h, radicle elongation was measured (A), electric conductance of the medium was determined (B) or plasma membrane vesicles were isolated to determine levels of lipid peroxidation (C) and superoxide formation (D).



DISCUSIÓN

Los hongos pueden dañar o destruir semillas a través de la producción de varios compuestos como a) enzimas, como celulasas, pectinasas, amilasas, lipasas, proteasas y nucleasas, que destruyen compuestos específicos de la semilla, y b) toxinas que pueden causar la inhibición de la germinación, la ruptura de membranas celulares y el incremento de la fuga de electrolitos de las semillas (Baskin y Baskin, 1998). Actualmente se conoce poco sobre los mecanismos de acción de la mayoría de las fitotoxinas; sin embargo, entre las mejor estudiadas se encuentran las toxinas selectivas del hospedero, como las producidas por los hongos de los géneros *Alternaria* y *Cochliobolus* (Walton, 1996). Se han descrito algunos mecanismos de acción de toxinas no-selectivas del hospedero como las toxinas fúngicas fusicoccina, las beticolinas y más recientemente las fumonisinas, así como de las toxinas bacterianas siringomicina y sus análogos estructurales; todas éstas se han destacado por su importancia en toxicosis en animales, plantas y el hombre (Yoder, 1980).

La FB₁ es una micotoxina que *F. verticillioides* produce en forma abundante y que puede afectar la germinación de una semilla de maíz (Doehlert *et al.* 1994), ya sea por que fuera infectada por el hongo durante su almacenamiento o bien porque la semilla se expuso al hongo en el suelo (Lacey, 1986). En esta tesis se diseñó un sistema experimental para estudiar la interacción planta-patógeno a través de la adición de la toxina FB₁ a embriones de semillas de maíz en el período de protrusión de la radícula, con la idea de dilucidar mecanismos de acción de agentes patógenos en la germinación de semillas, enfocándose en aquellos que operan en la membrana plasmática.

Con esta finalidad, se siguieron dos estrategias experimentales: la de la adición de la toxina a vesículas de membrana plasmática o bien a los embriones enteros en germinación. En el desarrollo de los trabajos se obtuvieron resultados que inciden en dos aspectos del conocimiento básico: el mecanismo de acción de una micotoxina a nivel de la membrana plasmática en un sistema vegetal, y sus repercusiones fisiológicas en la germinación de la semilla y la influencia del entorno lipídico en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. En esta discusión se consideran los puntos principales a los que se hace referencia en los artículos respectivos mostrados en la sección de resultados, pero se ha procurado ampliar o incluir aquellos que no fueron tratados en las publicaciones mencionadas por las restricciones de espacio.

I. ACCIÓN DIRECTA DE LA MOLÉCULA DE FB₁ SOBRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

1. La FB₁ disminuyó la rigidez de la región hidrofóbica de la membrana plasmática

Es bien conocido que la fluidez membranal es una propiedad que refleja la movilidad lateral y la velocidad de movimiento rotacional de las moléculas de lípidos y proteínas en la membrana. Fisiológicamente, la fluidez es alterada debido a factores como el desarrollo, envejecimiento y exposición a agentes tóxicos y a estreses como el de la temperatura. Mas aún, las modificaciones en la fluidez membranal están vinculadas a alteraciones en los procesos fisiológicos de la célula como el transporte membranal, actividades de enzimas membranales, enlace a receptores, fagocitosis, endocitosis, citotoxicidad y crecimiento celular. La FB₁ aumentó la fluidez de la membrana plasmática de embriones de maíz cuando esta toxina se agregó directamente a las vesículas de membrana plasmática aisladas de embriones de maíz embebidos sin la FB₁ (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005a). Los valores de la polarización de la fluorescencia del DPH obtenidos en estos experimentos de la medición de la fluidez membranal fueron similares a los presentados por membranas plasmáticas de raíces de maíz (Bohn *et al.* 2001). Los cambios registrados en los valores de polarización fueron significativos y comparables en magnitud a valores de la fluidez medida en vesículas de membrana plasmática de avena, en donde la adición de colesterol o estigmasterol produjo un aumento de la fluidez con respecto al control (Cooke *et al.* 1994).

El efecto de la FB₁ en la fluidez concuerda con los efectos de la toxina reportados en la membrana plasmática de macrófagos, en donde se observó un aumento en la fluidez membranal debido al tratamiento con 10 μ M de FB₁. En liposomas, la FB₁ (10% mol en las membranas), produjo un aumento en la fluidez de la fase de líquido desordenado de la membrana, que se interpretó como un efecto desestabilizante en el que las fumonisinas producen irregularidades en la estructura membranal, proponiéndose que la cadena hidrocarbonada de la FB₁ interactúa con las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos y los grupos de ácido tricarbálico, con sus cabezas polares (Yin *et al.* 1996; Ferrante *et al.* 2002).

2. La FB₁ inhibió a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por un mecanismo de cinética acompetitiva

Al medir la actividad de la ATPasa de H⁺ de embriones de maíz determinando la actividad de hidrólisis de ATP, ésta fue de 3216 \pm 138 nmol Pi/mg/h, valor similar en orden

de magnitud a actividades en otros tipos de tejidos y en otras especies, como la reportada en *V. gigantea*, de 6740 ± 800 nmol Pi/mg/h (Harada *et al.* 2002).

Cuando se midió la actividad de la ATPasa de H^+ en las membranas plasmáticas aisladas de embriones de maíz a las que se añadieron diferentes concentraciones de la FB_1 , se observó que la FB_1 inhibió la actividad de esta enzima acompetitivamente con una K_i de $17.51 \mu M$ (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005a). La inhibición acompetitiva es rara en los seres vivos (Cornish-Bowden, 1986), aunque se han reportado algunos ejemplos de este tipo de inhibición, como la de la desacetilasa de histonas de maíz por la toxina HC de *Cochliobolus carbonum* (Brosch *et al.* 1995). Sin embargo, otros tipos de inhibición como la competitiva y no-competitiva son más comunes. Por ejemplo, la toxina bacteriana fuscopeptina B produce una inhibición en la ATPasa de H^+ de tipo no-competitivo con una K_i de $1 \mu M$ (Batoko *et al.* 1998). También las toxinas producidas por el hongo *Cercospora beticola* inhiben la actividad de esta enzima; la beticolina 1 inhibe la actividad de la ATPasa H^+ purificada y solubilizada, desde concentraciones micromolares, siendo una inhibición del tipo no-competitivo. Es interesante que esta misma toxina inhibiera competitivamente a la ATPasa cuando la enzima purificada se insertó en liposomas (Simon-Plas *et al.* 1996). Estos datos sugieren que el tipo de inhibición sobre la actividad de esta enzima producida por estos compuestos puede depender del entorno lipídico de la enzima y que esta inhibición es el resultado de que la toxina modifica la interacción de la ATPasa con los lípidos que la rodean. A este respecto es importante hacer notar que, en nuestro caso, el efecto inhibitorio de la FB_1 sobre la actividad de la ATPasa de H^+ no se correlacionó con los cambios en la fluidez membranal, ya que el efecto de la FB_1 sobre la fluidez tuvo una I_{50} de $0.77 \mu M$, mientras que la K_i para la inhibición de la enzima fue de $17.51 \mu M$. Esto permite proponer que en el efecto de la FB_1 puede deberse a una interacción directa entre la toxina y la enzima, pero sólo a mayor concentración.

3. La esfinganina y la fitoesfingosina inhibieron a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

En los embriones de maíz se observó *in vitro* que la esfinganina y la fitoesfingosina, bases esfingoideas relacionadas estructuralmente a la FB_1 , inhibieron la actividad de la ATPasa de H^+ en la misma magnitud que la toxina, lo que sugería que los sitios a los que se unen estas moléculas en la enzima o a su entorno podrían ser los mismos (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c). Se ha observado que concentraciones micromolares de esfingosina, una base esfingoidea y análogo estructural de la esfinganina, inhiben las ATPasas tipo P, como la ATPasa de Ca^{2+} y la ATPasa de Na^+/K^+ en células animales (Oishi *et al.* 1990,

Pandol *et al.* 1994). Las ATPasas de Ca^{2+} y de Na^+/K^+ de células animales se inhiben por la esfingosina, que difiere de la esfinganina en la presencia de una doble ligadura. En ambas ATPasas, el efecto inhibitorio de la esfingosina se asoció con una modificación en el entorno membranal de la enzima, aunque en el caso de la ATPasa de Ca^{2+} , el efecto de la esfingosina también está relacionado con un efecto sobre la cinasa C que fosforila a la ATPasa (Pandol *et al.* 1994, Oishi *et al.* 1990). Estudios más recientes efectuados sobre la acción de la esfingosina y la ceramida sobre esta enzima reportaron que la esfingosina inhibe a la enzima aislada y purificada, lo cual indica claramente que este compuesto sí interacciona directamente con la enzima (Colina *et al.*, 2002). Los autores mencionan que los grupos que pueden estar interactuando con la enzima son los grupos hidroxilo en las moléculas de esfingosina y ceramida. La FB_1 tiene una estructura muy similar a estas bases esfingoideas: presenta grupos hidroxilo en su estructura e inhibe la actividad de hidrólisis del ATP en el mismo porcentaje que esfinganina y fitoesfingosina, lo cual sugiere que podría presentarse una interacción similar entre esta toxina y la ATPasa de H^+ .

II. ACCIÓN DE LA FB_1 SOBRE LA MEMBRANA A TRAVÉS DE LA MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ESFINGOLÍPIDOS MEMBRANALES

1. La adición de FB_1 a los embriones inhibió a la ATPasa de H^+ sin que se detectara a la toxina en la membrana

Los cambios en la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática pueden ser importantes en la defensa contra patógenos (Schaller y Oecking, 1999) y esto se ha observado en otros tipos de estrés. Por ejemplo, se ha observado que la actividad de esta enzima aumenta en respuesta al estrés salino y osmótico, pero se inhibe ante el estrés por metales (Niu *et al.* 1993; Spickett *et al.* 1993; Fodor *et al.* 1995). También se ha propuesto que una forma en que la planta responde contra los efectos del estrés abiótico es ajustando la población de ATPasas que transportan H^+ , canales iónicos o proteínas que aseguran el funcionamiento membranal para unas adecuadas compartimentalización y homeostasis (Niu *et al.* 1993).

La FB_1 inhibió a la ATPasa de H^+ de vesículas de membrana plasmática al añadirla a los embriones durante la imbibición de 24 h (Gutiérrez-Nájera, 1999; Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c). Sin embargo, no se detectó la FB_1 en las membranas aisladas donde se estaba midiendo esta actividad inhibida, por lo que es posible que la acción de la FB_1 se esté dando en blancos citosólicos que tuvieran una repercusión en la membrana plasmática y en la ATPasa de H^+ . Aunque no se descarta la posibilidad de que en el

proceso de aislamiento de las vesículas de membrana plasmática se elimine la FB₁ remanente que estuviera débilmente asociada a la membrana plasmática.

Se observó que el efecto máximo sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ se encontraba a 10 μM, sin que haya un efecto proporcional a la concentración de la toxina a concentraciones de 20 μM en adelante. Se ha reportado que la ATPasa de Ca²⁺ de membrana plasmática de eritrocitos es inhibida por esfingosina (análogo estructural de FB₁). Esta inhibición es dependiente de la dosis de esfingosina hasta 10 μM donde el efecto se satura (Colina *et al.* 2002) Un efecto similar se observó en ATPasa de Ca²⁺ de células de páncreas (Pandol *et al.* 1994).

2. La adición de FB₁ a los embriones de maíz aumentó los niveles de bases esfingoideas en las membranas celulares

Se ha reportado que el efecto de la FB₁ puede estar mediado por su acción en el metabolismo de esfingolípidos, en particular por la inhibición bien caracterizada de la enzima esfinganina-N-acil transferasa, la cual produce la ceramida, lo que lleva a un incremento de las bases esfingoideas tanto en plantas como en animales (Wang *et al.* 1991, Abbas *et al.* 1994). Se ha encontrado que las bases de cadena larga que se acumulan por acción de la FB₁ en lenteja de agua (*Lemna pausicostata*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) son la esfinganina y la fitoesfingosina (Abbas *et al.* 1994; Abbas *et al.* 1998). En los embriones de maíz, cuando se midieron los niveles de las bases esfingoideas esfinganina y fitoesfingosina se observó que los niveles de fitoesfingosina no se modificaron en la membrana plasmática de los embriones de maíz expuestos a la toxina, mientras que la esfinganina aumentó 10 veces (en términos de pmol de bases esfingoideas/mg de ácido graso). Por otra parte, en la fracción microsomal la cantidad de fitoesfingosina aumentó 4.4 veces, pero sin cambios significativos en los niveles de esfinganina (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c). Comparando estos valores, en células en cultivo de macrófagos se encontró que la FB₁ aumentó la masa total de bases esfingoideas en estas células (esfingosina y esfinganina) de 137±2.6 pmol/mg proteína a 207±2.5 pmol/mg proteína y en hepatocitos la cantidad total de esfinganina aumentó 110 veces cuando fueron expuestos a FB₁ por 4 días (Wang *et al.* 1991; Smith y Merrill, 1995). En *L. pausicostata* y en *L. esculentum* la fitoesfingosina aumentó 19-51 veces y la esfinganina de 76-196 veces después de un tratamiento de 24 h con 1 μM de FB₁, aunque en retoños de maíz se han observado incrementos de esfinganina total de aproximadamente 4 veces y de fitoesfingosina de 2-8 veces después de 21-29 h de tratamiento con FB₁ (Abbas *et al.* 1994; Abbas *et al.* 1998; Wrigth *et al.*

2003). Debe hacerse notar que los datos mencionados se hicieron en homogeneizados totales de tejido. Aunque estas bases se acumulan en la membrana plasmática (Merrill *et al.*, 2001), se ha observado que también podrían encontrarse estas bases y algunas otras acumuladas en lisosomas, lugar donde se degradan esfingolípidos complejos o en retículo endoplásmico, en donde se sintetizan estas bases de cadena larga (Slife *et al.* 1989; Merrill, 1994). Los esfingolípidos, especialmente los glicolípidos, son componentes importantes de la membrana plasmática de plantas, por ejemplo en raíces de maíz se ha cuantificado en membrana plasmática este tipo de lípidos, encontrándose en cantidades de 83.2 ± 9.1 nmol/mg proteína (67.5 μ g/mg de proteína, 6.8 %mol) (Bohn *et al.* 2001). Las especies de glucocerebrósidos de membrana plasmática de hojas de centeno tienen como principal componente los ácidos grasos C_{22} y C_{24} hidroxilados, monoinsaturados y saturados (juntos son más del 65% en peso), combinados con 4-hidroxisfingenina (Cahoon y Lynch, 1991). Sin embargo, también se encontraron 4,8-esfingadienina y 4-hidroxisfinganina en estos glucocerebrósidos aislados de membrana plasmática. En otras especies de plantas se han encontrado bases insaturadas tales como 8-esfingeninas y 8 o 9-fitoesfingeninas (Merrill, 2002).

3. La fluidez de la membrana plasmática disminuyó por el aumento en esfinganina y no se correlacionó con un cambio en los niveles membranales de ácidos grasos o de proteína total

La fluidez de la membrana plasmática de embriones disminuyó al añadir FB_1 al medio de imbibición de los embriones. El efecto en la disminución de la fluidez al agregar 10 μ M de FB_1 se mantuvo a temperaturas de 5 a 35 $^{\circ}$ C (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c).

Suele aceptarse que las proteínas membranales influyen en el orden y movimiento del núcleo lipídico sólo dentro de un rango muy estrecho al que contribuyen los lípidos de la primera capa de solvatación en los cuales las proteínas están embebidas. El número de lípidos que rodean a las proteínas y se intercambian con el resto de los lípidos de la membrana varía de acuerdo con el tamaño de la proteína, siendo generalmente de 22-60 lípidos por proteína integral (Jost *et al.* 1977; Knowles *et al.* 1979; Thomas *et al.* 1982). Se ha demostrado que cuando se incrementa la proporción proteína/lípido, se incrementa el nivel de orden en las cadenas de los lípidos adyacentes a la proteína (Lentz, 1988). Por tanto, la presencia de proteínas en la membrana a temperaturas por arriba de la transición de fase mejora el parámetro de orden. También se ha observado que las ATPasas de Ca^{2+} y de Mg^{2+} muestran un aumento dramático en la microviscosidad, lo cual señala una disminución de la movilidad de los lípidos en presencia de estas proteínas (Parola, 1993).

A este respecto, es importante hacer notar que ni la cantidad de proteína total ni la de proteína membranal se modificaron al exponer los embriones a la FB₁ durante la imbibición, lo cual implica que los niveles de proteína membranal no son afectados por la FB₁, y que por tanto, esto no puede ser la razón del aumento en la rigidez membranal.

La fluidez membranal también depende de la composición de ácidos grasos. En raíces de maíz se cuantificaron los principales ácidos grasos de la membrana plasmática, encontrándose que los ácidos grasos más abundantes eran 16:0 (33.2%mol), 18:2 (50%mol), 18:1 (3.7%mol), 18:0 (1.7%mol), 18:3 (1.5%mol) y los hidroxilados 20:0 (2.3%mol) y 24:0 (1.7%mol) (Bohn *et al.* 2001). Estos valores concuerdan con los datos de embriones de maíz embebidos en presencia y en ausencia de la toxina, en los que los ácidos grasos predominantes fueron el ácido palmítico (16:0), el esteárico (18:0), el oleico (18:1) y el linoleico (18:2), los cuales suman el 98% de los ácidos grasos totales. Sin embargo, la imbibición de embriones con fumonisina B₁ no modificó los niveles de ácidos grasos totales ni los porcentajes de los principales ácidos grasos detectados en la membrana plasmática, al igual de lo que sucede en células de adenocarcinoma de colon humano, en las que el tratamiento con FB₁ afectó los niveles de esfingolípidos, pero no modificó los niveles de ácidos grasos, fosfatidil colina, o fosfatidil etanolamina (Stevens y Tang 1997). Por el contrario, la FB₁ incrementó los niveles de los ácidos grasos poliinsaturados C18:2n-6 y C20:4n-6 a 150 y 500 μ M en hepatocitos de rata (Gelderblom *et al.* 1996). Esto puede estar relacionado con el efecto que se ha encontrado en levaduras y macrófagos, la esfingosina/esfinganina-1-fosfato se degrada a hexadecenal y etanolamina fosfato, que es utilizada para la síntesis de fosfatidiletanolamina (Smith y Merrill, 1995). La constancia en los niveles de los ácidos grasos en embriones expuestos a FB₁ sugiere que la fluidez no está siendo modificada por cambios en los niveles de ácidos grasos y sí por el aumento en esfinganina membranal.

Si bien no se determinaron los niveles de ceramida, los de esfinganina aumentaron 10 veces en la membrana plasmática. Este cambio por sí mismo podría originar disminución en la fluidez membranal, pues es congruente con la capacidad tanto de los hidroxilos de las bases esfingoideas, como la de los grupos amino de éstas para formar puentes de hidrógeno con las moléculas adyacentes, lo cual lleva a la estabilización de la membrana y por tanto a un incremento del orden de las cadenas de sus lípidos, dando lugar a una disminución en la fluidez membranal (Pascher, 1976).

Como ya se mencionó, los ácidos grasos que forman parte de la ceramida de algunos cerebrósidos son a menudo ácidos grasos hidroxilados (más del 80% en la ceramida de raíces de maíz) (Bohn *et al.* 2001), los cuales para formar ceramida, están combinados con bases esfingoideas como hidroxiesfinganina (con 3 hidroxilos). Al

parecer, en los embriones la cantidad de ácidos grasos hidroxilados es muy pequeña (menor al 2%). Se podría sugerir por tanto que su contribución no modificaría la fluidez membranal. El gran aumento de esfinganina sí podría ser el responsable de la disminución de la fluidez, si bien una pérdida de ceramida puede conducir a la pérdida de la estructura membranal. Sin embargo, el aumento en la concentración de esfinganina parece ser mucho mayor que la disminución de la ceramida membranal (resultados preliminares, Martínez-Noyola *et al.* 2005), lo cual implicaría que el efecto de rigidización de la esfinganina prevalece sobre el efecto de des-rigidización de la falta de ceramida. Una explicación probable a que no se haya observado una disminución proporcional de la ceramida correspondiente al aumento en bases esfingoideas es que las ceramidas membranales (libres o en forma de esfingolípidos) tienen un bajo recambio (larga vida media), lo cual concordaría con el hecho de que las actividades de ceramidasa y glucosilceramidasa sean menores en los tejidos con crecimiento activo (Lynch *et al.*, 1999). No se descarta el hecho de que con nuestro método de cuantificación de ceramida, que detecta sólo ceramidas libres, no se estén registrando cambios en la ceramida que está formando parte de los esfingolípidos complejos.

4. La peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática disminuyó por adición de la FB₁ a los embriones de maíz.

En estudios de ESR (electron spin resonance) en liposomas de fosfatidilcolina y usando sondas que monitorean el parámetro de orden membranal, se observó que la FB₁ perturba las cadenas hidrocarbonadas cerca de la superficie membranal y que aumenta el transporte de oxígeno a través de la membrana, lo cual produce una peroxidación de los lípidos de los liposomas, explicando que de esta manera la FB₁ aumenta la frecuencia de colisiones bimoleculares de oxígeno y/o especies reactivas de oxígeno con las moléculas objetivo y acelerando por tanto el proceso entero de peroxidación lipídica (Yin *et al.* 1996a; Yin *et al.* 1996b; Yin *et al.* 1998). En membranas plasmáticas de macrófagos y en células de riñón de mono se observó el mismo efecto en la peroxidación de lípidos, después de ser tratadas con FB₁ (Ferrante *et al.* 2002; Abado-Becognee *et al.* 1998).

En la membrana plasmática de embriones de maíz embebidos con la toxina la peroxidación de lípidos extraídos de estas membranas fue menor a la peroxidación lipídica presente en las membranas control (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005b). No tenemos una interpretación inequívoca para esto, pero el hecho de que se haya reportado durante la germinación de maíz un estrés de especies reactivas de oxígeno y la presencia de mecanismos enzimáticos para contender con él, sugiere que estos mecanismos están siendo activados por la FB₁ (Mori y Schroeder, 2004).

Por otro lado se ha reportado que en dos especies de *Nicotiana* y en la lechuga, la producción de especies reactivas de oxígeno es parte de la respuesta de hipersensibilidad, como defensa contra el ataque de un patógeno, lo cual lleva a una peroxidación lipídica y a la pérdida de la integridad membranal que conduce a la muerte celular localizada (Rustérucci *et al.* 1996; Bestwick *et al.* 1997). En resultados preliminares en el laboratorio, se ha observado que 10 μM de FB_1 inhibe la actividad de la NADPH oxidasa, la cual produce el radical superóxido (Rodríguez-Mejía *et al.*, 2005), y que en parte podría explicar la disminución en la peroxidación de lípidos observada tras la adición *in vivo* de la FB_1 . Esto también podría implicar que uno de los mecanismos de la toxina es evitar que se produzcan procesos oxidativos que llevan a despertar la respuesta de defensa contra el patógeno.

5. La inhibición producida en la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática está asociada a la disminución membranal de ceramida y no al incremento en esfinganina o a una menor cantidad de enzima o a una pérdida en la fluidez membranal

Como se mencionó en la sección 1 de esta discusión, la ATPasa de H^+ se inhibe al agregar FB_1 al medio de imbibición de los embriones, además de que se incrementan los niveles de esfinganina endógena y disminuye la fluidez membranal. Es interesante que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} es inhibida por la esfingosina, una base esfingoidea y es estimulada por las ceramidas C_2 y C_8 (Colina *et al.* 2002). *In vitro* ya habíamos observado que bases esfingoideas como fitoesfingosina y esfinganina inhiben la actividad de la ATPasa en una proporción similar a la producida por la FB_1 . Éstos datos y el aumento masivo de esfinganina en la membrana plasmática sugerían que la esfinganina podría ser la responsable de la inhibición de la actividad de la ATPasa en nuestro sistema, descartando a la FB_1 , ya que no se detectó a la toxina en las membranas que utilizamos para estos ensayos. Sin embargo cuando se midió la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de embriones expuestos a esfinganina y fitoesfingosina exógenas, ninguna de las dos bases esfingoideas produjo la inhibición de la actividad de la ATPasa como la que era producida por FB_1 a la misma concentración (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c). Esto descarta la posibilidad de que los niveles de esfinganina fueran los responsables de la inhibición de la actividad de la ATPasa. El argumento se refuerza por el resultado de añadir miriocina al medio de imbibición de los embriones, la cual es un inhibidor de la serín palmitoil transferasa, enzima responsable de la síntesis de bases esfingoideas a partir de L-serina y palmitoil-CoA. La actividad de la ATPasa no se modificó por la adición de este inhibidor de la síntesis de bases esfingoideas.

Por otra parte, ya se había reportado que no hay relación significativa entre la fluidez y la actividad de la ATPasa de H^+ en vesículas de membrana plasmática de avena al agregar distintos tipos de esteroides (Cooke *et al.* 1994). En nuestro sistema esto se reproduce, ya que los resultados de los experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* producen una disminución y un aumento en la fluidez respectivamente y en ambos casos se inhibe la actividad de ATPasa. Esto indica que los cambios en la actividad enzimática son independientes de la fluidez.

6.- Probables mecanismos de acción de la ceramida en la actividad de la ATPasa de H^+

Como ya se mencionó, el efecto reportado por FB_1 en el incremento de bases esfingoideas también se acompaña por la disminución de los niveles de ceramida y otros esfingolípidos complejos (Yoo *et al.*, 1996). Cuando se añadió ceramida exógena al medio de imbibición de los embriones de maíz o directamente a las membranas plasmáticas, no se modificó la actividad de la enzima (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c). Esto es diferente a lo que se observó en la ATPasa de Ca^{2+} donde se encontró que la ceramida C8 estimula la actividad de esta enzima, un efecto antagónico al que produce la esfingosina (Colina *et al.* 2002).

Al añadir la FB_1 junto con la ceramida se observó que la actividad de la ATPasa no se inhibió como cuando se agrega únicamente la FB_1 (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005c). Esto sugiere fuertemente que la actividad de la enzima es inhibida por la disminución en los niveles de ceramida y señala que la actividad de la enzima puede depender de su interacción de la proteína con el entorno lipídico, dado por niveles precisos de ceramida endógena.

Tanto la ceramida como las bases esfingoideas pueden ser componentes de los microdominios membranales llamados balsas de lípidos, que se cree que son sitios de organización de componentes de señalización localizados en la membrana (Hannun y Obeid, 2002). En membranas modelo se ha observado que la ceramida y el colesterol promueven la formación de estos dominios, sin embargo, se ha observado que la estructura y composición de esfingolípidos pueden modular la formación de éstos microdominios, los cuales son estructuras más rígidas (estado ordenado de gel) con una menor fluidez membranal (Xu *et al.*, 2001). La disminución de la fluidez *in vivo* pudiera sugerir la presencia o formación de éstos inducida por la FB_1 dados los altos niveles de esfingonina. En el laboratorio se han aislado fracciones resistentes a la solubilización con tritón X-100 de membranas de embriones de maíz y que están enriquecidas en la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (Carmona-Salazar *et al.* 2005, Gutiérrez-Nájera *et al.*

2005c). Esta no sería la primera proteína membranal que se encuentra en microdominios de esfingolípidos y colesterol (rafts), cuya actividad es modificada por el efecto de FB₁ en los niveles de esfingolípidos membranales. Tal es el caso del receptor a folato, una proteína anclada a través de glicosilfosfatidilinositol a dominios membranales, enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Se ha demostrado que la unión de folato a este receptor es inhibida por la disminución de colesterol celular o de esfingolípidos endógenos inducida por FB₁ (Chang *et al.* 1993, Stevens y Tang 1997). Esta inhibición era dependiente de la concentración de la toxina y de la duración del tratamiento. Al parecer el efecto no era producido por una interacción directa entre el receptor y la toxina, sino que fue mediado solamente por la disminución de esfingolípidos (Stevens y Tang 1997).

Aunque hay poca evidencia sobre el papel de las bases esfingoideas como segundos mensajeros, recientemente se ha demostrado que la esfingosina-1-fosfato es un mensajero activo que moviliza Ca²⁺ en la señalización de células guarda en estrés hídrico y ácido abscísico en *Commelina communis* (Ng *et al.*, 2001). En las células guarda de *Arabidopsis thaliana* se ha descubierto que S1P modula el turgor celular, afectando las actividades de los canales de entrada de K⁺ en la membrana plasmática y haciendo más lentos los canales de aniones, estando ambos tipos de canales regulados por cambios en las concentraciones de Ca²⁺ citosólico (Schroeder *et al.* 2001). De hecho, se ha reportado la actividad de esfingosina cinasa en este tipo de células y en raíces de maíz (Crowther y Lynch, 1997). Se sabe también que la señalización de la esfingosina-1-fosfato depende de una proteína G α , sin embargo, todavía no se identifica el receptor acoplado a la proteína G, por lo cual se postula que la S1P opera vía una nueva clase de receptor en plantas (Coursol *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que la esfingosina activa una nueva clase de cinasas, las cuales son referidas como cinasas dependientes de esfingosina que fosforilan miembros de la familia de proteínas 14-3-3, las cuales tienen un papel importante en vías de trasducción de señales (Megidish *et al.*, 2000).

Si bien en las membranas que aislamos de embriones de maíz no cuantificamos la esfingosina, esto no quiere decir que no exista, incluso la esfinganina que detectamos puede originar a la esfinganina-1-fosfato o esfingosina-1-fosfato. Al respecto se ha clonado la enzima dihidroceramida desaturasa (que añade el doble enlace a la esfinganina incorporada a la ceramida) y la esfinganina/esfingosina cinasa en plantas, como se mencionó anteriormente (Crowther y Lynch, 1997; Sperling *et al.* 2001). Muy probablemente, la esfinganina, ceramida y otras bases esfingoideas, estarían ubicadas en la membrana plasmática y tendrían efectos en la señalización en plantas. Con ello, este podría ser otro nivel de acción de los compuestos esfingoideos: como segundos

mensajeros, constituyendo la membrana plasmática una poza de ceramida, bases de cadena larga y otros esfingolípidos que pueden degradarse y fosforilarse dando esfinganina/esfingosina-1-fosfato, que pueden interactuar con receptores y/o modificar las actividades de canales de K^+ y Ca^{2+} , llevando a otros elementos de la trasducción de señales como cinasas y fosfatasas y de ahí probablemente a blancos de fosforilación como la ATPasa.

III. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LOS EFECTOS DE LA FB_1 EN LA MEMBRANA

1. El efecto inhibitorio de la FB_1 en el crecimiento radicular está asociado a su inhibición sobre la ATPasa de H^+ .

Se ha propuesto que la acidificación del medio apoplástico extracelular producido por la ATPasa de H^+ inicia la expansión celular en varios tejidos vegetales, lo cual es un evento importante en la elongación radicular y por lo tanto en la germinación de una semilla. La acidificación del apoplasto seguido por elongación celular se ha observado con fusiococina, y está relacionada con la estimulación de la actividad de la ATPasa de H^+ por esta toxina (Lanfemeijer *et al.*, 1994). Varios estudios han mostrado que la auxina incrementa el nivel de ATPasa de H^+ de la membrana plasmática por un factor de dos o tres veces en tejidos en alargamiento, tales como coleoptilos de maíz (Hager *et al.* 1991, Frías *et al.* 1996). Este proceso se ha observado también en la elongación del escutelo durante la formación del embrión de trigo (Rober-Kleber *et al.* 2003).

En experimentos con embriones enteros, la FB_1 inhibió la acidificación del medio acuoso producida por los embriones de maíz, este hecho podría deberse parcialmente a la inhibición de la actividad de la ATPasa de H^+ producida por FB_1 (Gutiérrez Nájera *et al.* 2005a). En nuestro sistema de embriones de maíz en germinación, la FB_1 inhibió la elongación radicular un 50% a una concentración de 10 μM , sin modificar el porcentaje final de viabilidad (Gutiérrez-Nájera, 1999; Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005a). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en semillas completas de maíz en germinación, donde la FB_1 inhibe la elongación radicular desde 1.4 μM (Dohelert *et al.* 1994) y lo observado en callos de maíz, en donde la FB_1 inhibió el crecimiento desde una concentración de 1.3 μM , con una I_{50} de aproximadamente 13.0 μM (Van Asch *et al.* 1992). Sin embargo, Dohelert y colaboradores (1994) observaron que la FB_1 también inhibía amilasas de bajo punto isoeléctrico, lo cual sería un factor adicional que contribuiría a la inhibición del crecimiento radicular, ya que se estaría evitando la movilización de las reservas en la semilla completa para el crecimiento de sus tejidos

durante la germinación. Este efecto, no obstante, no está presente en el sistema de embriones en germinación, pues carece de endospermo.

2. El escape de electrolitos inducido por la FB₁ puede estar revelando un mecanismo de MCP (muerte celular programada) relacionado con mecanismos de defensa

Observamos que la FB₁ produce un aumento en la fuga de electrolitos en embriones de maíz expuestos a un medio acuoso. Esto concuerda con una de las acciones de las toxinas no selectivas del hospedero. Algunas toxinas como la beticolina 0 se organizan en poros transmembranales, tipo canal no selectivo, en presencia de Mg²⁺, lo cual puede explicar sus efectos tóxicos, al colapsar los gradientes iónicos y eléctricos a través de la membrana plasmática, además de promover influjos de Ca²⁺ y de perturbar señales celulares (Goudet *et al.* 1998). En liposomas se observó que la FB₁ perturba la región de las cadenas hidrocarbonadas cerca de la superficie membranal y que mejora la permeabilidad a aniones y cationes a través de estas membranas modelo. En otras palabras, el incremento de la permeabilidad correspondía a la disminución en el ordenamiento de estas membranas (Yin *et al.* 1998). En células animales, de riñón de cerdo, la FB₁ (10-50 µM) causó un incremento en esfinganina intracelular libre, la cual precedió a la disminución de esfingolípidos complejos, la inhibición del crecimiento celular y muerte celular. Los efectos sobre el crecimiento y la muerte celular correlacionaron con el incremento en bases esfingoideas libres y la disminución de los esfingolípidos complejos (Yoo *et al.* 1996).

En plantas, Abbas y colaboradores (1995) observaron un aumento de las bases esfingoideas previo a la fuga de electrolitos producidos por FB₁ en hojas de maleza, lo cual precedió al colapso de las estructuras membranales en las células de este tejido. Efectos similares se observaron con fitoesfingosina y esfinganina: fuga de electrolitos, colapso de estructuras membranales y muerte celular, por lo que el incremento de estas bases podría ser el responsable de la pérdida de la integridad membranal y muy probablemente de la muerte celular en este tipo de tejido. Se había observado que variedades resistentes de jitomate (*Asc/Asc*) eran mucho menos sensibles al incremento de esfinganina producido por la toxina FB₁ (Abbas *et al.* 1994). También se ha demostrado que la resistencia a la FB₁, así como a las toxinas AAL (*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*) está determinada por *Asc-1*, un gen homólogo al gen de aseguramiento de la longevidad en levaduras LAG1 y que la sensibilidad está asociada con una mutación en *Asc-1*. Se ha sugerido que en la inhibición de la síntesis *de novo* de esfingolípidos

(ceramida principalmente), el producto del gen Asc-1 previene la apoptosis en plantas resistentes a través de la restauración del transporte de proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual es dependiente de la síntesis *de novo* de esfingolípidos en levadura y humanos. Asc-1 puede rescatar a las células de la apoptosis por compensar la disminución de ceramida proponiendo que ASC-1 puede ser una esfinganina-N-aciltransferasa insensible a SAM, y por tanto a FB₁ (Brandwagt *et al.* 2000; Spassieva *et al.* 2002). Esto sugiere que los niveles de ceramida y bases esfingoideas pueden servir como un reostato para determinar si se presenta muerte celular programada o si la célula sobrevive (Worrall *et al.* 2003).

La respuesta de hipersensibilidad (HR) se caracteriza por la muerte de células alrededor del sitio de ataque del patógeno. Esto es claramente observable en las superficies foliares de las plantas, pero no se puede notar en nuestro sistema de embriones. Sin embargo, a este respecto se han medido en el laboratorio varios parámetros que indican muerte celular programada, como la fuga de electrolitos observada en nuestro caso, y la activación de nucleasas (De la Torre, 2005).

CONCLUSIONES PARTICULARES

1. La molécula de FB₁ interactúa con la bicapa lipídica disminuyendo la rigidez de la región hidrofóbica de la membrana plasmática.
2. La FB₁ inhibe a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por un mecanismo acompetitivo.
3. La esfinganina y la fitoesfingosina inhiben a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática cuando se añaden directamente a preparaciones de membranas plasmáticas.
4. La adición de FB₁ a los embriones inhibe a la ATPasa de H⁺ sin que se detecte a la toxina en la membrana.
5. La adición de FB₁ a los embriones de maíz aumentó los niveles de esfinganina en la membrana plasmática y de fitoesfingosina en la fracción microsomal.
6. El aumento de esfinganina correlaciona con la disminución de la fluidez de la membrana plasmática.
7. La FB₁ añadida a los embriones de maíz disminuyó la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática lo que podría estar relacionado con la inhibición de la formación del radical superóxido por la NADPH oxidasa.
8. La inhibición producida por la FB₁ añadida *in vivo* en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática correlaciona con la disminución membranaral de ceramida y no con el incremento en esfinganina.
9. No hubo una correlación entre la inhibición de la ATPasa de H⁺ y los cambios en la fluidez producidos por la FB₁ ya fuera *in vivo* o *in vitro*.
10. La acción inhibitoria de la FB₁ sobre la ATPasa de H⁺ podría estar contribuyendo al efecto de la FB₁ en el crecimiento radicular de embriones de maíz en germinación.
11. El escape de electrolitos inducido por la FB₁ puede estar revelando un mecanismo de muerte celular programada (MCP) relacionado con mecanismos de defensa de la planta contra patógenos (como la respuesta de hipersensibilidad).
12. Los mecanismos propuestos para los efectos a concentraciones bajas de la FB₁ podrían estar involucrados en los efectos observados a concentraciones altas de la FB₁.

CONCLUSIÓN GENERAL

La FB₁ modifica las propiedades y actividades enzimáticas de la membrana plasmática de embriones de maíz a través de dos mecanismos: 1) por su acción directa sobre las moléculas que componen la membrana plasmática, como la bicapa lipídica y enzimas, y 2) indirectamente por modificar los niveles de esfingina y ceramida en la membrana plasmática, como resultado de la inhibición de la esfingina-N-aciltransferasa.

Ya que la FB₁ es una de las toxinas que *F. verticillioides* produce en mayor cantidad, los mecanismos de acción directa de esta toxina sobre la membrana plasmática podrían ser parte de la estrategia de *F. verticillioides* para infectar las células de embriones de maíz en germinación. Sin embargo, los efectos de la adición de la toxina *in vivo*, podrían estar revelando además la existencia de otros mecanismos de defensa contra patógenos inducidos por cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos membranales.

Las conclusiones de este trabajo se presentan en el modelo de la siguiente página.

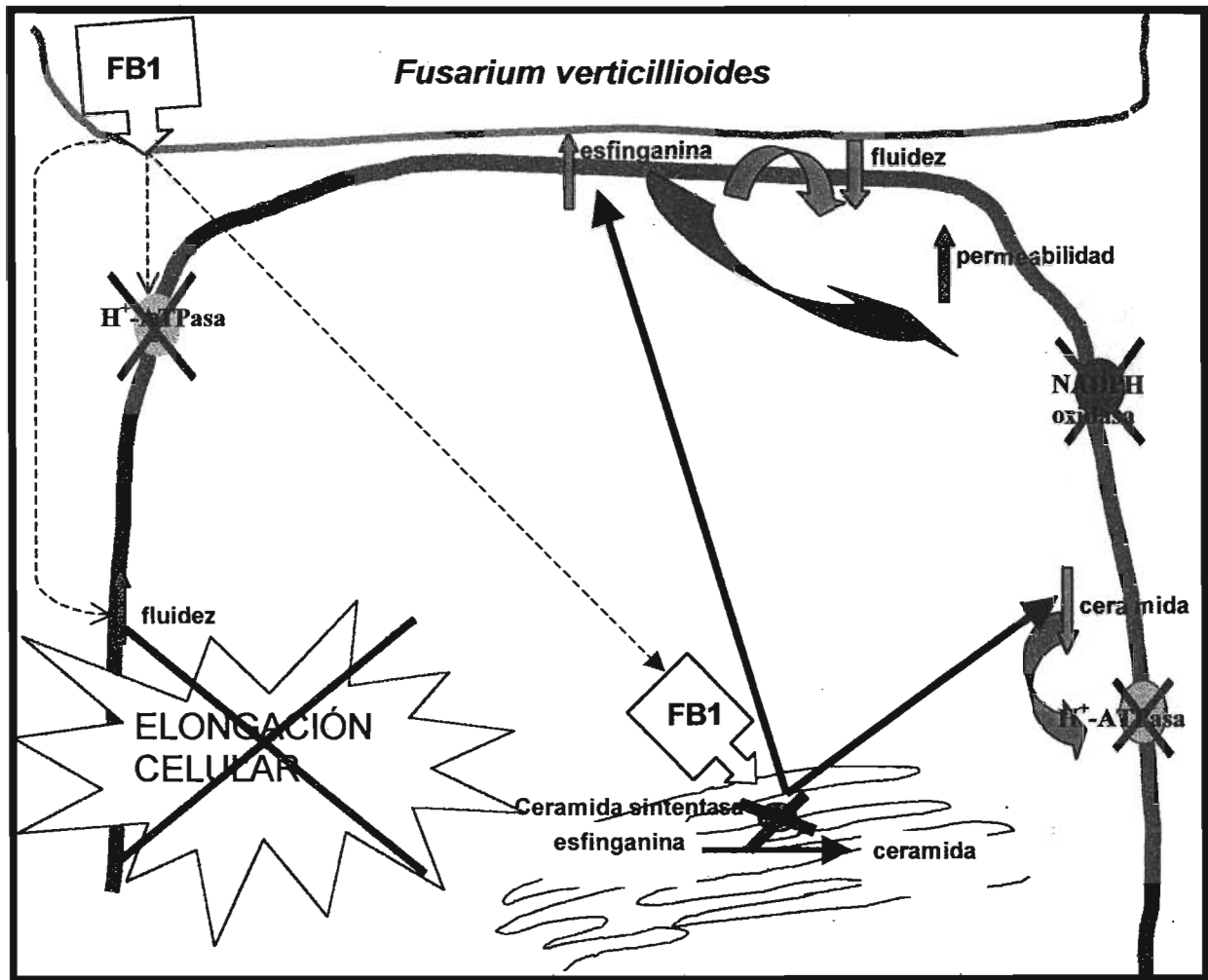


Fig. 6. Modelo que interpreta los efectos de la FB₁ *in vivo* e *in vitro* sobre la membrana plasmática de embriones de maíz. La ATPasa de H⁺ es inhibida por la FB₁. La FB₁ inhibe también a la esfingánina N-aciltransferasa (ceramida sintetasa) produciendo un incremento de esfingánina en la membrana plasmática y una disminución de ceramida, esto último correlaciona con la inhibición de la ATPasa de H⁺ cuando FB₁ es añadida *in vivo*. La FB₁ inhibe la NADPH oxidasa *in vitro* lo que puede estar relacionado con la disminución en peroxidación lipídica de la membrana plasmática. Se incrementa la fuga de electrolitos y la fluidez de la membrana plasmática, lo cual podría relacionarse al incremento de esfingánina en la membrana plasmática. Estos efectos producidos por FB₁ en la membrana plasmática de embriones de maíz contribuyen a la inhibición de la elongación celular y probablemente a la inducción de la muerte celular programada (respuesta de hipersensibilidad) en este sistema.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abado-Becognee K., Mobio T. A., Ennamany R., Fleurat-Lessard F., Shier W. T., Badria F. y Creppy E. E. 1998. Cytotoxicity of fumonisin B₁: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA syntheses. *Arch. Toxicol.* 72: 233-236.
- Abbas H. K. , Boyette C. D., Hoagland R. E. y Vesonder R. F. 1991. Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin. *Weed Sci.* 39: 673-677.
- Abbas H. K., Paul R. N., Boyette C. D. y Duke S. O. 1992. Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* 70: 1824-1833.
- Abbas H. K., Tanaka T., Duke S. O., Porter J. K., Wray E. M., Hodges L., Sessions A. E., Wang E., Merrill A. H., Jr. y Riley R. T. 1994. Fumonisin- and AAL-toxin- induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 106: 1085-1093.
- Abbas H. K., Duke S. O., Raul R. N., Riley R. T. y Tanaka T. 1995. AAL-Toxin, a potent herbicide which disrupts sphingolipid metabolism of plants. *Pestic. Sci* 43: 181-187.
- Abbas H. K., Duke S. O., Merrill A. H., Wang E. y Shier W. T. 1998. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and fumonisin B₁ to *Lemna Pausicostata*. *Phytochemistry* 47: 1509-1514.
- Abrami L. y van der Goot F. G. 1999. Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J. Cell Biol.* 147: 175-184.
- Altabella T., Palazon J., Ibarz E., Pinol M. T. y Serrano R. 1990. Effect of auxin concentration and growth phase on the plasma membrane H⁺-ATPase of tobacco calli. *Plant Sci.* 70: 209-214.
- Arango M., Gévaudant F., Oufattole M y Boutry M. 2003. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 216: 355-365.
- Asai T., Stone J. M., Heard J. E., Kovtun Y., Yorgey P., Sheen J. y Ausubel F. M. 2000. Fumonisin B₁- induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate- dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Axelsen K. B. y Palmgren M. G. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101.

- Baorto D. M., Gao Z., Malaviya R., Dustin M. L., van der Merwe A., Lublin D. M. y Abraham S. N. 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glucolipid traffic. *Nature* 389: 636-639.
- Baskin C.C. y Baskin J. M. 1998. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. 1a. ed. Academic Press, New York. pp 666.
- Batoko H., d'Exaerde A. de K., Kinet J-M, Bouharmont J., Gage R. A., Maraite H. y Boutry M. 1998. Modulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by phytotoxic lipodepsipeptides produced by the plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1372: 216-226.
- Baxter I., Tchieu J., Sussma M. R., Boutry M., Palmgre M. G., Gribskov M., Harper J. F. y Axelsen K. B. 2003. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 132: 618-628.
- Bestwich C. S., Brown I. R., Bennett M. H. R. y Mansfield J. W. 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9:209-221.
- Bezuidenhout C. S., Gelderblom W. C. A., Gorst-Allman C. P., Horak R. M., Marasas W. F. O., Spiteller G. y Vleggaar R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988: 743-745.
- Birch P. R. J., Avrova A. O., Duncan J. M., Lyon G. D., Toth R. L. 1999. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Plant-Microb. Interact.* 12: 356-361.
- Bohn M., Heinz E. y Lüthje S. 2001. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 387: 35-40.
- Borner G. H. H., Sherrier D. J., Weimar T., Michaelson L. V., Hawkins N. D., MacAskill A., Napier J. A. Beale M. H., Lilley K. S. y Dupree P. 2005. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137: 104-116.
- Bowman B. J., Berenski C. J. y Jung C. Y. 1985. Size of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Neurospora crassa* determined by radiation inactivation and comparison with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 260: 8726-8730.

Brandwagt B. F., Mesbah L. A., Takken F. L. W., Laurent P. L., Kneppers T. J. A., Hille J. y Nijkamp H. J. J. 2000. A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B₁. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4961-4966.

Briskin D. P. y Poole R. J. 1983. Evidence for a β-asparthyl phosphate residue in the phosphorylated intermediate of the red beet plasma membrane ATPase. Plant Physiol. 72: 1133-1135.

Brosch G., Ransom R., Lechner T., Walton J. D. y Loidi Peter. 1995. Inhibition of maize histone deacetylases by HC Toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. Plant Cell 7: 1941-1950.

Cahoon E. B. y Lynch D. V. 1991. Analysis of glucocerebrosides of rye (*Secale cereale* L. cv Puma) leaf and plasma membrane. Plant Physiol. 95: 58-68.

Carmona-Salazar L., Plasencia J. y Gavilanes-Ruíz M. 2005. Aislamiento y caracterización de microdominios membranales en plantas. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas, Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. Oaxaca 13-18 de noviembre.

Chang W. J., Rothberg K. G., Kamen B. A. y Anderson R. G. W. 1993. Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. J. Cell Biol. 118: 63-69.

Colina C., Cervino V. y Benaim G. 2002. Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane Ca²⁺-ATPase from human erythrocytes. Biochem. J. 362: 247-251.

Cooke D. T., Burden R. S., James C. S., Seco T. y Sierra B. 1994. Influence of sterols on plasma membrana proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. Plant Physiol. Biochem. 32: 769-773.

Comish-Bowden A. 1986. Why is uncompetitive inhibition so rare? A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides. FEBS 203: 3-6.

Coursol S., Fan L.M., Le Stunff H., Spiegel S., Gilroy S. y Assmann, S.M. 2003. Sphingolipid signaling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. Nature 423: 651-654.

Crowther G. J. y Lynch D. V. 1997. Characterization of sphinganine kinase activity in corn shoot microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 337: 284-290.

De la Torre M. E. 2005. Caracterización bioquímica y molecular de la actividad de nucleasa inducida por la micotoxina Fumonisin B₁ en semillas de maíz durante la germinación. Tesis de doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química UNAM

De Michaelis M. I., Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. C. y Olivari C. 1996. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. III. Is there a direct interaction between the fusicoccin receptor and the plasma membrane H⁺-ATPase? *Plant Physiol.* 110: 957-964.

Desjardins A. E., Plattner R. D. y Nelson P. E. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1695-1697.

Dewitt N.P. y Sussma M. R. 1995. Immunological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7: 2053-2067.

Dickson R. C. y Lester R. L. 1999. Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1438:305-21.

Dietrich A., Mayer J. E. y Hahlbrock K. 1990. Fungal elicitor triggers rapid, transient and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265: 6360-6368.

Doehlert D. C., Clarence A. K. y Vesonder R. F. 1994. Phytotoxic effects of fumonisin B₁ on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127:117-121.

Eraso P. y Portillo F. 1994. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.* 269: 10393-10399.

Felix G., Gfrosskopf D. G., Regenass M. y Boller T. 1991. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8831-8834.

Ferrante M. C., Meli R., Mattace Raso G., Esposito E., Severino L., Di Carlo G. y Lucisano A. 2002. Effect of fumonisin B₁ on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicol. Lett.* 129: 181-187.

Fodor E., Szabó-Nagy A. y Erdei L. et al. 1995. The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J. Plant Physiol.* 147: 87-92.

Foyer C. 1994. Protection against oxygen radicals- An important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.

Frías I., Caldeira M. T., Pérez-Castiñeira J. R., Navarro-Aviño J. P., Culiañez-Maciá F. A., Kuppinger O., Stransky H., Pages M., Hager A. y Serrano R. 1996. A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-1544.

Fukuda H., Shima H., Vesonder R. F., Tokuda H., Nishino H., Katoh S., Tamura S., Sugimura T. y Nagao M. 1996. Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B₁, a mycotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 160-165

Gelderblom W. C., Smuts C. M., Abel S., Snyman S. D., Cawood M. E., van der Westhuizen L. y Swanevelder S. 1996. Effect of fumonisin B₁ on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. *Food. Chem. Toxicol.* 34: 361-369.

Goope N. V., y Sharma R. P. 2003. Sphingoid bases and their phosphates: transient activation and delayed repression of protein kinase C isoforms and their possible involvement in fumonisin B₁ cytotoxicity. *Toxicology* 187:239-250

Goormaghtigh E., Chadwick C. y Scarborough J. 1986. Monomers of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase catalyze efficient proton translocation. *J. Biol. Chem.* 261: 7466-7471.

Goudet C., Véry A-A., Milat M-L, Ildfonso M., Thibaud J-B., Sentenac H. y Blein J-P. 1998. Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from beticolin 0, a non-peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. *Plant J.* 14: 359-364.

Grandmougin-Ferjani A., Shuler-Muller I. y Hartmann M. A. 1997. Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol.* 113: 163-174.

Gutiérrez-Nájera N. 1999. Efecto de la fumonisina B₁ sobre la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Gutiérrez-Nájera N., Enríquez-Arredondo C., Garibay F. J., Palacios-Bahena S. y Gavilanes-Ruiz M. 2001. La membrana plasmática y su importancia durante la patogénesis en plantas. En: *Avances de Bioquímica y Biología Molecular en plantas.* (I. Bernal-Lugo y H. Loza-Tavera eds.). UNAM, México. pp. 55-73

Gutiérrez-Nájera N., Muñoz-Clares R. A., Palacios-Bahena S., Ramírez J., Sánchez-Nieto S., Plasencia J. y Gavilanes-Ruiz M. 2005a. Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221: 589-596.

Gutiérrez-Nájera N., Rodríguez-Mejía P., Palacios-Bahena S., Carmona-Salazar L., Saucedo-García M., Noyola-Martínez L., Enríquez-Arredondo C., Vázquez-Vázquez C., Plasencia J., Cruz-Ortega R. y Gavilanes-Ruíz M. 2005b. Interplay at the interphase: fumonisin B₁, a fungal toxin and its effects on the plasma membrana from maize embryos. En: Las memorias del "XII. Internacional Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions". Cancún, diciembre 14-18.

Gutiérrez-Nájera N., Carmona-Salazar L., Noyola-Martínez L., Vázquez-Vázquez C., El Hafidi M., Plasencia J. y Gavilanes-Ruíz M. 2005c. Fumonisin B₁ inhibitory effects in vivo: decrease of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity is due to diminished endogenous levels of ceramide. En preparación para publicación en The Journal of Biochemical Chemistry.

Hager A., Debus G., Edel H-G, Stransky H. y Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrana H⁺-ATPase. *Planta* 185: 527-537.

Hannun Y. A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274: 1855-1859.

Hannun Y. A. y Obeid L. M. 2002. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277: 25847-25850.

Harada A., Okazaki Y. y Takagi S. 2002. Photosynthetic control of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Vallisneria* leaves. I. Regulation of activity during light induced membrane hyperpolarization. *Planta* 214: 863-869.

Huwiler A., Kolter T., Pfeilschifter J. y Sandhoff K. 2000. Physiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485: 63-99.

Jahn T., Baluska F., Michalke W., Harper J. F. y Volkmann D. 1998. Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: evidence for strong expression in the xylem parenchyma an asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiol. Plant.* 104: 311-316.

Jorgensen P. L., Nielsen J. M., Rasmussen J. H. y Pedersen P. A. 1998. Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 65-70.

Jost P. C., Nadakavukaren K. K., Gruffutg O. H. 1977. Phosphatidylcholine exchange between boundary lipid and bilayer domains in cytochrome oxidase-containing membranes. *Biochemistry* 16: 3110-3114.

- Kawai G., Ohnishi M., Fujino Y. e Ikeda Y. 1986. Stimulatory effect of certain plant sphingolipids on fruiting of *Schizophyllum commune*. J. Biol. Chem. 261: 779-784.
- Keen N. T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. 24: 447-463.
- Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M. y Shimazaki K. 2001. PHTO1 y PHTO2 mediate blue light regulation of stomatal opening. Nature 414: 656-660.
- Koga J., Yamauchi T., Shimura M., Ogawa N., Oshima K., Uemura K., Kikuchi M. y Ogasawara N. 1998. Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. J. Biol. Chem. 273: 31985-31991.
- Kriek N. P. J., Kellerman T. S., Marasas W. F. O. 1981a. A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep, and rats. Onderstepoort J. Vet. Res. 48: 129-31.
- Kriek N. P. J., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G. 1981b. Hepato- and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) isolates from southern African maize. Food Cosmet. Toxicol. 19: 447-56.
- Kuhlbrandt W. 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. Nat Rev. Mol. Cell Biol. 5: 282-295.
- Kurkdjian A. y Guern J. 1989. Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 271-303.
- Kwoles P.F., Watts A. y Marsh D. 1979. Spin-label studies of lipid immobilization in dimyristoylphosphatidylcholine-substituted cytochrome oxidase. Biochemistry 18: 4480-4487.
- Lacey J. 1986. Factors affecting mycotoxin production. En: Mycotoxins and phytotoxins (Steyn P. S. y Vleggaar R. eds). Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands. Pp. 65-77
- Lanfermeijer F. C. y Prins H. B. A. 1994. Modulation of H⁺-ATPase activity by fusicoccin in plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) roots. Plant Physiol. 104: 1277-1285
- Lefebvre B., Batoko H., Duby G. y Boutry M. 2004. Targeting of a *Nicotiana plumbaginifolia* H⁺-ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. Plant Cell 16: 1772-1789.

- Lentz B. R. 1988. Organization of membrane lipids by intrinsic membrane proteins. En: Lipid domains and the relationship to membrane function (Alan R. ed.). Liss, Inc. EUA. pp 141-161.
- Lutsenko S. y Kaplan J. H. 1994. Molecular events in close proximity to the membrane associated with the binding of ligands to the Na,K-ATPase. J. Biol. Chem. 269: 4555-4564.
- Lynch D. V. 1999. Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. Methods Enzymol. 311: 130-149.
- MacLennan D. H., Rice W. J. y Green N. M. 1997. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. J. Biol. Chem. 272: 28815-28818.
- Mahfoud R., Maresca M., Santelli M., Pfohl-Leskowicz A., Puigserver A. y Fantini J. 2002. pH-Dependent interaction of fumonisin B₁ with cholesterol : physicochemical and molecular modeling studies at the air-water interface. J. Agric. Food Chem. 50: 327-331.
- Marasas W. F. O., Kriek N. P. J., Fincham J. E. y van Rensburg, S. J. 1984. Primary liver cancer and esophageal basal cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. Int. J. Cancer 34: 383-387.
- Marrè E. 1979. Fusicoccin: a tool in plant physiology. Annu. Rev. Plant Physiol. 30: 273-288.
- Martínez-Noyola L., Plasencia J. y Gavilanes-Ruíz M. 2005. Determinación de bases esfingoideas y ceramida por TLC tras la adición de la micotoxina FB₁ a tejidos vegetales. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. Oaxaca 13-18 de noviembre.
- Maurel C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 399-429.
- Megidish T., Hamaguchi A., Iwabuchi K. y Hakamori S. I. 2000. Assays of sphingosine-dependent kinase for 14-3-3 protein. Methods Enzymol. 312: 381-387.
- Meli R., Ferrante M. C., Mattace Raso G., Cavaliere M., Di Carlo R. y Lucisano A. 2000. Effect of fumonisin B₁ on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in LPS-stimulated J774A.1 cells. Life Sci. 67: 2845-2853.
- Merrill A. H. 1994. Sphingosine and other long-chain bases that alter cell behavior. En: Current topics in membranes. Cell lipids Vol. 40 (Hoekstra D. ed.) Academic Press Inc. USA. Pp. 361-381.

Merrill A. H. Jr., Sullards M. C., Wang E., Voss K. A. y Riley R. T. 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl. 2: 283-289.

Merrill A. H. Jr. 2002. *De novo* shingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 25843-25846.

Michelet B., Pérez C., Goffeau A. y Boutry M. 1989. The plasma membrane H⁺-ATPase of *Nicotiana plumbaginifolia*. En: *Plant membrane transport: the current position.* (Dainty J., De Michaelis M. I., Marrè E. y Rasi-Caldogno F. eds.) Amsterdam: Elsevier Science Publisher pp 455-460.

Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J-P., Hartmann M-A., Bonneu M., Simon-Plas F., Lessire R. y Bessoule J-J. 2004. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of TX100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 3677-3686.

Mori I. C. y Schroeder J. I. 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* 135: 702-708.

Nelson P. E., Desjardins A. E. y Plattner R. D. 1993. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 233-252.

Ng, C. K-Y., Carr K., McAinsh M. R., Powell B. y Hetherington A. M. 2001. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-599.

Nieva J. L., Bron R., Corver J. y Wilschut J. 1994. Membrane fusion of Semliki forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *EMBO J.* 13: 2797-2804.

Niu X., Zhu J.K., Narasimhan M.L., Salzman R. A., Bressan R. A. y Hasegawa P:M: 1993. NaCl regulation of plasma membrana H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol.* 103: 713-718.

Oishi K., Zheng B. y Kuo J. F. 1990. Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* 265: 70-75.

Olivari C., Meanti C., De Michaelis M. I., y Rasi-Caldogno F. 1998. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. *V.*

Fusicoccin induces the association between the plasma membrane H⁺-ATPase and the fusicoccin receptor. *Plant Physiol.* 116: 529-537.

Olivari C., Albumi C., Pugliarello M. C. y De Michelis M. I. 2000. Phenylarsine oxide inhibits the fusicoccin-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 122: 463-470.

Palmgren M. G., Larsson C. y Sommarin M. 1990. Proteolytic activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* 265: 13423-13426.

Palmgren M. G., Sommarin M., Serrano R. y Larsson C. 1991. Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 20470-20475.

Palmgren M. G. 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.

Pandol S. J., Shoefeld-Payne M. S., Gukovskaya A. S. y Rutherford R. E. 1994. Sphingosine regulates Ca²⁺-ATPase and reloading of intracellular Ca²⁺ stores in the pancreatic acinar cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1195: 45-50.

Pardo J. P. y Slyman C.W. 1988. The fluorescein isothiocyanate-binding site of the plasma-membrane H⁺-ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 263: 18664-18668.

Parets-Soler A., Pardo J. M. y Serrano R. 1990. Immunocytochemical localization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 93: 1654-1658.

Parola A. H. 1993. Membrane lipid-protein interactions. En: *Biomembranes. Physical aspects* (Shinitzky M. ed.) VCH-Verlag, Weinheim. Pp. 139-277.

Pascher I. 1976. Molecular arrangements in sphingolipids conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 455: 433-451.

Phalen T. y Kielian M. 1991. Cholesterol is required for infection by Semliki forest virus. *J. Cell. Biol.* 112: 615-623.

Pinelli E., Poux N, Garren L., Pipy B., Castegnaro M, Miller D. J. y Pfohl-Leszkowicz. 1999. Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B1 stimulates cPLA2-phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. *Carcinogenesis* 20: 1683-1688.

- Raley D. L. y Cleland R. E. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
- Ramasamy S., Wang E., Henning B. y Merrill A. H. Jr. 1995. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 133: 343-8.
- Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. C., Olivari C. y De Michaelis M. I. 1993. Controlled proteolysis mimics the effect of fusicochin on the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 103: 391-398.
- Rober-Kleber N., Albrechtová J. T. P., Fleig s., Huck N., Michalke W., Wagner E., Speth V., Neuhaus G., y Fischer-Iglesias C. 2003. Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.* 131: 1302-1312.
- Rodríguez-Mejía P. 2005. Relación entre la actividad de NADPH oxidasa, compuestos esfingolipídicos y respuesta a patógenos en células vegetales. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. Oaxaca 13-18 de noviembre.
- Rosiles M. R., Bautista J., Fuentes V. O. y Ross F. 1998. An outbreak of equine leukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico, associated with fumonisin B₁. *J. Vet Med. A.* 45: 299-302.
- Rustérucci C., Stallaert V., Milat M-L, Pugin A., Ricci P. y Blein J-P. 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111: 885-891.
- Samuels A. L., Fernando M. y Glass A. D. M. 1992. Immunofluorescent localization of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K⁺ nutrition. *Plant Physiol.* 99: 1509-1514.
- Sandvig K., Garred O., van Helvoort A., van Meer G. y van Deurs B. 1996. Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell.* 7:1391-404.
- Schaller A. y Oecking C. 1999. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11: 263-272.
- Schoroeder J. I., Allen G. J., Hugouvieux V., Kwak J. M. y Waner D. 2001. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.

- Serrano R., Kielland-Brandt M. C., Fink G. R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319: 689-693.
- Simon-Plas F., Gomès E., Milat M-L, Pugin A. y Blein J-P. 1996. *Cercospora beticola* toxins. X. Inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase by beticolin-1. *Plant Physiol.* 111: 773-779.
- Slife C. W., Wang E., Hunter R., Wang S., Burgess C., Liotta D. C. y Merrill A. H. Jr. 1989. Free sphingosine formation from endogenous substrates by a liver plasma membrane system with a divalent cation dependence and a neutral pH optimum. *J. Biol. Chem.* 264: 10371-10377.
- Smith E. R. y Merrill A. H. Jr. 1995. Differential roles of the novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the "burst" of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. *J. Biol. Chem.* 270: 18749-18758.
- Spassieva S. D., Markham J. E. y Hille J. 2002. The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J.* 32: 561-572.
- Sperling P., Libisch B., Bähringer U., Napier J. A. y Heinz E. 2001. Functional identification of a delta8-sphingolipid desaturase from *Borago officinalis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 388: 293-298.
- Spickett C. M., Smirnov N. y Ratcliffe R. G. 1993. An *in vivo* nuclear magnetic resonance investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and *Spartina anglica* roots during exposure to high salt concentrations. *Plant Physiol.* 102: 629-638.
- Stang E., Kartenbeck J. y Parton R.G. 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell.* 8:47-57.
- Stevens V.L. y Tang J. 1997. Fumonisin B₁ induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 18020-18025.
- Suzuki K. y Shinshi H. 1995. Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Cell* 7: 639-647.
- Svennelid F., Olsson A., Piotrowski M., Rosenquist M., Ottman C., Larsson C., Oeking C. y Sommarin M. 1999. Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma

membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11:2379-2391.

Tran D., Carpentier J. L., Sawano F., Gorden P. y Orci L. 1987. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7957-61.

Thevissen K., Cammue B. P., Lemaire K., Winderickx J., Dickson R. C., Lester R. L., Ferket K. K., Van Even F., Parret A. H. y Broekaert W. F. 2000. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 9531-9536.

Thomas D. D., Bigelow D. J., Squier T. C., Hidalgo C. 1982. Rotational dynamics of protein and boundary lipid in sarcoplasmic reticulum membrane. *Biophys J.* 37: 217-225.

Umemura K., Ogawa N., Yamauchi T., Iwata M., Shimura M. y Koga J. 2000. Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 676-83.

Umemura K., Ogawa N., Koga J., Iwata M. y Usami H. 2002. Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* 43: 778-84.

Van Asch M. A. J., Rijkenberg F. H. J. y Coutinho T. A. 1992. Phytoxicity of fumonisin B1, moniliformin, and T-2 toxin to corn callus cultures. *Phytopathology* 82: 1330-1332.

Van der Goot F. G. y Harder T. 2001. Raft membrane domains: from liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Immunology* 13: 89-97.

Vera-Estrella R., Barkla B. J., Higgins V. J. y Blumwald E. 1994a. Plant defense response to fungal pathogen: Activation of host plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* 104: 209-215.

Vera-Estrella R., Higgins V. J. y Blumwald E. 1994b. Plant defense response to fungal pathogen II: G-protein mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiol.* 106: 97-102.

Villalba J. M., Lützelshwab M. y Serrano R. 1991. Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves. *Planta* 185: 458-461.

Wach A., Schlessler A. y Goffeau A. 1992. An alignment of 17 reduced protein sequences from plant, fungi and protozoa H⁺-ATPase genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 309-317.

- Walton J. D. 1996. Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* 8: 1723-1733.
- Wang E., Norred W. P., Bacon W. C., Riley R. T. y Merrill A. H. Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490.
- Wevelsiep L., R pping E. y Knogge W. 1993. Stimulation of Barley plasmalemma H⁺-ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol.* 101: 297-301.
- Williams L. E., Lemoine R. y Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* 5:283-90.
- Worrall D., Ng C. K-Y. y Hetherington M. A. 2003. Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci.* 8: 317-320.
- Wright B. S., Snow J. W., O'Brien T. C. y Lynch D. V. 2003. Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Arch. Biochem. Biophys.* 415: 184-192.
- Xing T., Higgins V. J. y Blumwald E. 1996. Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 8: 555-564.
- Xu X., Bittman R., Duportail G., Heissler D., Vilcheze C. y London E. 2001. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domain (rafts). *J. Biol. Chem.* 276: 33540-33546.
- Yeung J. M., Wang H.-Y. y Prelusky D. B. 1996. Fumonisin B1 induces protein kinase C translocation via direct interaction with diacylglycerol binding site. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141: 178-184.
- Yin J.-J., Smith M. J., Eppley R. M., Troy A. L., Page S. W. y Sphon J. A. 1996a. Effects of fumonisin B₁ and (hydrolyzed) fumonisin backbone AP₁ on membranes: a spin-label study. *Arch. Biochem. Biophys.* 335: 13-22.
- Yin J.-J., Smith M. J., Eppley R. M., Page S. W. y Sphon J. A. 1996b. Effects of fumonisin B1 on oxygen transport membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 250-255.
- Yin J.-J., Smith M. J., Eppley R. M., Page S. W., y Sphon J. A. 1998. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1371: 134-142.
- Yoder O. C. 1980. Toxins in pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 103-129.

Yoo H.-S., Norred W. P., Showker J., y Riley R. T. 1996. Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138: 211-218.