



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

“VISUALIZACIÓN *IN VIVO* DE MICRODOMINIOS
MEMBRANALES EN PELOS RADICALES DE
Phaseolus vulgaris DURANTE EL CRECIMIENTO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

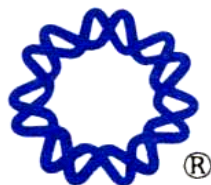
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

L. en C. Nancy Elizabeth Martínez Díaz

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS CÁRDENAS TORRES.

CUERNAVACA, MORELOS; AGOSTO 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Carmen Quinto del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Luis Cárdenas Torres.

Se agradece la ayuda proporcionada a este proyecto por la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA) mediante el donativo No. IN205607,IN204409 y el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología CONACyT No. 58323.

Este trabajo también fue apoyado directamente por el programa de apoyo para Investigadores Nacionales para el Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura 2008. Esto dentro de la convocatoria emitida por el CONACyT a través del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) mediante el donativo 42605, otorgado al Dr. Luis Cárdenas Torres como miembro del SNI.

Se agradece también el apoyo económico brindado por parte de la Dra. María del Carmen Quinto Hernández, mediante el donativo para ayudantes de investigador nacional nivel III o emérito Número 56631, del Sistema Nacional de Investigadores y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SNI-CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca de posgrado que me fue otorgada, que fue indispensable para la realización de este proyecto.

A la Dra. Carmen Quinto y su grupo
por su apoyo durante la realización del presente proyecto.

Se agradece el apoyo técnico de Olivia Santana Estrada y Noreide Nava Núñez, durante la realización del presente proyecto.

A los sinodales: la Dra. María Alejandra Bravo de la Parra (IBT, UNAM) y la Dra. Marina Gavilanes (QUÍMICA, UNAM)

Por aceptar ser mis sinodales durante la elaboración del presente proyecto, por su guía y amable asesoría en la realización de esta tesis.

Al jurado conformado por:

Dra. Gladys Cassab,
Dr. Carlos Garay,
Dr. Chistian Sohlenkamp
Dr. Christopher Wood,

Al jurado revisor de esta tesis por sus amables comentarios y asesoría en la redacción de la presente tesis.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

POR QUE LOS VALORES, EL CARIÑO Y EL APOYO QUE ME DAN DÍA CON DÍA, NO SE LOS PODRÍA PAGAR CON NADA Y NO SERÍA NADA SIN ESO Y SIN USTEDES. EN ESPECIAL QUIERO AGRADECER A MI MAMI, POR QUE A PESAR DE TODO SIEMPRE ME APOYA. A MI MANITO, POR QUE ES MI APOYO, MI MANO DERECHA, POR QUE EL VIVIÓ Y COMPARTIÓ CONMIGO TODO LO QUE TUVIMOS. Y A MI CHIQUITA LIA QUE NOS CAMBIÓ Y ALEGRÓ LA VIDA.

A MIS AMIGAS DE LA SECUNDARIA

KRYS, LETY Y MARY

POR QUE A PESAR DE LA DISTANCIA Y A PESAR DE QUE LLEVAMOS CAMINOS DIFERENTES, SIEMPRE HE CONTADO CON USTEDES.

A MIS AMIGOS DE LA PREPA

ANGEL, CHAY, GANDA, HOMIE, LUCCIA, LUIS, LUPE, VENCES, A LOS RONDALLOS Y A MIS DOS HERMOSOS HIJOS: BUGS Y POLLITO-POOH

MIS NIÑOS CADA RECUERDO ES MUY LINDO, CADA RECUERDO TIENE LOCURA, QUE BUENO QUE ME ENSEÑARON A PORTARME MUY MAL LOS QUIERO Y AÑORO CADA MOMENTO DE LA PREPA!!!

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS EN LA CARRERA

AMED, APRIL, BETO, CARO, CARMEN, DIDO, FHER con H, GIGI, GINO, JONNHY, LUCERITO Y VAN

PRIMERO DEBO DECIRLES QUE DE NO SER POR USTEDES HUBIESE ESTUDIADO UNA CARRERA MENOS TRAUMANTE, O SEA QUE LOS CULPO POR TODOS MIS TRAUMAS!!! DICHO ESTO, MUCHAS GRACIAS!!!!

POR QUE LA CAUSA DE ESTAR EN ESTA CARRERA, ES QUE FUERON DEMASIADO LINDOS, DEMASIADO LOCOS, DEMASIADO BUENA ONDA, LOS QUIERO!!!

A MIS COMPAÑEROS DEL LAB. LILIANA, MA. LUISA, LUIS ALFREDO, MONSE, JESUSITO, JUANITO Y GABO

POR HABER HECHO QUE MI PASO POR EL LABORATORIO FUERA MUY DIVERTIDO, POR BRINDARME SU APOYO Y AMISTAD.

PERO SOBRE TODO

A DIOS

POR QUE ÉL ES QUIEN GUÍA Y DA FUERZA A MIS PASOS.

***“Muchas personas pequeñas,
en muchos lugares pequeños,
harán cosas pequeñas,
que cambiarán al mundo”.***

1. ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
IMPORTANCIA DE LAS RAÍCES.	3
LOS PELOS RADICALES.	4
LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	6
LOS MICRODOMINIOS MEMBRANALES.	9
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
METODOLOGÍA:	19
ESQUEMA METODOLÓGICO.	19
GERMINACIÓN DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	19
PREPARACIÓN DE RAÍCES PARA SU OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO.	19
ELABORACIÓN DE COMPLEJOS METIL-B-CICLODEXTRINA: NBD-COLESTEROL.	19
PRINCIPIOS FÍSICOS DE LA FLUORESCENCIA.	20
USO DE SONDAS FLUORESCENTES.	21
TRATAMIENTO CON COMPUESTOS QUE AFECTAN LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA Y AGENTES REMOVEDORES DE ESTEROLES.	22
OBTENCIÓN DE IMÁGENES.	23
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.	23
AISLAMIENTO DE PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i>	24
EXTRACCIÓN DE DRM APARTIR DE HOMOGENADOS DE RAÍZ.....	24
RESULTADOS:	26
GM1-FL Y DHPE-RH ACOPLADOS A FLUORÓFOROS COMO MARCADORES MEMBRANALES, EN PELOS RADICALES DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> Y OTRAS CÉLULAS CON CRECIMIENTO APICAL.	26
EXPLORACIÓN DE OTROS MARCADORES FLUORESCENTES POTENCIALMENTE ÚTILES PARA LA VISUALIZACIÓN DE MICRODOMINIOS MEMBRANALES EN CÉLULAS VEGETALES.....	30
VISUALIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS PELOS RADICALES UTILIZANDO FM@ 4-64, UN MARCADOR NO SELECTIVO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	31
INCORPORACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE ESTEROL, UN COMPONENTE INDISPENSABLE PARA LA FORMACIÓN DE LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS MEMBRANALES.	32

<i>Uso de NBD-colesterol</i>	32
<i>La filipina, una alternativa limitada para el estudio de los microdominios lipídicos</i>	35
LOCALIZACIÓN DE LAURDAN EN PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i> Y OTRAS CÉLULAS CON CRECIMIENTO APICAL	36
EFFECTO DE LA EXTRACCIÓN DE COLESTEROL EN LA ORGANIZACIÓN DE LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS	38
PAPEL DEL CITOESQUELETO EN LA ORGANIZACIÓN DE LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS EN PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i>	39
EFFECTO DE LAS DROGAS QUE AFECTAN EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA ORGANIZACIÓN DE LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS	43
ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE PELOS RADICALES TRATADOS CON EL MARCADOR DE MICRODOMINIOS LIPÍDICOS GM1-FL	46
OBTENCIÓN DE DRM A PARTIR DE PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i> MARCADOS CON GM1-FL.	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 MICROSCOPÍA DE LUZ TRANSMITIDA DE UNA RAÍZ DE <i>ARABIDOPSIS</i> , QUE MUESTRA LAS DIFERENTES ZONAS DE DESARROLLO EN LA RAÍZ.....	3
FIGURA 2 IMÁGENES TOMADAS POR MICROSCOPIA DE LUZ TRASMITIDA, QUE MUESTRAN LOS DISTINTOS ESTADOS DEL DESARROLLO DE LOS PELOS RADICALES A NIVEL MORFOLÓGICO.	5
FIGURA 3 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES LÍPIDOS DE MEMBRANA.	8
FIGURA 4 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA BALSA LIPÍDICA.	10
FIGURA 5 ESTRUCTURA DE ESTEROLES EXISTENTES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS PLANTAS.	13
FIGURA 6 ESQUEMA BÁSICO DEL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA.....	21
FIGURA 7 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE MEMBRANAS RESISTENTES A LA SOLUBILIZACIÓN POR DETERGENTE (DRM).	25
FIGURA 8 GM1-FL PERMITE MARCAR MICRODOMINIOS MEMBRANALES EN PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i>	27
FIGURA 9 VISUALIZACIÓN DE LOS MICRODOMINIOS MEMBRANALES UTILIZANDO GM1-FL EN PELOS RADICALES DE TABACO.	28
FIGURA 10 HIFAS FILAMENTOSAS DE <i>CONIDILOBULUS CORONATUS</i> CRECIENDO BAJO CONDICIONES <i>IN VITRO</i> Y TRATADAS CON GM1-FL.	29
FIGURA 11 LAS CÉLULAS QUE NO PRESENTAN CRECIMIENTO APICAL, NO INCORPORAN GM1-FL.....	29
FIGURA 12 DHPE-RH COMO UN MARCADOR DE MICRODOMINIOS LIPÍDICOS EN CÉLULAS VEGETALES. ...	30
FIGURA 13 LOCALIZACIÓN DEL MARCADOR DE MEMBRANA FM@ 4-64 EN PELOS RADICALES DE FRIJOL. 31	
FIGURA 14 INCORPORACIÓN DE NBD-COLESTEROL EN PELOS RADICALES VIVOS QUE NO PRESENTAN CRECIMIENTO POLARIZADO.	33
FIGURA 15 LAS VESÍCULAS DE NBD-COLESTEROL Y PC NO SE INCORPORAN EN PELOS RADICALES VIVOS.	34
FIGURA 16 LOS COMPLEJOS METIL-B-CICLODEXTRINA: NBD-COLESTEROL PERMITEN LA INCORPORACIÓN DEL COLESTEROL EN PELOS RADICALES VIVOS DE FRIJOL.	35
FIGURA 17 LOCALIZACIÓN DE ESTEROL COMO INDICADOR DE LA PRESENCIA DE MICRODOMINIOS MEMBRANALES UTILIZANDO FILIPINA.	36
FIGURA 18 LAURDAN SE INCORPORA EN LA MEMBRANA APICAL DE LOS PELOS RADICALES VIVOS DE <i>P. VULGARIS</i>	37
FIGURA 19 IMÁGENES DE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA QUE MUESTRAN LA INCORPORACIÓN DE LAURDAN EN PELOS RADICALES DE TABACO.	38
FIGURA 20 LA METIL-B-CICLODEXTRINA DESORGANIZA LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS.	39

FIGURA 21 EFECTO DE JASPLAQUINOLIDE EN LOS PELOS RADICALES DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	40
FIGURA 22 MICROGRAFÍAS DE LUZ TRANSMITIDA QUE MUESTRAN EL EFECTO DE LATRUNCULINA EN LOS PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i>	41
FIGURA 23 IMÁGENES DE MICROSCOPÍA QUE MUESTRAN LOS SITIOS DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA EN LOS PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i>	42
FIGURA 24 SOBRE POSICIÓN DE CITOCALASINA ACOPLADA A RODAMINA Y EL MARCADOR DE MICRODOMINIOS LIPÍDICOS (GM1-FL), EN PELOS RADICALES DE <i>P. VULGARIS</i> VIVOS.	43
FIGURA 25 JASPLAQUINOLIDE DESORGANIZA LA DISTRIBUCIÓN APICAL DE LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS.	45
FIGURA 26 LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS SON ALTAMENTE SENSIBLES A LA PRESENCIA DE LATRUNCULINA.	46
FIGURA 27 EL AISLAMIENTO DE LOS PELOS RADICALES MANTIENE UNA LOCALIZACIÓN APICAL DE GM1-FL.	47
FIGURA 28 GM1-FL SE LOCALIZA EN LAS FRACCIONES DRM DE RAÍZ.	49

ABREVIATURAS

μM micromolar

BY2 amarillas brillantes 2; por sus siglas en inglés: Bright Yellow 2

CCD dispositivo acoplado a carga; por sus siglas en inglés: Charge Coupled Device- transfer detector

CEM membranas enriquecidas en colesterol; por sus siglas en inglés: Cholesterol Enriched Membranes.

Cit-Rh citocalasina rodaminada

cm centímetros

cols. colaboradores

DHPE-Rh 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; por sus siglas en inglés: rhodamine 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

di-4-ANEPPDHQ Amino Naftil Etenil Piridinina; por sus siglas en inglés: aminonaphthylethenylpyridinium

DIG membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos insolubles en detergente; por sus siglas en inglés: Detergent-Insoluble Glycolipid-Enriched Domain

DRM membranas resistentes a detergente; por sus siglas en inglés: Detergent Resistant Membranes

ERO especies reactivas de oxígeno o ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species

FM@4-64 (N-(3-trietil amonio propil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenil) hexatrienil) piridina dibromuro; por sus siglas en inglés: N-(3-triethylammoniumpropyl) -4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide (FM@ 4-64)

FRET Transferencia de energía resonante de Förster; por sus siglas en inglés: Fluorescence Resonance Energy Transfer

GEM membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos; por sus siglas en inglés: glycolipid-enriched microdomain

GluCer Glucosil ceramida

GM1 gangliósido monosialilado 1

GM1-FI BODIPY FL C5-Gangliósido; por sus siglas en inglés: boron-dipyrromethene C5-ganglioside

GPI glicosil fosfatidil inositol; por sus siglas en inglés: Glycosyl phosphatidyl inositol

Laurdan 2-dimetilamino-6-lauroil naftaleno

M molar

ml mililitros

mM milimolar

NBD-colesterol nitrobenzoxadiazol 25-norcolesterol; por sus siglas en inglés: nitrobenzoxadiazol 25-norcholesterol

nM nanomolar

P. vulgaris *Phaseolus vulgaris*

PIP₂ fosfatidil inositol bifosfato; por sus siglas en inglés: phosphatidyl inositol biphosphate

ROI Región de interés; por sus siglas en inglés: Region of Interest

rpm revoluciones por minuto

UV ultravioleta

RESUMEN

Los lípidos de membrana pueden organizarse en microdominios de composición específica llamados "balsas lipídicas", los cuales son pequeños en tamaño pero pueden organizarse en microdominios de mayor tamaño que son llamados plataformas. En estos dominios membranales, se sabe que los esteroides interactúan fuertemente con ácidos grasos de cadena saturada esto favorece una separación en los lípidos. Los microdominios de membrana funcionan como plataformas de señalización en la mayoría de los tipos celulares favoreciendo las interacciones entre proteínas y se postula que este mecanismo requiere del citoesqueleto.

La presencia de microdominios lipídicos en células de plantas ha sido estudiada mediante estudios bioquímicos, que involucran el aislamiento de membranas resistentes a detergente (DRM). Más aun, esteroides naturales y esfingolípidos de hongos y plantas han mostrado ser capaces de formar microdominios lipídicos *in vitro*.

Para estudiar la presencia de microdominios membranales *in vivo* durante el crecimiento polar de pelos radicales en *Phaseolus vulgaris*.

En el presente trabajo se introduce el uso de marcadores fluorescentes específicos y se emplea metil-beta-ciclodextrina como un indicador de la presencia de microdominios lipídicos para el estudio de la presencia de microdominios membranales en células con crecimiento apical, mediante microscopía de epifluorescencia. Además se evalúa el papel que tiene el citoesqueleto de actina en el mantenimiento de estos microdominios lipídicos mediante el uso de agentes que modulan la polimerización de los filamentos de actina.

En este trabajo se muestra la presencia *in vivo* de microdominios membranales en pelos radicales. También se encontró que los pelos radicales en crecimiento requieren de la presencia de los microdominios membranales y que los microdominios membranales necesitan de la estabilidad del citoesqueleto para mantener su localización.

ABSTRACT

Membrane lipids can be organized in microdomains with specific lipid composition that have been termed "lipid rafts", which are small in size but can be organized in larger microdomains called platforms. In these lipid domains, cholesterol is thought to be densely packed with long saturated fatty acid chains favoring lipid separation. Membrane microdomains in most cell types function as specialized signaling platforms favoring protein interaction and it's thought that this process requires the cytoskeleton.

The presence of membrane microdomains in plant cells has been suggested from biochemical studies, which involve isolating detergent resistant membranes (DRM). Hitherto, natural sterols and sphingolipids from fungi, animal or plants have shown to be capable of forming membrane microdomains *in vitro*.

To study the presence of membrane microdomains *in vivo* in polar growing *Phaseolus vulgaris* root hairs.

In this work we introduce the use of specific fluorescent markers and methyl-beta-cyclodextrin as an indicator of the presence of membrane microdomains in living tip growing cells, using epifluorescence microscopy. In addition, we evaluated the role of the actin cytoskeleton in the maintaining of these membrane microdomains using actin cytoskeleton modulating agents.

In this work we show live membrane microdomains in root hairs. Also, we found that growing root hairs require the presence of membrane microdomains and these membrane microdomains need an intact cytoskeleton to maintain his localization.

INTRODUCCIÓN

Importancia de las raíces.

Las raíces constituyen una parte importante de las plantas, ya que son responsables de muchas funciones indispensables para su subsistencia; por ejemplo, participan directamente en la adquisición de agua y de nutrientes, los cuales son esenciales para el metabolismo y para el desarrollo de las células (Zeiger, 2002). Además, las raíces participan en la adaptación al estrés abiótico y biótico; por ejemplo, perciben el ataque de los patógenos del suelo. Este órgano, también puede formar interacciones simbióticas con microorganismos que se encuentran en el suelo, como por ejemplo, con las bacterias del género *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradirhizobium* y con los hongos micorrícicos. La simbiosis de plantas leguminosas, como frijol, con bacterias del género *Rhizobium* es de gran importancia, ya que esto culmina en la formación de un nuevo órgano, el nódulo, que es donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno atmosférico.

Las raíces contienen tres secciones o zonas de desarrollo: la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación (Figura 1). En la zona meristemática, las células de la raíz sufren divisiones mitóticas sucesivas, lo cual permite el crecimiento de la raíz. En la zona de elongación las células comienzan a aumentar su volumen y se alargan. Finalmente, ya que las células han alcanzado un tamaño adecuado y entran a la zona de diferenciación, se generan células especializadas como: xilema, floema y los pelos radicales (Scheres, 2002).



Figura 1 Microscopía de luz transmitida de una raíz de Arabidopsis, que muestra las diferentes zonas de desarrollo en la raíz.

En la zona meristemática las células se dividen activamente, mientras que en la zona de elongación, la división celular se detiene y ocurre una rápida expansión longitudinal. Las células que ya han aumentado su volumen celular, se encuentran en la zona de diferenciación, donde los pelos radicales se comienzan a formar (Maloof, 2004).

Los pelos radicales.

Los pelos radicales son células de estructura cilíndrica que crecen de manera apical, se derivan de células epidérmicas de la raíz y son muy abundantes en la superficie de las raíces. En el crecimiento apical, las células se elongan a través de la secreción polarizada de vesículas secretorias en la región apical. El crecimiento apical da a los pelos radicales su estructura tubular característica.

Los pelos radicales tienen diversas funciones de gran importancia para la planta. La función principal de los pelos radicales es la absorción de agua y nutrientes, ya que incrementan la superficie de contacto de la raíz con el medio. Los pelos radicales también son capaces de percibir los cambios del medio, así como las señales extracelulares de los diferentes estímulos bióticos y abióticos. Por otro lado, los pelos radicales también constituyen un sitio importante para la excreción de compuestos a la rizósfera, dentro de los cuales se encuentran los compuestos fenólicos del tipo de los flavonoides (Zeiger, 2002).

Desde hace varios años, los pelos radicales han sido usados como modelo de estudio de diversos procesos celulares que ocurren en las plantas. Esto se debe en gran parte a que presentan la ventaja de ser células que no se dividen, lo que permite observarlas por periodos largos de tiempo. Además, son células que crecen alejándose de la raíz y esto los hace particularmente útiles para la observación de procesos celulares *in vivo* mediante cualquier tipo de microscopia. Otra característica importante de los pelos radicales que permiten usarlos como modelo de estudio, es que se pueden apreciar los diferentes estados de desarrollo de los pelos radicales en una misma planta (iniciales, jóvenes y maduros), lo que facilita el estudio de cualquiera de estas etapas del desarrollo de estas células de la planta (Figura 2). Por ejemplo, en una misma raíz existen células que emergen (iniciales), las que presentan un crecimiento activo (jóvenes) y hasta las que están senescentes (maduras). Además, se puede tener un amplio panorama del comportamiento de un proceso celular en

particular (dinámica del citoesqueleto, señalización por calcio, cambios de pH, mecanismos de secreción, etc.), esto gracias al gran número de pelos que se pueden observar en una sola raíz y en algunos casos al mismo tiempo.

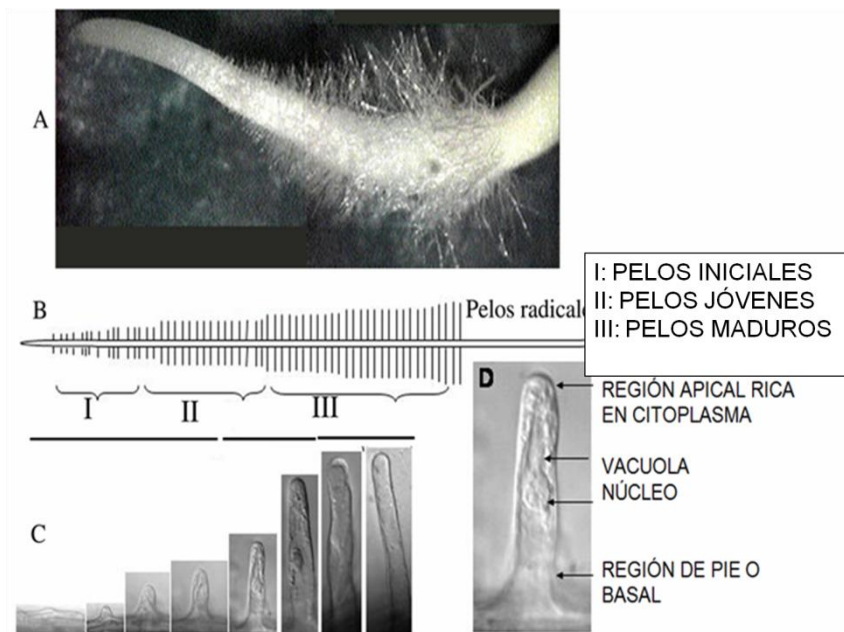


Figura 2 Imágenes tomadas por microscopía de luz transmitida, que muestran los distintos estados del desarrollo de los pelos radicales a nivel morfológico.

A, imagen que muestra los pelos radicales que emergen de la superficie de la raíz, hacia la parte superior de la raíz se encuentran los pelos radicales más largos y hacia la punta de la raíz los más cortos. B, representación gráfica que muestra de manera ilustrativa, como se distribuyen los diferentes estados de desarrollo de los pelos radicales. C, imágenes de microscopía de luz transmitida, de los pelos radicales en donde se muestra la morfología de los pelos radicales en cada una de las zonas representadas en el panel B. D, regiones y estructuras que se pueden observar a nivel morfológico en un pelo radical en crecimiento.

Asimismo, las diferentes etapas de desarrollo permiten estudiar los procesos asociados a cada uno de estos estadios, como son: la polarización de la membrana, la regulación de los flujos iónicos, la exocitosis y endocitosis dirigida, así como la dinámica del citoesqueleto (Meiri, 2005). Además, los pelos radicales son de un especial interés, ya que son las células que en *Phaseolus vulgaris* responden a las moléculas liberadas por las bacterias del género *Rhizobium* que llevan al establecimiento de la simbiosis. Los pelos radicales son capaces de deformarse para formar un hilo de infección que tiene la apariencia física de un túnel, que permite a la bacteria colonizar la raíz (Cárdenas *et al.*, 1995), lo cual

posteriormente hace posible la fijación biológica del nitrógeno atmosférico a una forma asimilable para la planta.

Por todas estas características, los pelos radicales se han utilizado ampliamente para el estudio de diversos procesos celulares, por ejemplo, se han empleado para estudiar los eventos que permiten el crecimiento altamente polarizado (Meiri, 2005). Para permitir el crecimiento en una región delimitada del ápice se requiere de múltiples eventos, estos eventos incluyen desde cambios iónicos, cambios en el pH, producción de ERO, re arreglos en el citoesqueleto, etc. Estos antecedentes han permitido sugerir que existen propiedades únicas en la membrana de estas células que permiten la actividad coordinada de todos los elementos antes descritos y que se describirán en la siguiente sección.

La membrana plasmática.

Las membranas celulares son cruciales para la vida celular ya que han permitido la compartimentalización, indispensable para la realización de actividades controladas en ambientes delimitados. La membrana plasmática rodea a la célula, sin embargo, permite una comunicación muy estrecha con el medio extracelular. Las membranas celulares están formadas por lípidos y proteínas. Los lípidos en la membrana plasmática están ordenados en forma de una doble capa continua en la que se encuentran interaccionando con proteínas. La bicapa lipídica es la estructura básica de la membrana y actúa como barrera impermeable al paso de la mayoría de las moléculas hidrosolubles y permitiendo el paso de pequeñas moléculas no polares como el oxígeno (O_2), el dióxido de carbono (CO_2) y nitrógeno (N_2).

Uno de los componentes más abundantes en las membranas celulares son los fosfolípidos (también conocidos como fosfoglicéridos). Los fosfolípidos tienen una cabeza polar y dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas (Figura 3). Las colas suelen ser ácidos grasos y su longitud varía. En los fosfolípidos una de las cadenas hidrocarbonadas presenta una o más insaturaciones. Las diferencias en la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y el grado de insaturación afectan la capacidad de los fosfolípidos para empaquetarse entre sí y con otros lípidos en la membrana, por lo tanto también afecta la fluidez de la membrana.

Otros de los componentes más importantes de la membrana plasmática son los esteroides (Figura 3). Los esteroides se orientan en la membrana plasmática con su grupo hidroxilo próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos y glucolípidos. Los anillos esteroideos planos y rígidos del colesterol interactúan con las cadenas hidrocarbonadas más cercanas a la cabeza polar generando una menor fluidez en esta región. La concentración de colesterol en la membrana afecta la fluidez de la membrana, cuando se encuentra a altas concentraciones el colesterol evita que las cadenas hidrocarbonadas interactúen y cristalicen.

Los esfingolípidos son el grupo más complejo de lípidos presentes en la membrana. Los esfingolípidos contienen azúcares, y tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre ellos. En la membrana plasmática los grupos azúcar quedan al descubierto en la superficie de la célula, lo que le permite tener una función en la interacción de la célula con el medio. Los glicolípidos más complejos son los gangliósidos que contienen oligosacáridos de uno o más residuos de ácido siálico (Figura 3).

Otros componentes de las membranas biológicas son las proteínas. Estas se asocian con la membrana de diferentes maneras. Las proteínas transmembranales atraviesan la bicapa lipídica y son proteínas anfipáticas. El carácter hidrofóbico de este tipo de proteínas se incrementa por la unión covalente de una o más cadenas de ácido graso. Otras proteínas de membrana son llamadas periféricas, debido a que se encuentran en una sola cara de la membrana. Las proteínas que se encuentran en la parte citoplásmica de la membrana se asocian con la membrana a través de la unión covalente con una o más cadenas de ácidos grasos o con un grupo prenil. También existen otras proteínas que se encuentran expuestas a la superficie celular, y que están unidas a la bicapa lipídica por medio de la unión covalente con el grupo fosfatidil inositol (GPI).

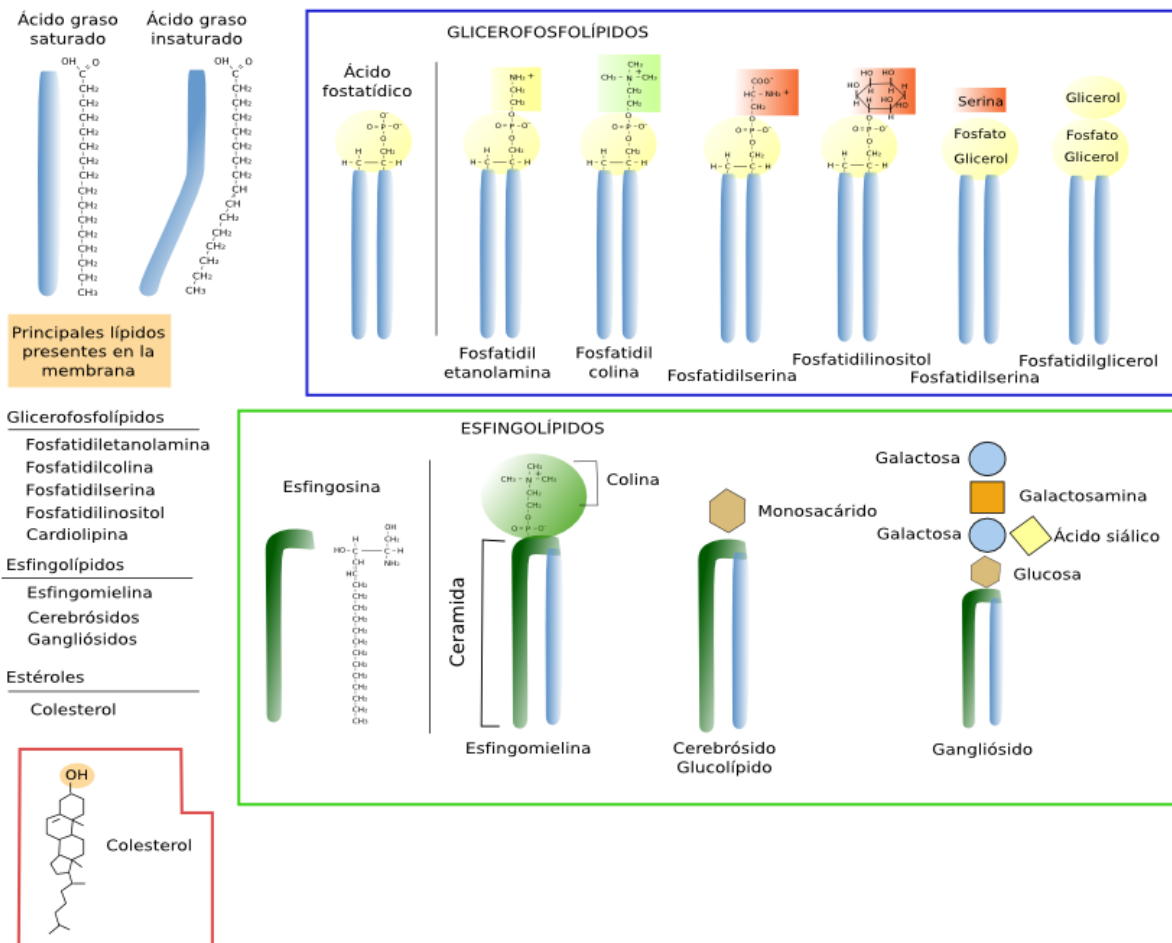


Figura 3 Representación esquemática de los principales lípidos de membrana.

Los ácidos grasos pueden tener cadenas saturadas o insaturadas como se muestra a la izquierda en la figura. Los fosfolípidos tienen una estructura básica de ácido fosfatídico y están representados en el cuadro azul. Los esfingolípidos en el cuadro verde, tienen esfingosina. Los esteroides están representados por el colesterol cuya estructura se muestra en el cuadro rojo.

Las interacciones no covalentes son las responsables de la estructura y fluidez de la membrana plasmática y las dos clases más importantes son las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. Las interacciones hidrofóbicas entre los ácidos grasos son responsables de mantener los grupos hidrofóbicos o no polares lejos del agua y son responsables de la inmiscibilidad de las cadenas hidrocarbonadas en agua, al incrementar el contacto entre ellos. Mientras que las interacciones hidrofílicas de los lípidos son las responsables de la preferencia de grupos iónicos y polares por un medio polar o acuoso. Se dan al aumentar el contacto directo entre los grupos iónicos y zwitteriónicos del lípido con la fase acuosa en la superficie de la bicapa. En el caso de lípidos zwitteriónicos las interacciones dipolo-dipolo entre los pares iónicos en la superficie de la bicapa

lipídica también contribuyen a la estabilización de la estructura de la bicapa lipídica (Singer and Nicolson, 1972). Por lo tanto, las membranas celulares son estructuras dinámicas, fluidas y sus moléculas son capaces de desplazarse en el plano de la membrana.

Los microdominios membranales.

Simons y cols. en 1988 realizaron estudios en membranas epiteliales de mamíferos y fueron los primeros en sugerir que existe una distribución lipídica diferente entre la membrana apical y basolateral, en células con crecimiento polarizado (Simons and van Meer, 1988). En estos estudios encontraron que la composición lipídica de la membrana plasmática apical y basolateral variaba, y demostraron que existía una mayor concentración de esfingolípidos y esteroides en la región apical. Puesto que los esteroides interactúan fuertemente con los esfingolípidos, estos tenderían a organizarse generando regiones con poca fluidez, mientras que los fosfolípidos ocuparían el resto de la membrana, dándole mayor fluidez a estas regiones. El tipo de lípidos y las interacciones entre ellos son las causantes de la resistencia a detergente de ciertas membranas, particularmente de las que contienen esfingomielina, colesterol, glicosfingolípidos y fosfolípidos saturados (Dietrich *et al.*, 2001). Esta idea ha crecido gracias a los diversos estudios que se han realizado en células animales y esto ha permitido plantear la hipótesis de que los lípidos que forman la membrana plasmática no están distribuidos homogéneamente, como lo sugería el modelo de Singer y Nicholson, sino que se asocian para formar microdominios membranales.

Los lípidos de membrana se agregan naturalmente en el plano de la membrana, por interacciones intermoleculares de tipo Van der Waals entre las cadenas alifáticas saturadas de los esfingolípidos, así como puentes de hidrógeno entre los residuos glicosil adyacentes de los glicosfingolípidos vecinos. Los microdominios lipídicos se forman gracias a interacciones débiles entre la cadena alifática saturada de los esfingolípidos y el anillo esteroide de los esteroides que se incorpora entre los esfingolípidos, dando lugar a un mayor grado de rigidez entre estos lípidos (Figura 4). Este empaquetamiento se debe a que hay mayor superficie de interacción entre estas dos clases de lípidos en comparación con los fosfolípidos que son excluidos de estos microdominios por sus cadenas alifáticas

insaturadas (Figura 4). Debido a que la mayoría de los fosfolípidos muestran cadenas insaturadas, éstos no se asocian con estos microdominios debido a que estas insaturaciones promueven un mayor grado de desorden y disminuyen la interacción existente entre las cadenas alifáticas de los lípidos.

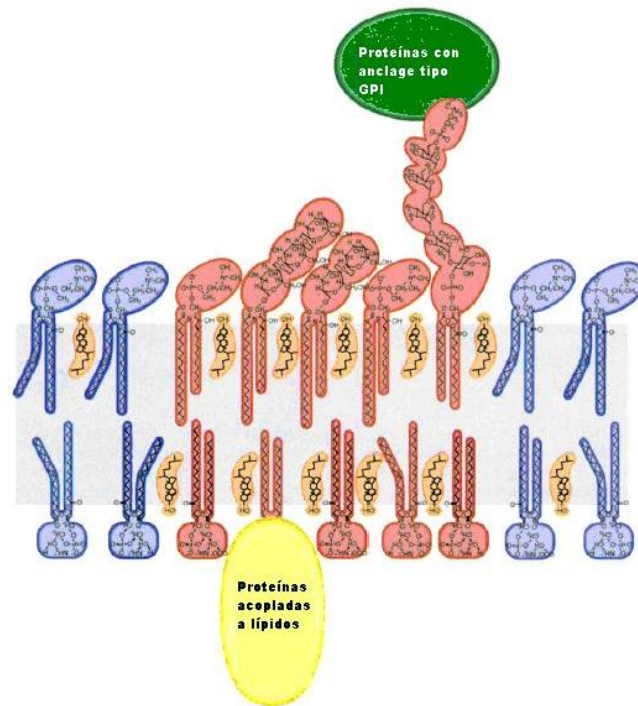


Figura 4 Representación esquemática de una balsa lipídica.

En rojo se pueden apreciar los esfingolípidos; en azul los fosfolípidos y en naranja el colesterol; también se representan algunos tipos de proteínas presentes en balsas lipídicas (Simons and Ikonen, 1997).

Un dominio es una región con características propias que lo diferencian de su entorno. Por lo tanto, un dominio de membrana, es una región con características físico-químicas que la diferencian del resto de la membrana (Anderson and Jacobson, 2002). Actualmente el término balsa lipídica, se usa para describir los microdominios enriquecidos en esteroides, esfingolípidos y proteínas presentes en la membrana plasmática. Sin embargo, los microdominios lipídicos se han nombrado de diversas maneras, de acuerdo a su composición, CEM y GEM (membranas enriquecidas en colesterol y membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos respectivamente; por sus siglas en inglés). Así mismo, se han nombrado de acuerdo a la forma en que fueron aisladas, como DIG (membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos insolubles en detergente; por

sus siglas en inglés) y DRM (membranas resistentes a detergente; por sus siglas en inglés) (Pike, 2004).

Los microdominios membranales especializados, a los que Simons e Ikonen nombraron balsas lipídicas ("lipid rafts"), juegan un papel muy importante en la transducción de señales, la endocitosis, el tráfico vesicular (Simons and Ikonen, 1997), la infección por patógenos y estas se llevan a cabo gracias a su función de reclutamiento de proteínas (Lucero and Robbins, 2004), además están asociados con el citoesqueleto (Caroni, 2001) e intervienen en la distribución de lípidos importantes para la señalización intracelular, por ejemplo: PIP₂ (Kwik *et al.*, 2003). Potencialmente, la interacción entre lípidos de las balsas lipídicas podría afectar la función de las proteínas presentes en estos microdominios, ya sea modificando su conformación, lo cual puede afectar la actividad de la proteína; o bien, facilitando la interacción entre proteínas que se encuentran concentradas en estos dominios por uno o ambos lados de la membrana (Bhat and Panstruga, 2005). La asociación de proteínas con los microdominios membranales esta determina en gran medida por la presencia ciertos dominios transmembranales (Lucero and Robbins, 2004), la existencia de un dominio de anclaje tipo glicosil fosfatidil inositol (GPI) y de acilación.

A la fecha se han reportado un número significativo de trabajos sobre balsas lipídicas. Muchos explotan la propiedad de las membranas de formar fases ordenadas aisladas debido a su insolubilidad en detergentes no iónicos, principalmente Tritón X-100 (Grennan, 2007). Algunos otros trabajos, han empleado técnicas menos invasivas como la expresión de proteínas que presentan los dominios de modificación GPI fusionados a proteínas fluorescentes y otros experimentos han analizado la interacción de proteínas asociadas con estos microdominios mediante FRET (transferencia de energía resonante de Förster; por sus siglas en inglés) (Zacharias *et al.*, 2002).

En membranas modelo, los microdominios lipídicos pueden alcanzar un tamaño que puede variar de una escala nanoscópica a una escala microscópica, dependiendo de la composición de lípidos a la que se haga referencia (Jacobson *et al.*, 2007); pero en general se ha calculado que se encuentran entre 50 nm y 500 nm. La descripción de las balsas lipídicas se ha hecho aún más compleja al proponerse que estos microdominios se pueden agrupar entre sí para formar

estructuras más grandes, a las cuales se les ha denominado islas o plataformas lipídicas. Estas plataformas presentan un tamaño mayor y se ha sugerido que son el medio que facilita que las proteínas puedan interactuar en un evento de señalización (Simons and Ikonen, 1997), permitiéndole a la célula responder más eficiente y rápidamente ante un estímulo.

ANTECEDENTES

Inicialmente, el modelo propuesto para los microdominios membranales sugería que las DRM aisladas eran el producto de los microdominios membranales preexistentes de la membrana plasmática de donde fueron extraídas, y por lo tanto debían reflejar su comportamiento. Por esto en plantas se ha usado esta metodología para la búsqueda de microdominios membranales, lo que ha permitido la caracterización *in vitro* de microdominios aislado de membranas de diferentes tejidos de plantas (Peskan et al., 2000; Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005; Laloi et al., 2007; Lefebvre et al., 2007; Kierszniowska et al., 2009).

Peskan y cols. fueron los primeros en aislar DRM de membranas de hojas de tabaco y examinaron por microscopia electrónica las vesículas insolubles en detergente. En ese trabajo, caracterizaron las vesículas de entre 100-400 nm y encontraron seis proteínas que presentaban motivos para anclaje por GPI. Como ya se mencionó anteriormente, este anclaje es frecuente en proteínas asociadas con los microdominios membranales (Peskan *et al.*, 2000).

En ese mismo año, Xu y colaboradores, demostraron que la formación de microdominios membranales está influenciada por la estructura del esteroles (Xu and London, 2000) y un año más tarde estos autores analizaron en membranas modelo la capacidad de los esteroides naturales como los de plantas y hongos, para formar microdominios. Todos estos resultados demostraron que al igual que el colesterol, los esteroides de plantas y hongos promueven la formación de dominios ordenados (Xu *et al.*, 2001). De manera interesante, los esteroides analizados por estos dos autores (ergosterol, 7-dehidrocolesterol, estigmasterol y sitosterol) promueven y estabilizan mejor que el colesterol la formación de los dominios membranales. Esta diferencia en la capacidad formadora de dominios es atribuida a la presencia de un doble enlace en el anillo esteroles y a la longitud

de la cadena alifática sustituyente, ausente en el colesterol (Xu *et al.*, 2001). Sin embargo, estos estudios fueron realizados en membranas modelo las cuales están libres de proteínas, por lo que el efecto de las proteínas en la formación de microdominios membranales no pudo ser analizado.

Posteriormente, Yuan examinó la distribución del gangliósido monosialilado 1 (GM1) en monocapas y bicapas de mezclas terciarias de lípidos que mimetizan la composición lipídica existente en membranas naturales. De manera interesante, encontraron que GM1 está distribuido en los microdominios lipídicos (Yuan *et al.*, 2002).

En un principio se había cuestionado la formación de balsas lipídicas en plantas, principalmente debido a que la presencia de colesterol no se había demostrado en plantas. Sin embargo, otros esteroides se han descrito en plantas, tales como sitosterol, stigmasterol y camposteroles que como se mencionó anteriormente, pueden reemplazar las funciones del colesterol en la capacidad de asociarse con microdominios lipídicos en plantas (Lefebvre *et al.*, 2007), gracias a la similitud estructural entre estos esteroides y el colesterol (Figura 5) (Xu *et al.*, 2001). Todos estos estudios han permitido cambiar el panorama actual y reforzar la idea de que al igual que en las células animales, las plantas también presentan los componentes estructurales necesarios para la formación de microdominios membranales.

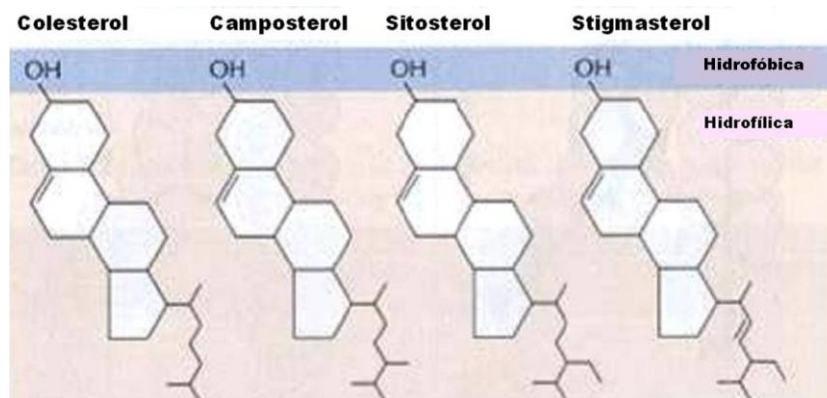


Figura 5 Estructura de esteroides existentes en la membrana plasmática de las plantas.

Los esteroides presentes en la membrana plasmática de las plantas presentan el mismo anillo esteroide, pero varían en la cadena alifática (Buchanan, 2000).

Recientemente, se han realizado contribuciones importantes que indican la existencia de microdominios lipídicos en plantas; por ejemplo, se han realizado

estudios de proteómica a partir de DRM (Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005; Lefebvre et al., 2007). Esto ha permitido caracterizar un gran número de proteínas con firmas características de componentes de microdominios lipídicos. Muchas de estas proteínas presentan motivos de anclaje tipo GPI, de manera similar a las modificaciones encontradas en ciertos microdominios membranales de células animales.

En estudios posteriores, realizados por Mongrand y cols. en hojas de tabaco y células BY2, se encontró que las fracciones insolubles analizadas estaban enriquecidas en glicosilceramida, en estigmasterol, en sitosterol, en 24-metil-colesterol y en colesterol, mientras que los fosfolípidos y los glicerolípidos son excluidos de estos microdominios membranales. En ese mismo trabajo hacen un estudio proteómico de los componentes presentes en los microdominios lipídicos que aíslan por DRM y encuentran proteínas con diversas funciones. Entre las funciones que tienen las proteínas se encuentran en estas DRM están las relacionadas con defensa (remorina), flujo de agua (aquaporina), tráfico vesicular (syntaxina y dinamina), crecimiento celular (H-ATPasa) y organización del citoesqueleto (actina y tubulina)(Mongrand *et al.*, 2004). Estas proteínas obtenidas son similares a las identificadas en otros estudios en células animales. Por otra parte, encuentran que los esfingolípidos encontrados en plantas contienen los mismos grupos polares que los existentes en células animales y que la cadena alifática del ácido graso es más corta en plantas (Bohn *et al.*, 2001; Laloi *et al.*, 2007). La cadena alifática más larga detectada en plantas fue de 20 carbonos, mientras que en células de animales, contienen arriba de 29 carbonos (Mongrand *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Borner y cols. en callos de *Arabidopsis thaliana*, mostraron que las DRM contiene cuatro veces más contenido de esteroides y cinco veces más esfingolípidos de lo que se presenta en el resto de la membrana plasmática. Las proteínas presentes en estas DRM tienen modificaciones como la acilación en el N-terminal. Por lo que concluyen que estas proteínas podrían ser dirigidas a los microdominios lipídicos, por la adición de anclajes lipídicos (Borner *et al.*, 2005).

Lefebvre y cols. por su parte, hicieron un análisis de los componentes lipídicos que forman la membrana plasmática de *Medicago truncatula*, y de manera interesante encontró que los esteroides que las forman se encuentran en

proporciones similares a los antes descritos por Borner y Mongrand (Lefebvre *et al.*, 2007).

A la fecha, la extracción de DRM es uno de los métodos de aislamiento más empleados para estudiar microdominios lipídicos como los reportes antes descritos, sin embargo, la temperatura que se usa para su extracción (4°C) es inferior a la temperatura fisiológica y esto de acuerdo a algunos autores podría afectar el comportamiento lipídico y por tanto, la organización de la membrana plasmática (Heerklotz, 2002).

En plantas, muy pocos enfoques se han abordado para el estudio de los microdominios lipídicos *in vivo*. A la fecha, solo existe un trabajo recientemente publicado en el cual han utilizado una sonda fluorescente como di-4-ANEPPDHQ y filipina ambos empleados para revelar sitios enriquecidos en esteroides en tubos polínicos con crecimiento polar (Liu *et al.*, 2009). Sin embargo, la filipina no presenta una fluorescencia fuerte que permita realizar estudios altamente dinámicos y di-4-ANEPPDHQ no representa una distribución clara de los microdominios membranales. Por lo tanto, la implementación de nuevos enfoques que permitan visualizar estos microdominios *in vivo* será de gran valor para poder abordar su estudio. Por ejemplo, se podría evaluar el papel que presentan estos microdominios durante el crecimiento, desarrollo y durante la respuesta a diferentes tipos de estreses, incluyendo las interacciones con microorganismos patógenos y simbióticos. Por lo cual, en este trabajo se explora el uso de marcadores fluorescentes específicos y que a la fecha no se han empleado en células vegetales.

JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se propone un nuevo enfoque para el estudio de microdominios membranales en células vegetales, el cual permitirá visualizarlos *in vivo* en los pelos radicales de frijol, tabaco y otras células con crecimiento polarizado, como las hifas de hongos. El análisis se realizará con lípidos específicos presentes en balsas lipídicas, que están acoplados a sondas fluorescentes. Aunque estos compuestos se han utilizado ampliamente para el estudio de microdominios membranales en células animales, hasta la fecha no existen reportes que utilicen estas sondas fluorescentes en células vegetales. Este enfoque, permitirá estudiar la distribución y la dinámica de estos microdominios *in vivo* durante el crecimiento de una célula polarizada. Además, se podrá evaluar el papel de diversas drogas que interfieren con la organización de los microdominios lipídicos.

HIPÓTESIS

Las balsas lipídicas son ricas en esteroides y glicosfingolípidos, por lo que la incorporación de glicosfingolípidos y colesterol acoplados a fluoróforo permitirá visualizar y estudiar estos microdominios *in vivo* durante el crecimiento polar de los pelos radicales.

OBJETIVO GENERAL

Visualizar microdominios membranales *in vivo* durante el crecimiento polar, usando como modelo pelos radicales de plantas y hongos filamentosos.

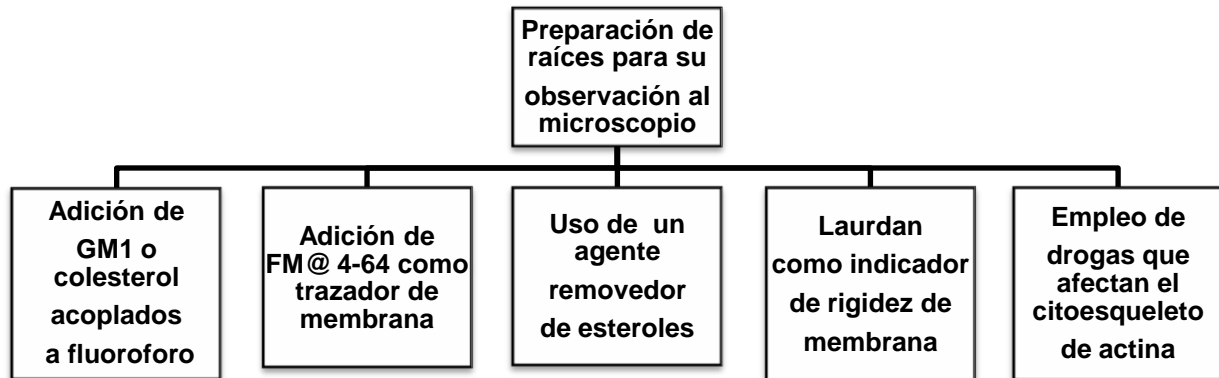
OBJETIVOS PARTICULARES

Marcar de manera específica microdominios membranales utilizando marcadores fluorescentes específicos en pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* en crecimiento.

1. Evaluar la capacidad del GM1 derivatizado con un marcador fluorescente para asociarse con microdominios lipídicos.
2. Estudiar la capacidad de poder incorporar colesterol derivatizado dentro de microdominios lipídicos en células vegetales.
3. Evaluar las diferencias entre la incorporación de sondas específicas para microdominios lipídicos y los trazadores de membrana como FM@ 4-64.
4. Determinar el efecto de agentes removedores de esteroides (metil- β -ciclodextrina) de membrana sobre la organización de los microdominios membranales y sobre el crecimiento apical de los pelos radicales.
5. Estudiar el efecto de compuestos que afectan el citoesqueleto de actina (citocalasina, latrunculina y jasplakinolide) en la organización de los microdominios membranales.
6. Determinar el grado de rigidez de la membrana mediante el uso de sondas fluorescentes (Laurdan).

METODOLOGÍA:

Esquema metodológico.



Germinación de *Phaseolus vulgaris*.

La superficie de las semillas de *P. vulgaris* se desinfecta con lavados sucesivos de hipoclorito de sodio al 2.5 %, etanol al 20 % y agua mili-Q estéril; durante 5, 3 y un minuto respectivamente. Las semillas desinfectadas se colocan en una charola de cultivo estéril sobre papel absorbente humedecido con medio Fahreaus estéril (CaCl₂ 562 µM, MgSO₄ 622 µM, KH₂PO₄ 457 nM, Na₂HPO₄ 650 nM, Citrato férrico 13 µM, H₃BO₃ 46.2 µM, MnSO₄ 13.4 µM, ZnSO₄ 1.36 µM, CuSO₄ 500 nM, NaMnO₄ 330 nM). La charola se cubre con papel aluminio estéril y se coloca en una cámara de crecimiento en posición semi inclinada a una temperatura de 28 °C.

Preparación de raíces para su observación al microscopio.

De las plantas germinadas se eligen aquellas con una raíz de aproximadamente 3 cm y se colocan en una caja de Petri con portaobjetos estéril, se le agrega 1 ml de medio Fahreaus estéril a la raíz y se cubre con papel de celulosa (celofán dulce) estéril. Después se dejan en recuperación a 28 °C, por al menos seis horas. Una vez que se recuperan las raíces, se realizan los tratamientos y/o se añaden las sondas fluorescentes y se observan las células al microscopio.

Elaboración de complejos metil-β-ciclodextrina: NBD-colesterol.

Los complejos metil-β-ciclodextrina:colesterol constituyen una buena estrategia para introducir colesterol a las células. Para la preparación de estos

complejos se utiliza metil- β -ciclodextrina (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.253 μ M, mientras que para el NBD-colesterol se empleará una concentración de 0.088 μ M. Para la incorporación de colesterol a la célula se utiliza una mezcla consistente en metil- β -ciclodextrina: NBD-colesterol (10:1, v:v), disueltos por separado en cloroformo: metanol (1:1, v:v) y se dejan incubando toda la noche en agitación a 37 °C (Christian *et al.*, 1997).

Principios físicos de la fluorescencia.

Las sustancias fluorescentes, pueden absorber la luz y volverla a emitir. En este proceso la luz re-emitida tiene una longitud de onda más larga que la de la luz recibida (es decir, las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga). Así, los materiales luminiscentes al ser expuestos a la acción de los rayos ultravioletas, rayos X o rayos catódicos, se llaman fluorescentes.

Cuando un compuesto absorbe energía, una parte de esta energía se emite como luz, y este proceso tiene dos pasos (Figura 6 A):

1. La energía incidente (excitación) hace que los electrones de los átomos del material absorbente se exciten y salten de las orbitas internas de los átomos a las orbitas exteriores (es decir, suben su nivel energético).
2. Cuando los electrones vuelven de nuevo a su estado original, emiten un fotón (emisión).

El intervalo entre los dos pasos puede ser corto (menos de 0.0001 segundos) a grande (varias horas). Si el intervalo es corto, el proceso se llama fluorescencia; si el intervalo es largo, el proceso se llama fosforescencia.

La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada. Los colorantes fluorescentes utilizados para el marcaje celular son detectados con ayuda del microscopio de fluorescencia. Este microscopio es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente, que procede de una potente fuente, atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluoróforo, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente)

atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluoróforo (Lakowicz, 2006). Este proceso se describe en la figura 6 B.

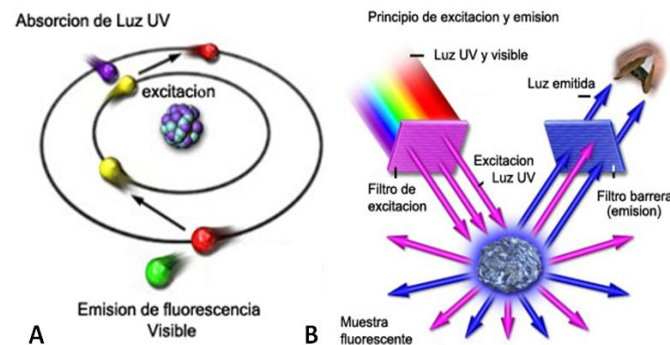


Figura 6 Esquema básico del fenómeno de fluorescencia.

A, la energía de excitación (onda corta) excita los electrones haciéndolos elevarse a un nivel energético mayor, al regresar a su nivel energético inicial la energía liberada se emite como fluorescencia (de mayor longitud de onda). B, Diagrama simplificado de la observación de una muestra fluorescente.

Uso de sondas fluorescentes.

Las sondas fluorescentes usadas para analizar la presencia de microdominios membranales en los pelos radicales son las siguientes: el gangliósido GM1-FI (Invitrogen), NBD-colesterol (Avanti Polar Lipids), filipina (Invitrogen) y DHPE-Rh (Molecular Probes). Asimismo, se utilizó FM@ 4-64 (Molecular Probes) para visualizar las membranas. Los compuestos fluorescentes FM@ 4-64, DHPE-Rh, filipina, Laurdan y GM1-FI se incorporan directamente en la membrana plasmática. Laurdan (Sigma-Aldrich) es un compuesto fluorescente sensible a la polaridad del medio en que se encuentra y se emplea como un marcador que nos permite visualizar la heterogeneidad de la membrana. Para la incorporación de NBD-colesterol en membrana se emplea metil- β -ciclodextrina como se describió anteriormente; ver tabla 1.

Las sondas fluorescentes se adicionan lentamente en el medio en el que se encuentran creciendo las raíces, estas raíces deben estar previamente preparadas en cámaras especialmente diseñadas para este propósito. Seguido de su recuperación, se levanta cuidadosamente el papel celofán para descubrir la raíz, y se adiciona la sonda fluorescente lentamente a 2 ml de medio Fahreaus, en la caja Petri donde se encuentra creciendo la plántula. Una vez que las plántulas se tratan con la sonda fluorescente, se observan al microscopio de fluorescencia.

Tabla 1. Fluoroforos empleados para visualizar microdominios lipídicos.

Compuesto	Concentración (M)	Absorción (nm)	Emisión (nm)	Filtro de absorción	Filtro de emisión	Blanco
GM1-FI	1.48×10^{-15}	485	535	HQ484/15	535/25	Microdominios membranales
Laurdan	15×10^{-6}	364	430/490	380x	485/40	Rigidez de la membrana y/o microdominios membranales
FM@ 4-64	3.29×10^{-14}	515	640	D530/20	605/55	Membrana celular inespecíficamente
NBD- Colesterol	8.9×10^{-8}	460	534	HQ470/40	535/25	Microdominios membranales y/o regiones enriquecidas en esteroles
Filipina	3×10^{-12}	360	460	D340x	485/40	Regiones enriquecidas en esteroles
DHPE-Rh	3×10^{-16}	557	571	D540/25	D605/55	Microdominios membranales

Tratamiento con compuestos que afectan los microfilamentos de actina y agentes removedores de esteroides.

Para estudiar este aspecto se adicionan lentamente los compuestos removedores de esteroides (metil- β -ciclodextrina, Sigma-Aldrich), así como las drogas que afectan el citoesqueleto de actina (citocalasina B, latrunculina y jasplakinolide; Sigma-Aldrich) a las plántulas que se encuentran creciendo en la caja de Petri. Estas cajas contienen las plántulas previamente preparadas, donde se encuentra creciendo la plántula sólo con medio Fahreaus. Otras plántulas son colocadas en las cajas de Petri con medio Fahreaus y son tratadas con los marcadores fluorescentes, y posteriormente se tratan con las drogas que afectan el citoesqueleto de actina o que remueve esteroides, y son observadas al microscopio de fluorescencia.

Para el uso del agente removedor de esteroides de membrana (metil- β -ciclodextrina, Sigma-Aldrich) se usan varias concentraciones 5, 7, 10, 15, 30 y

60; hasta encontrar una concentración en que el efecto fisiológico sea observable en los pelos radicales. Mientras que para los compuestos que afectan el citoesqueleto de actina se usan las siguientes concentraciones: para Latrunculina se usa 1 nM y 2 nM; para Jasplakinolide 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM y 100 nM; y para Citocalasina B-Rh 200 nM. La citocalasina rodaminada fue excitada a una longitud de onda de 557 nm usando un filtro de 540 nm con un ancho de banda de 25 (D540/25) y su emisión se capturó en una longitud de 571 nm con un filtro de 605 nm con un ancho de banda de 55 nm (D605/55).

Obtención de imágenes.

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron excitando las sondas fluorescentes con una unidad externa de iluminación (DG-4, Shutter Instruments), con un objetivo de inmersión en agua de 60X y una apertura numérica de 1 (ver tabla 1).

Las imágenes tanto de fluorescencia como de luz transmitida se capturan utilizando una cámara de CCD (Cool SNAP HQ² Photometrics, Roper Scientific) y el programa especializado de captura de imágenes Metamorph/Metafluor (Universal Imaging), acoplado a un sistema de filtros giratorio (Lambda, Shutter Instruments), que controlan los filtros de emisión y luz polarizada. También contamos con un obturador (shutter Uniblitz) que permite el paso de luz transmitida de manera automatizada. Este equipo en conjunto garantiza una rápida adquisición de la imagen de fluorescencia y de luz transmitida. El sistema de microscopía de fluorescencia consiste de un microscopio invertido marca Nikon (Eclipse TE 300), y que contiene una cámara de incubación que permite regular las condiciones de temperatura a la que se encuentra la muestra biológica para el crecimiento óptimo de las plántulas mientras se capturan las imágenes.

Procesamiento de imágenes.

Las imágenes obtenidas son procesadas usando las herramientas del programa de captura y procesamiento de imágenes Methamorph/Methafluor (Universal Imaging), que a continuación se describen. Las imágenes de fluorescencia y de luz transmitida, son rotadas para mostrar los pelos radicales de manera vertical. A las imágenes de fluorescencia, además se les subtrae el

fondo (Background subtraction tool, por su nombre en inglés) seleccionando un área de interés (ROI, por sus siglas en inglés) exterior al pelo radical, que hace una resta entre la intensidad de fluorescencia de la ROI en toda la imagen. Para una mejor presentación de las imágenes de fluorescencia, se les aplica un filtro medio; este filtro toma un pixel de prueba y lo compara con los pixeles que lo rodean (kernel) y hace un promedio de las intensidades de fluorescencia.

La fluorescencia se cuantifica seleccionando un área determinada de interés en la cual se mide la intensidad de fluorescencia promedio capturada y los datos se grafican con el software Excel (Microsoft). Para el caso de las DRM, se tomó y se midió la fluorescencia de toda la imagen. En el caso de los pelos radicales tratados con GM1-FI y tratados con Latrunculina se tomó una ROI del mismo tamaño en la región apical del pelo radical en toda la secuencia.

Aislamiento de pelos radicales de *P.vulgaris*

Las raíces de frijol germinadas como ya se mencionó anteriormente, se colocan en un vaso de precipitados de 100 mililitros con medio Fahreaus y se dejan en recuperación por 8 horas. Las raíces recuperadas son tratadas con GM1-FI a una concentración de 3×10^{-15} M durante 5 segundos y luego se congelan con nitrógeno líquido. Las raíces congeladas se cortan y se colocan en un vaso de precipitados con nitrógeno líquido en agitación suave para evitar quebrar las raíces. Las raíces se vierten en un colador de metal y se recupera el nitrógeno líquido enriquecido en pelos radicales en otro recipiente, se hacen cinco lavados con nitrógeno líquido y en cada lavado se agitan las raíces en el colador. El nitrógeno líquido se deja evaporar y se re suspenden los pelos radicales en TNE (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM a pH 7.4) adicionado con un cocktail de inhibidores de proteasas, en una relación 1:2 (1 gramo de muestra: 2 mililitros de TNE enriquecido con el cocktail de inhibidores de proteasas complete Roche 1.6 µg/ml).

Extracción de DRM a partir de homogenados de raíz

El aislado de pelos radicales se centrifugó a 11,000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, para bajar núcleo y se recuperó el sobrenadante. Se determinó la proteína del sobrenadante de la muestra por el método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, G.L. 1977 Anal. Biochem.83, 346-356).

Para la obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM) se realizó una combinación de los métodos descritos para tabaco (Peskan *et al.*, 2000) y levadura (Bagnat *et al.*, 2000).

Para la obtención de DRM (Figura 7) a 17 µg de muestra que fueron resuspendidas en amortiguador TNE (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM) obtenidas de pelos radicales, se les añadió Tritón X-100 (TX100) a una concentración final de 1%, y las membranas fueron solubilizadas a 4 °C durante 30 min. Una vez solubilizadas las membranas se hace un gradiente en el orden que a continuación se muestra:

- A las membranas solubilizadas se les añadió 0.5 mL de Optiprep (Axis-Shield) al 60% para obtener una concentración final de 40%.
- Al tubo anterior se le adicionaron 1.2 mL de solución Optiprep al 30% en TXNE (TNE, 0.1% TX100).
- Se adicionó enseguida 0.2 mL de solución TXNE.
- Se centrifugó a 45 000 rpm en la Ultracentrífuga Beckman utilizando el rotor SW50.1 a 4 °C durante 2 horas.
- El gradiente fue dividido en 6 fracciones de igual volumen (358 µL cada fracción). La fracción superior corresponde a la fracción de DRM.

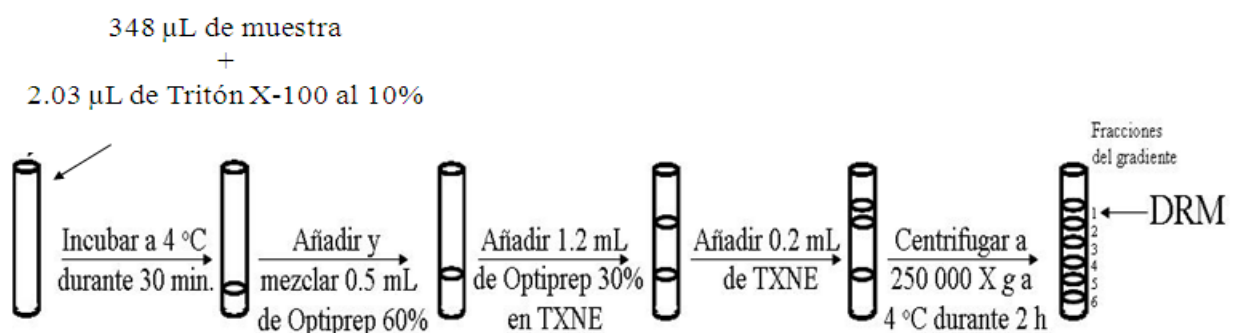


Figura 7 Procedimiento de obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM).

Procedimiento de obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM). Donde TXNE, Amortiguador TNE y 0.1% Tritón X-100.

RESULTADOS:

GM1-FI y DHPE-Rh acoplados a fluoróforos como marcadores membranales, en pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* y otras células con crecimiento apical.

Se sabe que el colesterol y los esfingolípidos forman parte de los microdominios membranales. Una manera de visualizar estos microdominios membranales es el uso de lípidos acoplados a fluoróforos los cuales tienen una distribución preferencial en microdominios membranales, como GM1-FI.

Uno de los intereses de este proyecto, consiste en determinar si GM1-FI es capaz de incorporarse específicamente en la membrana celular de los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* si su localización es homogénea o si se limita a regiones delimitadas. Los primeros experimentos fueron desarrollados en pelos radicales de frijol y bajo las condiciones establecidas se pudo lograr incorporar la sonda fluorescente en los pelos radicales vivos con crecimiento polar (Figura 8). Los resultados obtenidos con los pelos radicales de frijol resultan muy interesantes, primero porque la sonda se adiciona a toda la zona de la raíz y sin embargo se acumula mayoritariamente en la región apical (Figura 8, panel B y C). Segundo, los pelos radicales con la sonda incorporada pueden seguir manteniendo sus funciones particulares como el flujo citoplásmico y el crecimiento polar (Figura 8 A), sin perder la localización apical de la sonda fluorescente.

Las células vegetales presentan una pared celular que recubre la membrana plasmática. Aunque es una estructura rígida, la pared celular es altamente dinámica, protege a la célula de los cambios ambientales y en algunas ocasiones evita que muchos compuestos entren a la célula, quedando retenidos en la pared celular. Finalmente, es importante mencionar que cuando se realiza una plasmólisis suave de la célula para separar la membrana celular de la pared celular, la localización de la sonda fluorescente es estrictamente membranal y no está asociada a elementos de la pared celular (Figura 8, panel D). Por lo tanto, estos resultados nos permitirán realizar experimentos que nos lleven a entender como estos lípidos están asociados con el crecimiento polar.

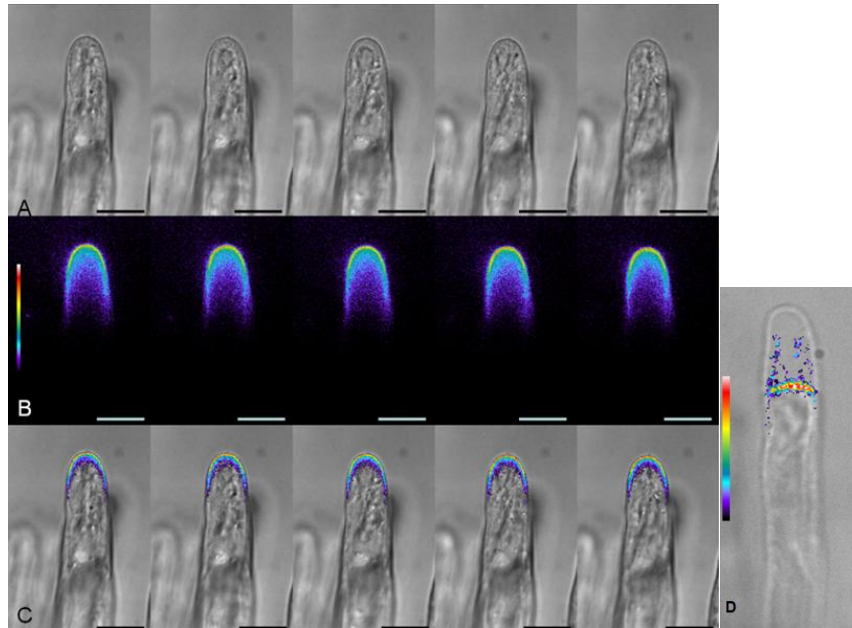


Figura 8 GM1-FI permite marcar microdominios membranales en pelos radicales de *P.vulgaris*.

De A-C se muestra una secuencia de imágenes de un pelo radical de frijol. En el panel A se muestran las imágenes de luz transmitida, en B las imágenes de fluorescencia y en el panel C, la colocación de las imágenes de luz transmitida y fluorescencia. En D, se muestra una sobre posición de la imagen de luz transmitida y de fluorescencia de un pelo radical de frijol plasmolizado con 40mM de sacarosa. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 10 μ m.

Con la finalidad de determinar si esta distribución de GM1-FI es similar en pelos radicales de otras plantas, también se utilizaron pelos radicales de tabaco. Las plantas de tabaco fueron proporcionadas amablemente por estudiantes del laboratorio del Dr. Mario Rocha. En las plantas de tabaco, los pelos radicales se marcan de manera similar a los de frijol cuando se les adiciona la sonda fluorescente GM1-FI (Figura 9, panel A, B y C) y al igual que en frijol mantienen su crecimiento polar y flujo citoplásmico (Figura 9 A).

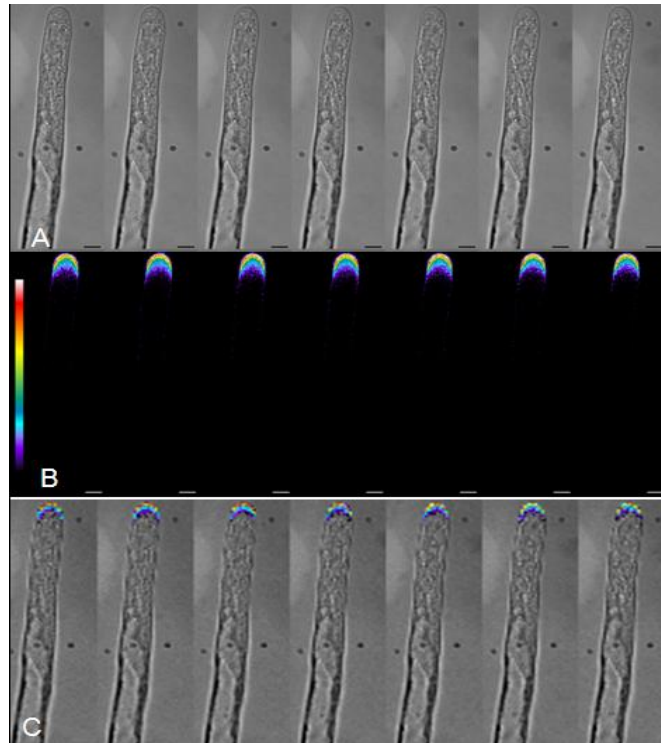


Figura 9 Visualización de los microdominios membranales utilizando GM1-FI en pelos radicales de tabaco.

En A, se observa la abundante presencia de citoplasma en la región apical indica que se trata de una célula viva con actividad de crecimiento polar. En B, se puede apreciar una clara distribución de la señal fluorescente en la región apical, A, luz transmitida. B, fluorescencia. C, sobre posición de imágenes. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 10 μm .

Dado que también es interesante saber si el crecimiento polar está determinado en gran medida por una polarización de la membrana, utilizamos otras células que también presentan un crecimiento apical. Entre estas células se encuentran las hifas de hongos filamentosos que presentan un patrón de crecimiento similar del marcador. De manera interesante las hifas presentan una distribución similar de los microdominios membranales, esta distribución es apical y confinada al domo de la célula en crecimiento (Figura 10 A, B y C). En todas estas células con crecimiento polar, la localización de GM1-FI fluorescente es predominantemente apical (Figura 10), por lo cual nuestros resultados sugieren que GM1-FI se está incorporando a las membranas de estas células y que lo hace preferencialmente en la región apical, lo cual apoya de manera importante, la idea de que en la región apical existen propiedades muy particulares de la membrana, los cuales algunos han sugerido que sean balsas

lipídicas y que en este trabajo nos limitamos a definirlos como microdominios membranales.

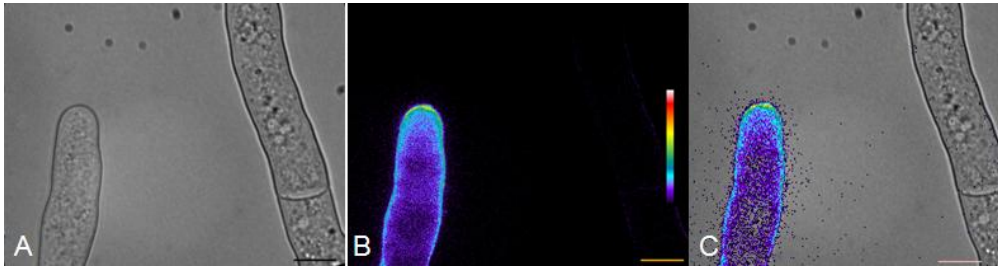


Figura 10 Hifas filamentosas de *Conidiobolus coronatus* creciendo bajo condiciones *in vitro* y tratadas con GM1-FI.

En la figura se observa una clara distribución de una máxima señal en la región apical, que se parece a lo encontrado en los pelos radicales de frijol y tabaco. A, luz transmitida. B, fluorescencia. C, sobre posición de imágenes. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 10 μm .

En los pelos radicales cuyo crecimiento se ha detenido GM1-FI no se incorpora a las células (Figura 11), mientras que el marcador específico de microdominios lipídicos se acumula en la membrana plasmática apical de los pelos radicales en crecimiento e hifas de *Conidiobolus coronatus*. En estos experimentos las raíces de *P. vulgaris* se marcaron con GM1-FI y se sometieron a estrés mecánico causado por la manipulación excesiva de las raíces. Los pelos radicales en la figura 11 A, muestran un hinchamiento apical característico de una célula sujeta a estrés mecánico y una disminución clara del citoplasma en la zona apical.

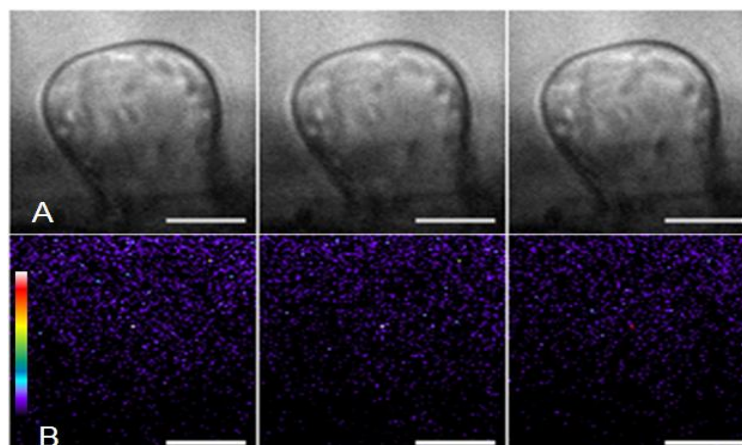


Figura 11 Las células que no presentan crecimiento apical, no incorporan GM1-FI.

En A y B se muestra una secuencia de imágenes de un pelo radical de frijol marcado con GM1-FI y sujeto a estrés. En A, se muestran las imágenes de luz transmitida, en B las imágenes de fluorescencia correspondientes. Las imágenes de fluorescencia se muestran

en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 10 μm .

Exploración de otros marcadores fluorescentes potencialmente útiles para la visualización de microdominios membranales en células vegetales.

La fosfatidil etanolamina es un lípido de cadena saturada que se ha descrito como componente de los microdominios membranales. Empleando este lípido acoplado a rodamina (DHPE-Rh) se ha utilizado en membranas modelo como marcador específico que puede visualizarse en los microdominios membranales (Bouvrais *et al.*). En plantas este marcador fluorescente no ha sido empleado, por ello en este trabajo se consideró explorar de manera general y a fin de corroborar los datos previamente mostrados con GM1-FI si se comporta de manera similar. Los pelos radicales vivos de frijol bajo condiciones de crecimiento apical se marcaron con DHPE-Rh y se establecieron las condiciones de concentración para marcar la membrana (ver metodología). Como se muestra en la figura 12, se puede apreciar que este lípido se concentra de manera preferencial en la membrana plasmática apical (Figura 12 B y C). Esta distribución es muy similar a la que hemos descrito con GM1-FI, por lo que muy probablemente ambas sondas fluorescentes pueden ser utilizadas como marcadores selectivos de microdominios membranales.

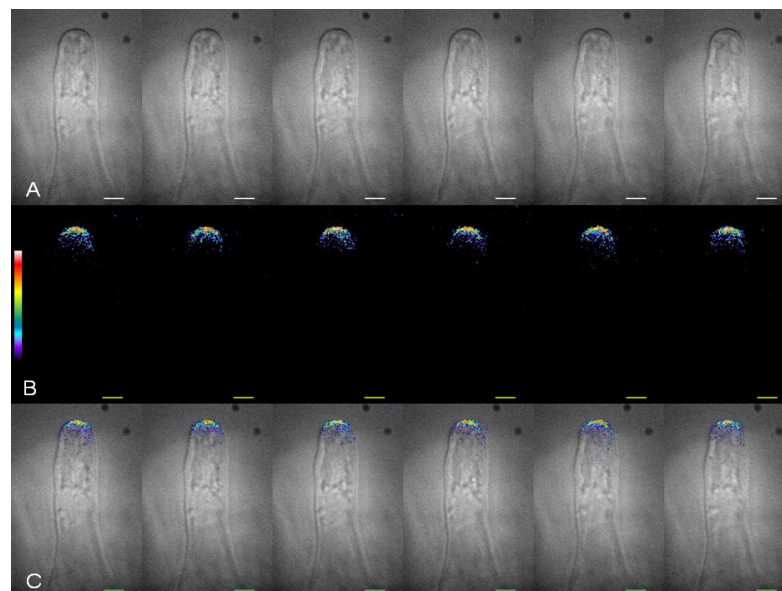


Figura 12 DHPE-Rh como un marcador de microdominios lipídicos en células vegetales.

A, secuencia de imágenes de luz transmitida de un pelo radical en crecimiento y marcado con DHPE-Rh, tomadas cada 3 segundos. B, la correspondiente señal fluorescente de la misma secuencia de imágenes. C, sobre posición de las imágenes de fluorescencia y luz

transmitida. Las imágenes se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 20 μm .

Visualización de la membrana plasmática de los pelos radicales utilizando FM@ 4-64, un marcador no selectivo de la membrana plasmática

Para determinar si la acumulación de los marcadores específicos de los microdominios lipídicos se debe a una característica de los microdominios lipídicos en los pelos radicales, se empleó FM@ 4-64 que es un marcador inespecífico de microdominios de membrana. FM@ 4-64 se incorpora homogéneamente en la membrana, por lo que puede ser empleado a manera de control. Como se puede observar en la figura 13, FM@ 4-64 se acumula de a lo largo de toda la membrana plasmática y no presenta una distribución similar a la de GM1-FI y DHPE-Rh. Estos experimentos se realizaron inmediatamente después de agregar la sonda fluorescente FM@ 4-64, ya que este colorante tiende a endocitarse después de la incorporación del colorante en la membrana.

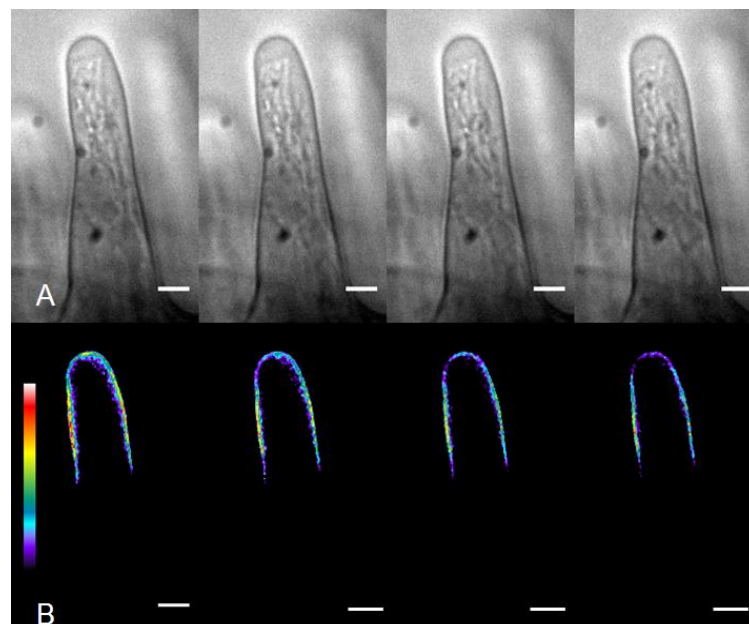


Figura 13 Localización del marcador de membrana FM@ 4-64 en pelos radicales de frijol.

En A, se muestra una secuencia de imágenes de luz transmitida de un pelo radical de frijol marcado con FM@ 4-64 y en B, las imágenes de fluorescencia correspondientes (ambas tomadas cada 3 segundos). Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 10 μm .

Incorporación y localización de esteroles, un componente indispensable para la formación de los microdominios lipídicos membranales.

Uso de NBD-colesterol

El colesterol es uno de los componentes más importantes en los microdominios lipídicos, por lo que la adición directa de NBD-colesterol acoplado a un fluoróforo resulta interesante para demostrar la presencia de microdominios lipídicos en pelos radicales. Sin embargo, la adición de NBD-colesterol en el medio en el cual se encuentran creciendo los pelos radicales de *P. vulgaris*, resulta ser muy ineficiente para marcar los pelos radicales. El colesterol se incorpora pobremente en la membrana plasmática y además, forma agregados en el medio que emiten fluorescencia con gran intensidad que aumenta mucho la señal de fondo e imposibilita la visualización de la fluorescencia asociada a la membrana. En muchos casos remover el colorante libre del medio mediante lavados facilita la disminución del fondo y favorece la obtención de una señal más intensa en la célula. Sin embargo, aún después de remover el colorante del medio, la señal proveniente de los pelos radicales es pobre (Figura 14 B). Además, debido a que esto implica la adición de altas concentraciones de colesterol (0.089 μ m) y múltiples lavados, las células se estresan demasiado y terminan con un crecimiento inhibido (Figura 14 A). No obstante, estos resultados nos permitieron determinar la distribución de la señal en pelos radicales que no se encuentran creciendo de manera polar. En las células sin crecimiento se puede observar que la señal no se encuentra distribuida de manera homogénea (Figura 14), ya que existen algunos sitios con mayor intensidad a lo largo de la membrana, sin embargo, nunca pudimos visualizar una clara acumulación en la membrana apical. Por lo tanto podemos considerar que las células que no se encuentran creciendo no presentan una distribución apical del colesterol indicado por la presencia de la señal fluorescente.

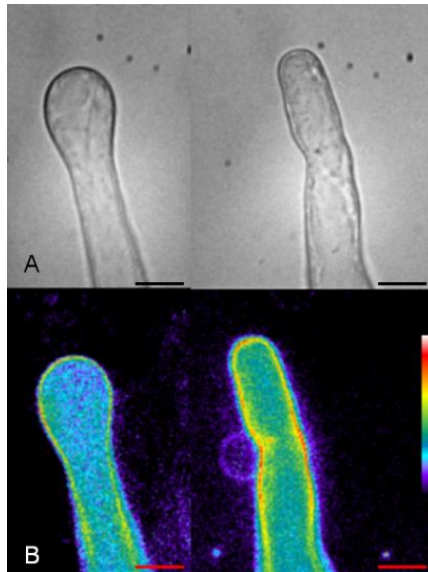


Figura 14 Incorporación de NBD-colesterol en pelos radicales vivos que no presentan crecimiento polarizado.

En A, se muestran las imágenes de luz transmitida y en B, las correspondientes imágenes de fluorescencia de NBD-colesterol. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. La escala es de 10μm.

Dado que la estrategia anterior no permite conservar células sanas con un crecimiento activo, decidimos implementar otra estrategia para incorporar el NBD-colesterol a las células. Una de las formas más empleadas para introducir colesterol en células animales es el empleo de vesículas, en las cuales se combina el colesterol con un fosfolípido. En esta opción las vesículas formadas se fusionan con la membrana plasmática, logrando así la incorporación del colesterol en la célula destino. En el presente estudio se emplearon vesículas con 10% de NBD-colesterol en fosfatidil colina (PC), las cuales fueron aplicadas directamente al medio en el cual se encuentran creciendo los pelos radicales. Sin embargo, no se logró una incorporación de las vesículas de NBD-colesterol/PC en los pelos radicales, esto pudo deberse a la pared celular y a la fusión de las vesículas en el medio, las cuales pueden fusionarse entre ellas y formar vesículas mas grandes al grado de no poder atravesar la pared celular para unirse a la membrana plasmática (Figura 15). La fusión de las vesículas en el medio puede deberse a la presencia de iones calcio en el medio. Un dato importante es que las vesículas fusionadas llegaron a tener un tamaño comparable al de los pelos radicales de *P. vulgaris*, lo cual oscila entre 80 y 100μm de longitud (Figura 15 A).

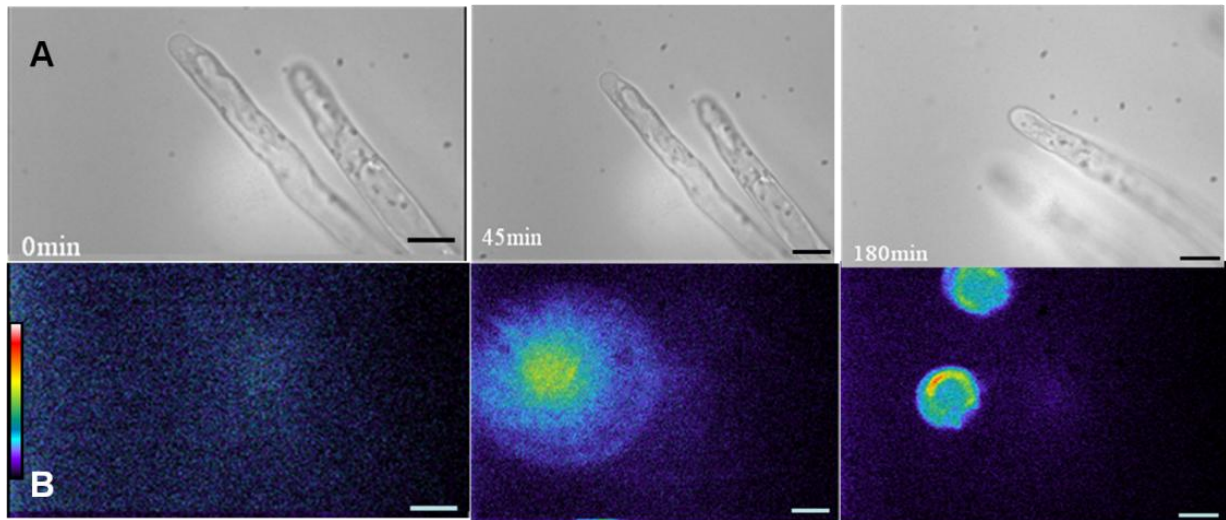


Figura 15 Las vesículas de NBD-colesterol y PC no se incorporan en pelos radicales vivos.

Se usaron vesículas con un contenido de 10% de colesterol en fosfatidil colina (PC). En A, se muestran las imágenes de luz transmitida y en B, sus correspondientes imágenes de fluorescencia. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia. La escala corresponde a 10 μ m.

Los resultados obtenidos muestran que las vesículas de colesterol/fosfolípido tampoco resultaron ser una manera efectiva para la incorporación de colesterol en nuestro modelo de estudio, por lo que se intentó otra alternativa para incorporar el NBD-colesterol a la célula. Este enfoque ha sido ampliamente utilizado en células animales y consiste en explotar la alta afinidad de la Metil- β -ciclodextrina por el colesterol (Christian *et al.*, 1997). La estrategia empleada consiste en elaborar complejos de Metil- β -ciclodextrina con NBD-colesterol, estos complejos se dejan interactuar con los pelos radicales para favorecer el intercambio del colesterol de la membrana por el NBD-colesterol que se encuentra asociado a la Metil- β -ciclodextrina. Los complejos Metil- β -ciclodextrina: NBD-colesterol se realizaron a una relación 10:1, ya que en un reporte previo se ha definido como una relación eficiente para incorporar colesterol en células animales (Christian *et al.*, 1997). Como resultado, los pelos radicales lograron incorporar de manera exitosa el NBD-colesterol; además, de manera muy similar a los datos obtenidos con GM1-FI, la localización de la señal fluorescente en los pelos radicales se muestra en la región apical (Figura 16 A). Finalmente, para demostrar que la señal no se encuentra en la pared celular, se realizó una plasmólisis suave inducida con sacarosa 0.04M en los pelos radicales previamente marcados con los complejos Metil- β -ciclodextrina: NBD-colesterol.

Estos resultados se muestran en la figura 16 B y se puede apreciar que la fluorescencia de la sonda se encuentra asociada a la membrana plasmática y no a la pared celular; indicando que la señal fluorescente no se está pegando a la pared celular y que la señal es exclusiva de la membrana plasmática de los pelos radicales y que esta se acumula en la zona apical.

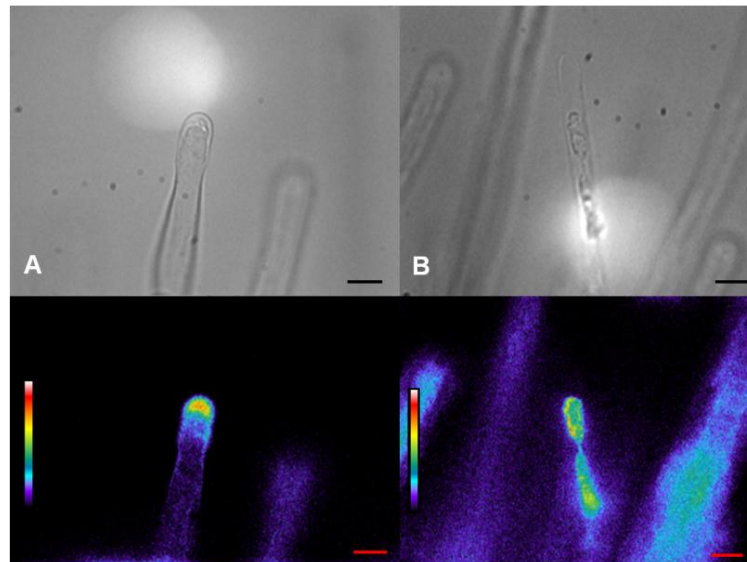


Figura 16 Los complejos Metil- β -ciclodextrina: NBD-colesterol permiten la incorporación del colesterol en pelos radicales vivos de frijol.

En A, se muestran imágenes de luz transmitida y fluorescencia de 2 pelos radicales marcados con NBD-colesterol. En B, se observan imágenes de luz transmitida y fluorescencia de un pelo radical previamente marcado con NBD-colesterol y plasmolizado con sacarosa. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia. Barra escala corresponde a 10 μ m.

La filipina, una alternativa limitada para el estudio de los microdominios lipídicos

Una estrategia alternativa para determinar la presencia de esteroides en la membrana plasmática es el uso de filipina. La filipina es un antibiótico autofluorescente que se une a esteroides con una alta especificidad. Es por esto que se emplea como marcador de la presencia de colesterol. Sin embargo, el uso de la filipina tiene limitaciones muy serias, esta se excita en el rango del ultravioleta ocasionando un estrés constante a la célula y la filipina tiende a fotoblanquearse rápidamente. En la figura 17, se observa un pelo radical de *P. vulgaris* con un crecimiento apical normal y tratado con filipina. A juzgar por la localización de la fluorescencia emitida por filipina (Figura 17 B), se puede

apreciar que la localización de esterol es apical. La presencia apical de esterol en la membrana plasmática apical de los pelos radicales (Figura 17) resulta similar a los datos obtenidos utilizando NBD-colesterol (Figura 16).

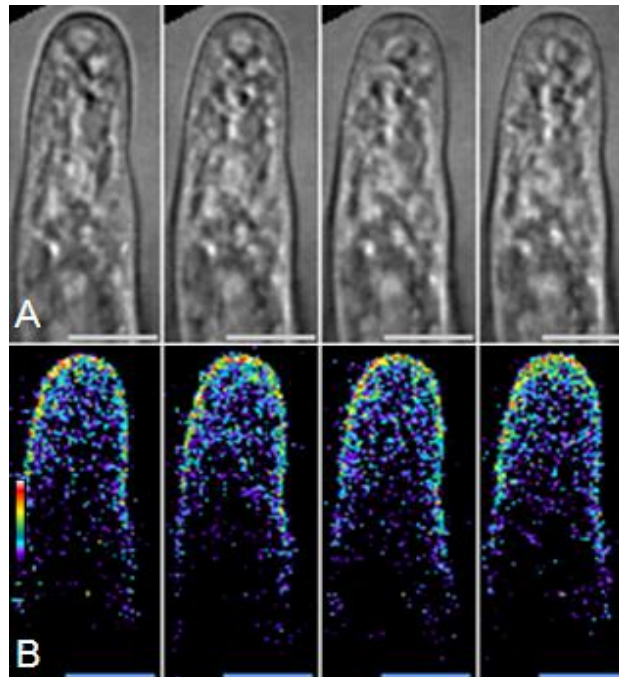


Figura 17 Localización de esterol como indicador de la presencia de microdominios membranales utilizando filipina.

En A, se muestra una secuencia de imágenes de luz transmitida de un pelo radical de frijol marcado con filipina y en B, las correspondientes imágenes de fluorescencia. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las escalas corresponden a 10 μm .

Localización de Laurdan en pelos radicales de *P. vulgaris* y otras células con crecimiento apical.

Con la finalidad de determinar la rigidez de la membrana, se utilizó Laurdan. Este colorante se ha utilizado ampliamente en células animales con este fin, sin embargo no existen reportes sobre su uso en células vegetales y por lo tanto no contamos con protocolos para su uso. Para determinar la concentración en la cual Laurdan se incorpora de manera eficiente en la célula sin alterar su morfología y crecimiento, se evaluaron diferentes concentraciones de Laurdan en pelos radicales de *P. vulgaris*. Las concentraciones de Laurdan analizadas fueron de 2.5, 5, 10 y 15 μM , siendo esta última donde se pudo apreciar la incorporación del colorante en la membrana de los pelos radicales con una señal

intensa en la región apical de la célula (Figura 18 A). Una de las limitaciones del uso de esta sonda fluorescente es que se excita en el rango de UV (460/490) y se fotoblanquea muy fácilmente. Esto implica que no se puedan realizar experimentos largos que involucren el seguimiento de una misma célula a través de una secuencia de imágenes. Es interesante remarcar que la localización de la fluorescencia emitida por Laurdan, se asemeja a la distribución obtenida con GM1-FI, NBD-colesterol, DHPE-Rh y filipina.

Para verificar que la señal se encuentra asociada a la membrana celular y no a la pared celular, se llevó a cabo una plasmólisis inducida con sacarosa como ya se describió anteriormente. La plasmólisis se realizó en los pelos radicales previamente marcados con Laurdan y con una clara señal apical (figura 18 A). Mediante este enfoque pudimos observar que la señal se encuentra claramente asociada a la membrana celular y no a la pared celular de los pelos radicales de *P. vulgaris* (Figura 18 B, C y D). Estos resultados nos confirman la localización de la sonda fluorescente en la membrana plasmática.

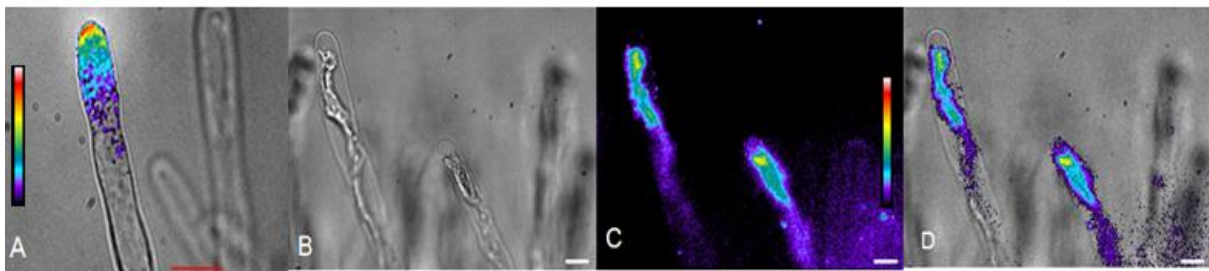


Figura 18 Laurdan se incorpora en la membrana apical de los pelos radicales vivos de *P. vulgaris*.

A, Un pelo radical de frijol tratado con Laurdan a una concentración de 15 μM que ilustra la localización apical de la sonda fluorescente. B, C y D, pelos radicales de frijol tratados con Laurdan y posteriormente plasmolizados con 0.04 M de sacarosa. En B se muestra la imagen de luz transmitida y en C la imagen de fluorescencia; mientras que en D se realizó una sobre posición de las imágenes de fluorescencia y luz transmitida. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y el violeta menor. Barra de escala corresponde a 10 μm .

Con la idea de determinar la rigidez de la membrana de los pelos radicales de frijol es un comportamiento general en los pelos radicales realizamos los mismos experimentos en células de tabaco. Los resultados obtenidos nos permiten observar que la localización de la señal es muy similar a la observada en los pelos radicales de frijol (Figura 19). Esto nos indica que la organización de la membrana es muy similar en los pelos radicales de diferentes plantas.

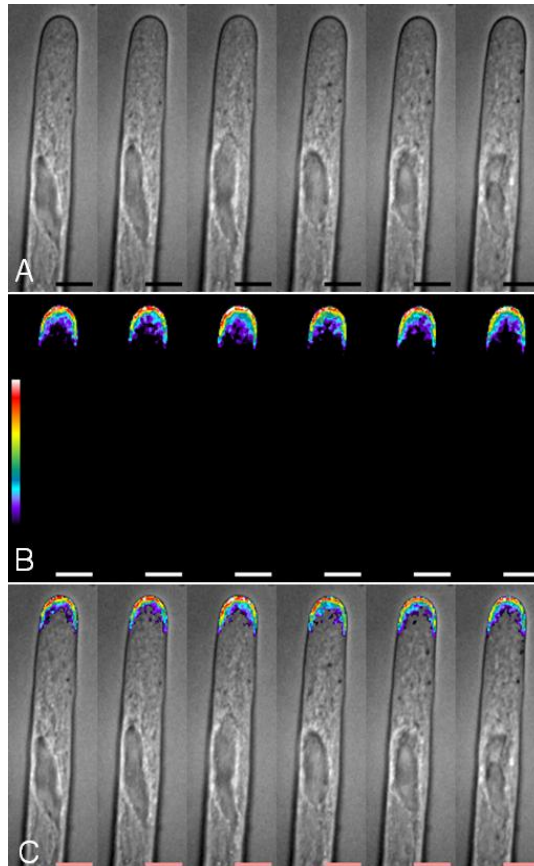


Figura 19 Imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la incorporación de Laurdan en pelos radicales de tabaco.

De A-C se muestra una secuencia de imágenes tomadas cada 15 segundos de un pelo radical de tabaco marcado con Laurdan a una concentración de 15 μM . A, secuencia de imágenes de luz transmitida, B, la misma secuencia mostrando la localización de la señal fluorescente, y en C, sobre posición de las imágenes de fluorescencia y luz transmitida. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor. La barra de escala corresponde a 10 μm .

Efecto de la extracción de colesterol en la organización de los microdominios lipídicos

Los microdominios lipídicos están enriquecidos en colesterol y lípidos de cadena alifática saturada, por lo que es interesante analizar el efecto que tiene un agente removedor de esteroides en la organización de los microdominios membranales visualizados con la sonda fluorescente GM1-FI. Los pelos radicales de frijol bajo condiciones de crecimiento apical normal se trataron con GM1-FI y se seleccionaron aquellas células con un patrón de crecimiento normal y clara localización de la señal fluorescente en la región apical. Posteriormente las células se trataron con metil- β -ciclodextrina (removedor de esteroides) para

determinar el efecto que tienen los esteroides en la organización de los microdominios lipídicos (Figura 20). Los resultados obtenidos nos demuestran que la organización típica de los microdominios membranales (Figura 20 A) se ve severamente afectada pocos segundos después de haber sido tratados con metil- β -ciclodextrina (Figura 20 B). Esta respuesta se describe como una redistribución de la señal de GM1-FI a otras regiones de la membrana, sin embargo después de 5 min la señal empieza a desaparecer de la membrana por lo que muy probablemente la metil- β -ciclodextrina también tiene la propiedad de remover lípidos de membrana como ya se ha sugerido anteriormente.

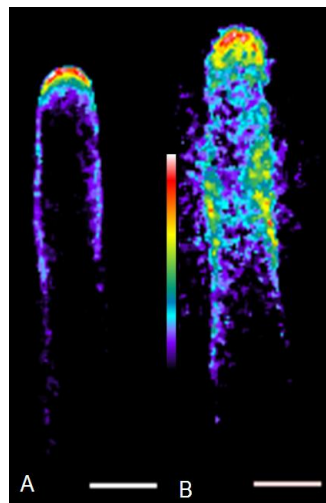


Figura 20 La metil- β -ciclodextrina desorganiza los microdominios lipídicos.

Los pelos radicales de *P. vulgaris* fueron marcados con GM1-FI y después tratados con metil- β -ciclodextrina, el agente removedor de esteroides. En A y B se muestran imágenes de fluorescencia de un pelo radical de frijol marcado con GM1-FI y posteriormente tratado con metil- β -ciclodextrina. En el panel B, se puede apreciar la aparición de la señal fluorescente en la región subapical. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor intensidad. Las barras de escala corresponden a 20 μ m.

Papel del citoesqueleto en la organización de los microdominios lipídicos en pelos radicales de *P. vulgaris*.

Para estudiar el efecto que tienen los compuestos que afectan el citoesqueleto de actina en la organización de los microdominios lipídicos se utilizaron diversas drogas que se sabe que interfieren con la organización del citoesqueleto. Estas drogas pueden estabilizar los microfilamentos e inducir polimerización de actina como el jasplakinolide (Cardenas *et al.*, 2008) y otros que promueven la despolimerización como latrunculina (Cardenas *et al.*, 2005) y

citocalasina. Para esto primero se probaron los efectos de estos compuestos sobre el crecimiento y morfología de los pelos radicales partiendo de concentraciones previamente descritas para tubo polínico (Cardenas *et al.*, 2005); la finalidad era encontrar un efecto morfológico detectable o letal en los pelos radicales.

Se sabe que el efecto de jasplaquinolide es promover la polimerización de actina, por lo que esta droga es usada para estudiar el efecto de la polimerización de actina en diversos procesos celulares (Cardenas *et al.*, 2005). Para determinar las concentraciones adecuadas en las cuales se pueda apreciar un efecto morfológico en los pelos radicales, se probaron diferentes concentraciones de jasplaquinolide. Las concentraciones empleadas fueron de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 100nM, siendo esta última la concentración en donde se pudo observar un crecimiento polar alterado de los pelos radicales que repercute en la morfología de las células. El efecto de jasplaquinolide sobre la morfología de los pelos radicales es la disminución del diámetro de los pelos radicales seguido de un aumento del diámetro de los pelos radicales en la región apical (Figura 21). Estos cambios en el diámetro están relacionados con la inhibición del crecimiento y se asemeja en gran medida al hinchamiento apical observado en los pelos radicales tratados con los factores de nodulación (Cárdenas *et al.*, 2006).

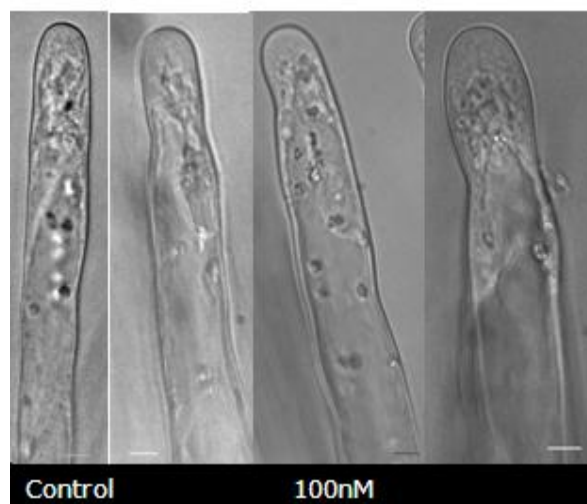


Figura 21 Efecto de jasplaquinolide en los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*.

Imágenes de microscopía de luz transmitida de pelos radicales sin tratar y tratados con jasplaquinolide a una concentración de 100nM. La escala es de 10 μ m.

La latrunculina es una droga que al igual que jasplaquinolide tiene efecto sobre el citoesqueleto de actina, sin embargo, actúa de manera diferente al jasplaquinolide. La latrunculina se une a los monómeros de actina y por lo tanto previene su incorporación al filamento de actina, por lo cual es un inhibidor eficaz de la polimerización de actina. Los pelos radicales tratados con latrunculina experimentan inicialmente una fragmentación del citoplasma que también puede interpretarse como una vacuolización y al mismo tiempo hay una disminución del flujo citoplásmico por lo que eventualmente el crecimiento apical se ve inhibido (Figura 22). A los 90 minutos se puede apreciar el efecto más drástico inducido por latrunculina, el cual incluye el hinchamiento de la región apical que correlaciona con la inhibición total del crecimiento polar (Figura 22). Cabe señalar que este proceso de vacuolización es diferente al que se observa cuando un pelo radical se somete a otros procesos de estrés.

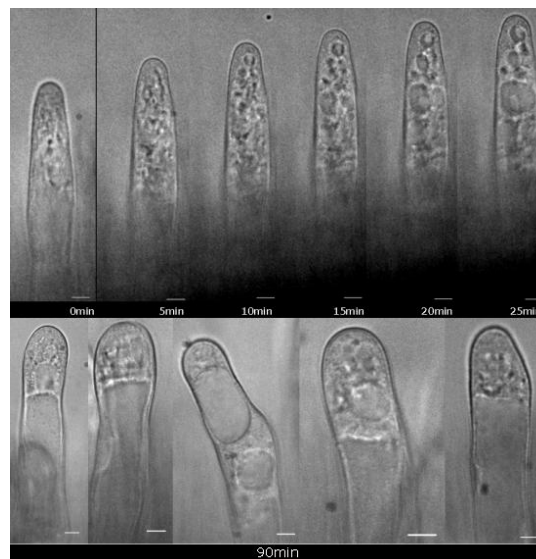


Figura 22 Micrografías de luz transmitida que muestran el efecto de latrunculina en los pelos radicales de *P. vulgaris*.

Los pelos radicales fueron tratados con latrunculina a una concentración de 2 nM a diferentes tiempos. A, en la secuencia superior, se muestra una secuencia de un pelo radical tratado con latrunculina dentro de los primeros 25 min. B, secuencia inferior, se muestran diferentes pelos radicales 90 minutos después del tratamiento. La barra escala corresponde a 10 μ m.

La citocalasina B es otra de las drogas que interfieren de manera notable con la organización del citoesqueleto de actina, esta droga tiene particularmente la propiedad de unirse a los extremos (+) de los microfilamentos de actina (por donde crece preferencialmente el microfilamento, por lo cual esta droga es capaz

de inhibir la polimerización de actina al unirse a los sitios de polimerización de actina. En nuestro laboratorio se ha introducido recientemente el uso de citocalasina acoplada a rodamina (Cit-Rh) y a concentraciones subletales en células vegetales. Esto ha permitido mantener por ejemplo a los pelos radicales vivos y con crecimiento polar y al mismo tiempo contar con una excelente sonda fluorescente que permite visualizar los sitios de polimerización *in vivo* (Cárdenas et al., manuscrito en preparación). Los pelos radicales tratados con Cit-Rh demuestran que los sitios de polimerización se encuentran en la región apical del pelo radical en crecimiento (Figura 23 B y C). Asimismo hemos podido observar que estos sitios de polimerización son altamente dinámicos como se puede observar en la secuencia de imágenes de fluorescencia las cuales concuerdan en gran medida con los datos previos que se han obtenidos en el laboratorio. La finalidad de estos experimentos es determinar mediante este enfoque, si la organización del citoesqueleto de actina tiene alguna relación con la organización de los microdominios lipídicos.

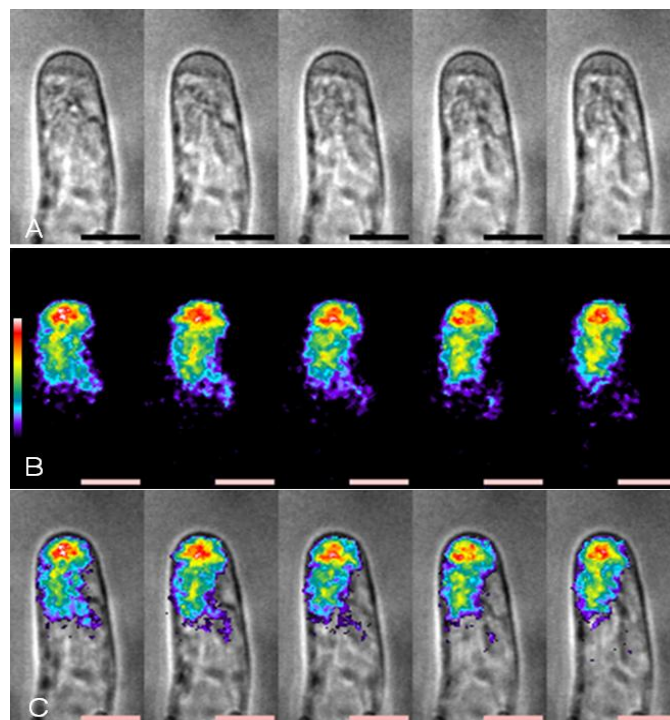


Figura 23 Imágenes de microscopía que muestran los sitios de polimerización de actina en los pelos radicales de *P. vulgaris*.

A, se muestra una secuencia de imágenes tomadas cada 5 segundos de luz transmitida de un pelo radical de *P. vulgaris* previamente tratado con Cit-Rh. B, la misma secuencia indicando la fluorescencia de la Cit-Rh y en C, se muestra una sobre posición de las imágenes de fluorescencia y luz transmitida. Las imágenes de fluorescencia se muestran

en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia. La barra escala corresponde a 10 μm .

Efecto de las drogas que afectan el citoesqueleto de actina en la organización de los microdominios lipídicos.

Como primer acercamiento para estudiar la relación entre los sitios de polimerización de actina con los microdominios lipídicos, se realizó la sobreposición de las señales emitidas por la Cit-Rh (sitios de polimerización) y GM1-FI (microdominios lipídicos) en pelos radicales de *P. vulgaris* (Figura 24). Para hacer una colocalización de ambas señales los pelos radicales de frijol que se encuentran creciendo de manera normal se trataron con ambas sondas fluorescentes bajo las condiciones previamente establecidas para cada compuesto. Las señales de las sondas fluorescentes se obtuvieron de manera casi simultánea con una diferencia de tiempo de 5-10 ms y los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 24. Estos resultados nos permiten sugerir que los sitios de polimerización de actina están muy cercanos a los microdominios lipídicos; por lo tanto, no descartamos la posibilidad de que estos sitios de polimerización de actina jueguen un papel importante en la distribución de los microdominios lipídicos al menos de manera indirecta.



Figura 24 Sobre posición de Citocalasina acoplada a rodamina y el marcador de microdominios lipídicos (GM1-FI), en pelos radicales de *P. vulgaris* vivos.

A, secuencia de imágenes de luz transmitida. B, secuencia de imágenes que muestra la sobreposición de la señal de fluorescencia de ambas sondas fluorescentes visualizadas de manera simultánea. En rojo los sitios de polimerización de actina y en verde los microdominios membranales. La barra escala corresponde a 10 μm .

Dado que el interés principal en este estudio es determinar el efecto que pudiera tener el citoesqueleto de actina sobre la distribución de los microdominios lipídicos, en principio se empleó jasplaquinolide debido al efecto notable que tiene al inducir la polimerización y estabilización de los microfilamentos de actina y la morfología observada en los pelos radicales (Figura 21). Esta droga previamente descrita como un agente polimerizador de actina, se empleo en combinación con el GM1-FI, el marcador de los microdominios lipídicos (Figura 25). Jasplaquinolide se usó a una concentración de 100nM, la cual previamente determinamos que tiene un efecto claro sobre la morfología de los pelos radicales de *P. vulgaris* y el crecimiento polar (Figura 21). En la figura 25 A y B, se puede apreciar una secuencia de imágenes de un pelo radical tratado con jasplaquinolide; con el mismo efecto fisiológico descrito en la figura 21 y que describimos como un cambio en la morfología del ápice del pelo radical y la inhibición del crecimiento. Estas células con la morfología descrita por efecto del jasplaquinolide se trataron con la sonda fluorescente GM1-FI para determinar si la organización de los microdominios también se ve alterada. En la secuencia de imágenes que mostramos en la figura 25 A y B se puede apreciar que la localización apical de los microdominios lipídicos se redistribuye a lo largo del pelo radical y no en el ápice. Estos resultados sugieren que la modificación en la organización del citoesqueleto de actina afecta la organización del marcador de microdominios membranales. Posteriormente se invirtió el tratamiento y los pelos radicales se trataron previamente con GM1-FI y posteriormente con jasplaquinolide (Figura 25 C). Como se puede apreciar en la figura 25 C, la señal fluorescente apical se redistribuye de manera similar desapareciendo de la región apical de la célula.

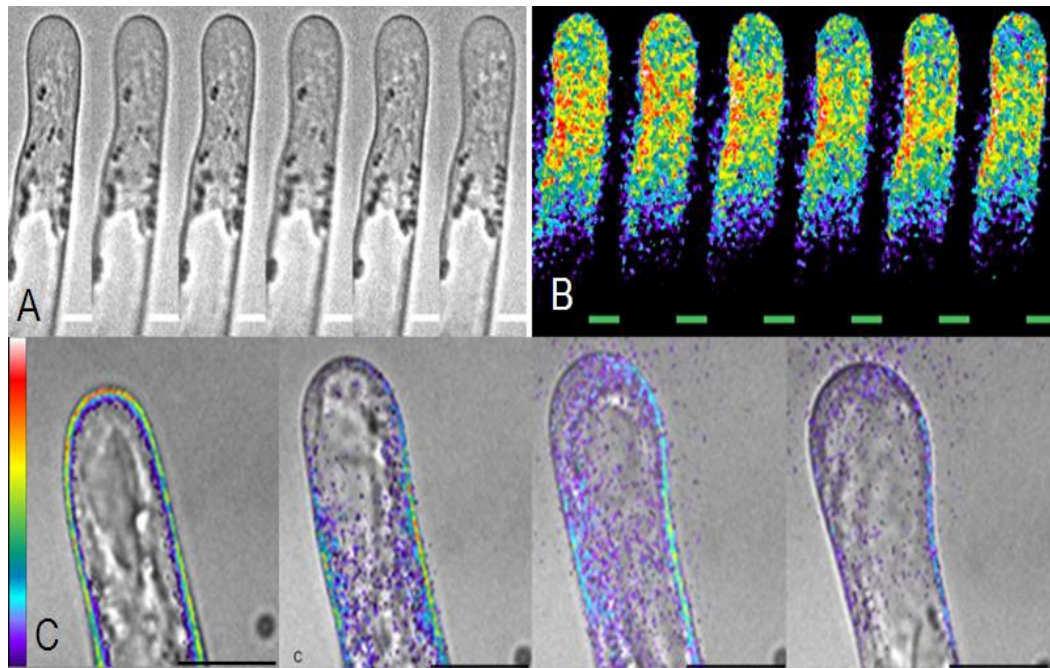


Figura 25 Jasplaquinolide desorganiza la distribución apical de los microdominios lipídicos.

Para A, secuencia de imágenes de luz transmitida (cada 10 segundos) de pelos radicales tratados con 100nM de jasplaquinolide y marcados posteriormente con GM1-FI. B, secuencia correspondiente en fluorescencia. C, una imagen representativa de la sobre posición de los microdominios lipídicos en un pelo radical tratado primero con GM1-FI y posteriormente con jasplaquinolide. Las imágenes de fluorescencia se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia y violeta menor. La barra de escala corresponde a 20 μ M.

Para ahondar en la relación que existe entre el citoesqueleto de actina y los microdominios membranales, los pelos radicales de *P. vulgaris* fueron tratados con latrunculina A. Como ya se mencionó latrunculina A se une a monómeros de actina e inhibe la polimerización de actina, lo que induce una rápida fragmentación del citoesqueleto de actina. Los pelos radicales tratados con la sonda fluorescente GM1-FI para marcar los microdominios lipídicos y posteriormente tratados con latrunculina A experimentan un cambio drástico en la organización de los microdominios membranales. Inicialmente los pelos radicales presentan la típica distribución apical mostrada anteriormente (Figura 26 A), sin embargo, 30 min después experimentan una pérdida de la localización apical de la señal fluorescente y esta respuesta es más acentuada una hora después del tratamiento con latrunculina (Figura 26 A y gráfica en B). Estos resultados nos sugieren que los microdominios lipídicos dependen en gran

medida de la presencia de un citoesqueleto intacto para el mantenimiento de su localización apical.

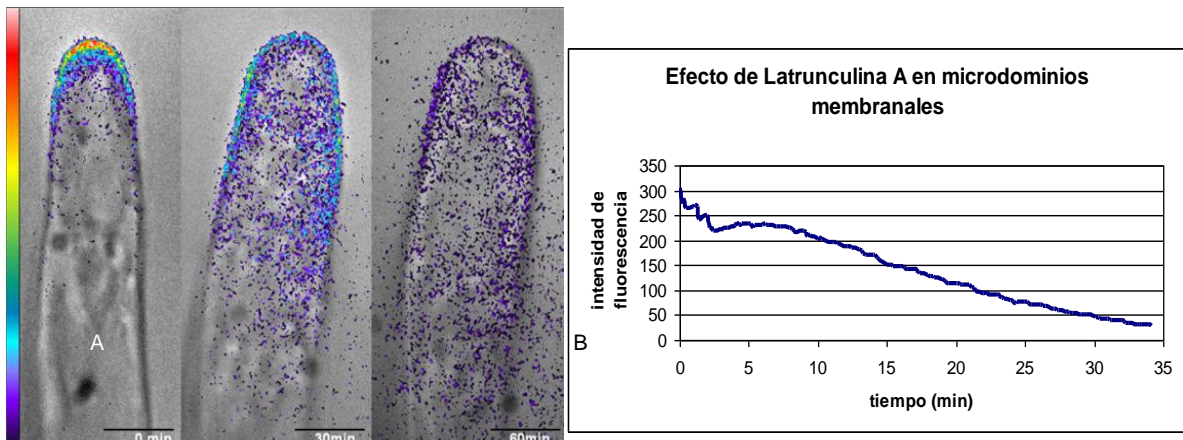


Figura 26 Los microdominios lipídicos son altamente sensibles a la presencia de latrunculina.

A, es una sobre posición de las imágenes de fluorescencia y luz transmitida a los 0, 30 y 60 min después de ser tratados con latrunculina A, la célula fue previamente tratada con el marcador de microdominios lipídicos GM1-FI. En B, se muestra la gráfica de la fluorescencia apical de la señal fluorescente encontrada en A. Las imágenes se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia. La barra escala corresponde a 10 μ m.

Establecimiento de un protocolo para el aislamiento de de pelos radicales tratados con el marcador de microdominios lipídicos GM1-FI.

Para lograr el aislamiento de microdominios lipídicos se implementó una técnica para el aislamiento de pelos radicales de frijol marcados con GM1-FI. Las plantas recién germinadas se cambiaron a medio líquido y se dejaron recuperar para la regeneración de nuevos pelos radicales. Posteriormente las plantas se trataron con el marcador de microdominios lipídicos GM1-FI y se comprobaron que efectivamente los pelos radicales se encontraban marcados en la región apical. En contraste los pelos radicales marcados con el marcador de membrana FM@ 4-64 y luego aislados, muestran una localización homogénea en la membrana en los pelos radicales. El aislamiento de los pelos radicales se llevó a cabo por congelamiento y ruptura mecánica de los pelos radicales en nitrógeno líquido (Wan *et al.*, 2005), lo que mantiene casi íntegra la estructura de los pelos radicales. Posteriormente los pelos radicales aislados se observaron al microscopio y se encontró que la señal fluorescente GM1-FI aún se mantenía en

la región apical de las células purificadas. Este mismo experimento se llevó a cabo en pelos radicales marcados con FM@ 4-64, el marcador de membrana plasmática (Figura 27 B). Los resultados obtenidos nos demuestran que la señal fluorescente de los microdominios lipídicos se mantienen en la membrana plasmática y se acumulan en la región apical de manera similar a lo observado en pelos radicales creciendo sobre la raíz (Figura 24). El hecho de que los pelos radicales se mantienen con una organización intacta y que el marcador fluorescente se localiza en la región apical nos sugiere que nuestro enfoque resulta adecuado para la obtención de material exclusivo de pelos radicales (Figura 27 A). Más aún la estructura del pelo radical se mantiene casi intacta, como se puede apreciar en la figura 27.

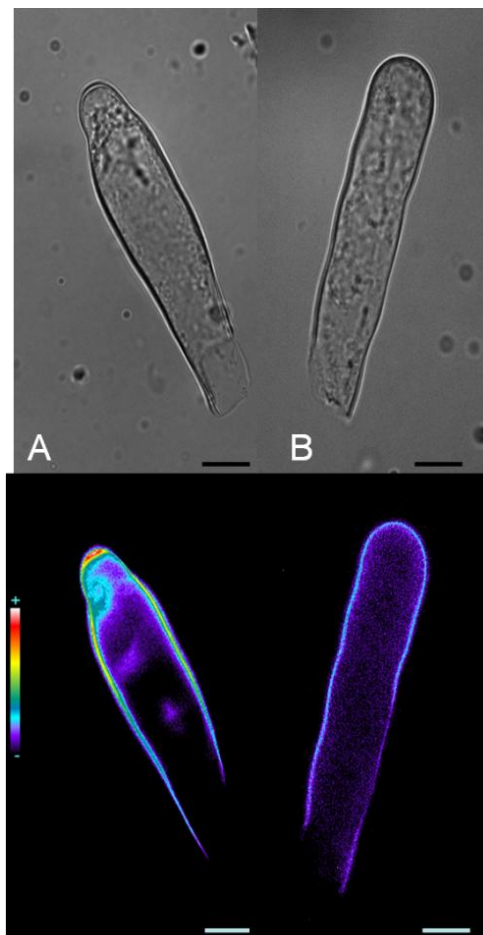


Figura 27 El aislamiento de los pelos radicales mantiene una localización apical de GM1-FI.

Para A, se obtuvieron micrografías de luz transmitida y fluorescencia de un pelo radical marcado con GM1-FI y aislados por congelamiento. En B, se muestra la imagen de luz transmitida de un pelo radical marcado con FM@ 4-64 y su fluorescencia correspondiente. Las imágenes se muestran en una escala de pseudocolor, donde el rojo indica mayor intensidad de fluorescencia. La escala es de 10 μ m.

Obtención de DRM a partir de pelos radicales de *P.vulgaris* marcados con GM1-FI.

Una de las estrategias más empleadas de mostrar la presencia de microdominios lipídicos, es el aislamiento de fracciones de membrana resistentes a la solubilización en detergente (DRM, por sus siglas en inglés). Por lo cual, en el presente trabajo se probó el aislamiento de microdominios lipídicos a partir de muestras puras o enriquecidas en pelos radicales y previamente marcadas con GM1-FI. De esta manera podríamos seguir el enriquecimiento de la fluorescencia emitida por GM1-FI en las fracciones correspondientes a DRM. El racional de este enfoque es que las fracciones enriquecidas en DRM deberían de ser más fluorescentes porque los microdominios lipídicos están marcados con el marcador fluorescente GM1-FI. Para lograr el aislamiento efectivo de los microdominios lipídicos mediante solubilización con Tritón X-100 se siguió la metodología descrita por Bagnat (Bagnat *et al.*, 2000). Para la solubilización de membranas mediante Tritón X-100 se aislaron pelos radicales marcados con GM1-FI como se describe en la figura 27 A, ya que hemos probado que esta condición favorece el aislamiento de pelos radicales y raíces en las condiciones apropiadas. En la Figura 28 se muestran los resultados obtenidos de la fluorescencia obtenida de las fracciones correspondientes de membranas aisladas de raíces marcadas con GM1-FI y cuantificadas por microscopía de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia que muestran las fracciones obtenidas, muestra una tendencia en la que la mayor fluorescencia se observa en la fracción correspondiente a la DRM (F1, Figura 28).

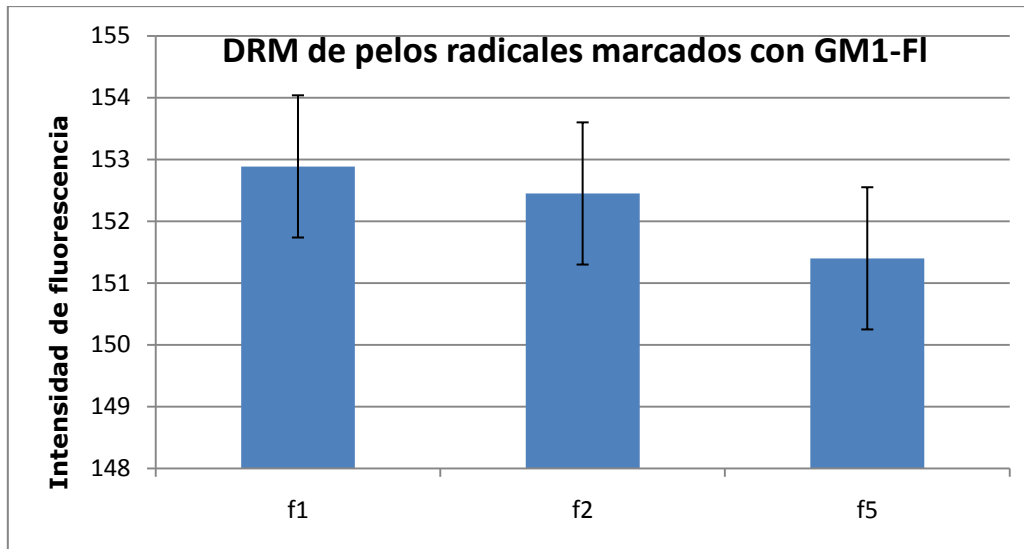


Figura 28 GM1-FI se localiza en las fracciones DRM de raíz.

En la gráfica, se muestra la fluorescencia obtenida de las fracciones aisladas a partir de raíces tratadas con GM1-FI. Donde f1 y f2 corresponden a las fracciones DRM, mientras que f5 es la fracción soluble.

DISCUSIÓN

Recientemente se han realizado contribuciones importantes que proponen la existencia de microdominios membranales en plantas. Por ejemplo, se han realizado estudios de proteómica a partir de DRM (Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005; Lefebvre et al., 2007) que han permitido caracterizar un gran número de proteínas con firmas características de componentes de microdominios membranales. Estos resultados refuerzan la idea de que los microdominios lipídicos existen en células vegetales. No obstante, aun persiste la interrogante que sugiere que los microdominios lipídicos obtenidos con Tritón no reflejan la composición lipídica y la distribución que presentan los microdominios lipídicos en la célula (Heerklotz, 2002). Es por esto que en un intento por correlacionar la información obtenida mediante DRM y los resultados existentes *in vivo* en este trabajo se estableció una metodología para el aislamiento de pelos radicales marcados con GM1-FI en *P.vulgaris*. El aislamiento de los pelos radicales mantiene la acumulación apical de los microdominios lipídicos previamente mostrada *in vivo*. En el presente estudio se aislaron DRM de *P.vulgaris* marcadas con GM1-FI, de manera que en las fracciones correspondientes a DRM obtenidas se encontró que la señal proveniente del marcador es más intensa. Estos resultados indican que GM1 fluorescente es un marcador específico de microdominios lipídicos y que los resultados obtenidos con este marcador son aplicables a estudios *in vivo* e *in vitro*.

Los microdominios membranales son agrupaciones entre lípidos de cadena saturada y esteroides que se comportan como entidades, a las cuales se les han atribuido una gran variedad de funciones en procesos de señalización (Simons and Ikonen, 1997). Los procesos de señalización con los cuales se asocian los microdominios membranales son variados y abarcan diversos tipos celulares. Los microdominios membranales en particular se han visto involucrados en el reclutamiento de componentes necesarios para la producción de ERO (Mongrand et al., 2004; Lefebvre et al., 2007; Liu et al., 2009) y en procesos asociados con la señalización dependiente de ERO (Mongrand et al., 2004; Liu et al., 2009). En células con crecimiento polarizado, como los tubos polínicos, la presencia de los microdominios lipídicos se ha descrito como un componente muy importante para la producción de ERO dependiente de NADPH-oxidasa (Liu et al., 2009).

Otros artículos señalan la producción de ERO como una respuesta indispensable para procesos de crecimiento apical (Cárdenas et al., 2006; Coelho et al., 2008).

Dado su papel en eventos necesarios para la señalización, los microdominios lipídicos podrían tener una función importante durante el crecimiento polar de los pelos radicales. El colesterol forma parte de los microdominios lipídicos y actualmente se puede usar colesterol obtenido de soya y que se acopla al fluoróforo NBD. Este colesterol fluorescente se ha utilizado previamente para determinar su enriquecimiento en los microdominios lipídicos y de manera significativa se logró determinar una acumulación de esteroles en la membrana plasmática apical de manera directa al ser marcados con NBD-colesterol e indirectamente al usar filipina. Cabe mencionar que es la primera vez que se implementa la incorporación de NBD-colesterol, mediante complejos con metil- β -ciclodextrina en células vegetales vivas y en células con crecimiento apical. En trabajos recientes realizados en tubo polínico, se ha mostrado que al remover el colesterol de membrana se abate la actividad de la NADPH-oxidasa (Liu *et al.*, 2009), la presencia de esteroides es una característica importante para la formación de los microdominios lipídicos. Estos resultados en conjunto apuntan a la existencia de microdominios membranales de plantas, ya que los esteroides son componentes indispensables de los microdominios lipídicos y posiblemente sean necesarios para que se lleven a cabo gran variedad de funciones en la célula.

En estudios previos se analizó la distribución de GM1 en bicapas y monocapas de mezclas terciarias de lípidos en las cuales se mimetiza la composición lipídica existente en membranas naturales, y sus resultados indican que GM1 está presente en los microdominios lipídicos (Yuan *et al.*, 2002). En este trabajo se muestra que GM1-FI se incorpora en pelos radicales de plantas y permite la visualización de microdominios membranales presentes en los pelos radicales y en células con crecimiento apical como las hifas (Figuras 8, 9 y 10). Se sabe que los glicosfingolípidos están enriquecidos en la membrana apical del epitelio polarizado (Simons and Ikonen, 1997), y se ha sugerido que por lo que la distribución encontrada para los pelos radicales e hifas de hongos corresponde con la que se ha descrito en membranas animales con crecimiento polarizado (Simons and van Meer, 1988). Si bien es cierto que el contenido lipídico es distinto en plantas y en células animales, y que no existen reportes de la

presencia de gangliósidos en plantas, el uso de GM1-FI como marcador de membrana resultó ser altamente eficiente en pelos radicales y en otras células con crecimiento polarizado (Figura 8, 9 y 10). Además, existen lípidos en plantas con estructura similar a GM1, en los que varía el grado de glicosilación y que han sido encontrados en microdominios lipídicos en plantas (GluCer;(Laloi *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 2008).

Laurdan es un compuesto fluorescente sensible al medio que lo rodea, y que se ha empleado como marcador de heterogeneidad de membrana y en particular se ha aprovechado como indicador de la presencia de microdominios membranales. Laurdan tiene una cadena alifática que interacciona con el centro hidrofóbico de la membrana por interacciones con la cadena hidrocarbonada, es por esto que la sensibilidad al ambiente de Laurdan es independiente del residuo polar o de la carga de los lípidos que lo rodean, y solo depende de la viscosidad del medio. En mezclas de lípidos tipo balsas lipídicas han encontrado que la longitud de onda en la cual emite Laurdan corresponde a 490nm, y es en esta longitud de onda donde se midió la emisión de Laurdan en los pelos radicales. Si bien la idea inicial era utilizar a Laurdan como un indicador de la heterogeneidad de membrana, su emisión en 430nm no se logró obtener debido a que en esa longitud de onda hay autofluorescencia proveniente de la planta. Sin embargo, la fluorescencia obtenida por Laurdan sirve según reportes previos como un indicador de microdominios lipídicos.

Dado que los marcadores específicos de microdominios membranales (GM1-FI, NBD-Colesterol, DHPE-Rh y Laurdan) se agrupan en la membrana apical de los pelos radicales, se puede inferir que los microdominios lipídicos se localizan en esta región particular en células con crecimiento polarizado. Por el contrario, los pelos radicales con crecimiento inhibido no muestran la localización apical de los microdominios lipídicos encontrada en los pelos radicales de frijol en crecimiento (Figura 11). Además, DHPE-Rh no puede unirse a la membrana cuando las células no se encuentran en crecimiento apical (datos no mostrados), por lo que la presencia de los microdominios lipídicos parecen ser un requerimiento para el mantenimiento del crecimiento apical. De manera interesante la acumulación de los microdominios lipídicos en la membrana plasmática apical, ha sido observada en hifas de *Candida albicans* (Martin and Konopka, 2004) y en tubos polínicos (Liu *et al.*, 2009). En estos trabajos se

propone de manera independiente que el crecimiento polar requiere de la acumulación de los microdominios lipídicos en el ápice de las células en crecimiento. Todos estos resultados indican que en la membrana plasmática apical existe una plataforma de señalización muy importante y que es necesaria para el crecimiento polarizado.

Por otra parte en trabajos anteriores no se cuestiona si la distribución apical de los microdominios lipídicos se debe a una acumulación de los marcadores fluorescentes empleados debido a la gran actividad existente en el ápice de las células con crecimiento polarizado. Por ello en el presente trabajo la acumulación apical de los marcadores fluorescentes específicos de microdominios lipídicos, se compara con la distribución de un marcador que se incorpora de manera homogénea en la membrana plasmática (FM@ 4-64). Sin embargo FM@ 4-64 tiene solamente una localización transitoria en la membrana plasmática. Esta señal transitoria se debe a que se acumula rápidamente en vesículas secretorias que tienden a acumularse en la región apical, y por lo tanto tiende a dar una señal apical transitoria, seguida de una endocitosis completa (datos no mostrados). Sin embargo esta señal apical no corresponde a la correspondiente a la membrana, sino a la acumulación de las vesículas secretorias en esta zona. De hecho se ha utilizado ampliamente como un trazador muy importante de endocitosis, tanto en células animales como vegetales. A pesar de esto, los resultados obtenidos nos sugieren que la acumulación diferencial de GM1-FI y FM@ 4-64, representa la capacidad de GM1-FI de unirse a una región membranal con propiedades particulares, las de un microdominio membranal.

Al igual que los lípidos de cadena saturada, los esteroides son un componente determinante en la formación de los microdominios membranales. Uno de los argumentos más fuertes para demostrar que los microdominios observados corresponden a microdominios reales, derivan de los experimentos con metil- β -ciclodextrina. La metil- β -ciclodextrina es una droga con una alta afinidad por esteroides, debido a esta afinidad se ha usado como un agente removedor de esteroides de membrana (Christian *et al.*, 1997; Giocondi *et al.*, 2004), como un indicador de la presencia de microdominios dependientes de esteroides y que además podría alterar la función de proteínas asociadas a los microdominios lipídicos (Lucero and Robbins, 2004). En los experimentos realizados en los pelos radicales de *P.vulgaris* previamente marcados con GM1-

Fl, se removieron los esteroides de membrana con metil- β -ciclodextrina; lo cual resultó en una desaparición rápida y completa de la señal fluorescente en la membrana apical. Además la inhibición del crecimiento que presentan los pelos radicales al ser tratados con metil- β -ciclodextrina (datos no mostrados), indica que el crecimiento polar en los pelos radicales es dependiente de la presencia de esteroides en la membrana plasmática. Por otro lado, estudios realizados en células de plantas muestran que el contenido de proteínas y lípidos presentes en DRM son alterados cuando se remueven los esteroides (Roche et al., 2008; Kierszniowska et al., 2009). Estos resultados indican que la acumulación apical de los microdominios lipídicos es dependiente de colesterol, y dado que al añadir metil- β -ciclodextrina se altera el crecimiento de los pelos radicales se puede inferir que estos microdominios lipídicos tienen una función importante en el crecimiento de los pelos radicales.

Asimismo, uno de los factores más importantes en el crecimiento celular es el mantenimiento del citoesqueleto, por lo cual se ahondó en el efecto que tiene el citoesqueleto de actina en la localización de los microdominios lipídicos. Estudios proteómicos muestran que las DRM están enriquecidas con proteínas del citoesqueleto, tales como actina, tubulina, miosina y supervillina (Mongrand et al., 2004; Chichili and Rodgers, 2007; Lefebvre et al., 2007), lo cual indica que hay una fuerte interacción entre el citoesqueleto de actina y los microdominios lipídicos. En el presente estudio esta interacción existente entre el citoesqueleto de actina y los microdominios lipídicos fue analizada desde un enfoque diferente, en el cual usando los marcadores específicos de los microdominios lipídicos se determinó el efecto morfológico que tienen los agentes que afectan el citoesqueleto de actina, como Jasplaquinolide y Latrunculina en los pelos radicales de *P.vulgaris* (Figuras 21 y 22). Del mismo modo, al alterar el citoesqueleto de actina la acumulación apical de los microdominios lipídicos se redistribuye de manera substancial (Figuras 25 y 26), lo que indica que la distribución de los microdominios lipídicos requiere de la participación del citoesqueleto de actina. La redistribución de la señal apical del marcador de membrana GM1-Fl en los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* tratados con Jasplaquinolide, permite deducir que hay una interacción entre el citoesqueleto de actina y los microdominios lipídicos. Más importante aun es que cuando se desorganiza el citoesqueleto de actina, se obtiene un efecto más drástico en la

acumulación apical de los microdominios lipídicos que el efecto descrito para metil- β -ciclodextrina. Estos resultados nos sugieren que la fina organización del citoesqueleto está de alguna manera regulando la distribución de los microdominios lipídicos.

CONCLUSIONES

La presencia de microdominios membranales en pelos radicales fue demostrada *in vivo* usando marcadores fluorescentes que son empleados por primera vez en plantas. Además, se muestra que GM1-FI puede ser empleado como un marcador específico de microdominios membranales en células con crecimiento polar.

Asimismo, la presencia de los microdominios membranales se refuerza con los datos obtenidos con metil- β -ciclodextrina. También, indica que los microdominios membranales requieren la presencia de esteroides; como se mostró usando metil- β -ciclodextrina y filipina.

Al mismo tiempo, se encontró que los pelos radicales en crecimiento requieren de la presencia de los microdominios membranales y que el citoesqueleto de actina se requiere para mantener una distribución apical de los microdominios de membrana.

Los resultados mostrados aquí sugieren que los microdominios de membrana juegan un papel importante en el crecimiento polar de las células y que su acumulación apical es necesaria para la célula.

PERSPECTIVAS

En el presente estudio se aporta evidencia que apoya la presencia de microdominios membranales en células con crecimiento apical. Por lo que estas herramientas podrían aplicarse a otras células con crecimiento apical como los conos neurales, los tubos polínicos, etc.

Se pueden emplear los marcadores de microdominios membranales descritos en este trabajo para estudiar la señalización mediada por especies reactivas de oxígeno, en especial la NADPH oxidasa que ha sido asociada a microdominios de membrana *in vitro*.

Analizar los cambios en las concentraciones de calcio en respuesta a agentes que remuevan esteroides de membrana, como metil- β -ciclodextrina o HDL (lipoproteína de alta densidad, por sus siglas en inglés).

Emplear proteínas asociadas a microdominios membranales acopladas a proteínas fluorescentes, para determinar su asociación con marcadores de microdominios membranales descritos en este estudio.

Describir el papel que tienen los microdominios membranales en la interacción simbiótica de *P.vulgaris* con *Rhizobium etli* y como la planta responde a los factores de nodulación que secreta la bacteria, utilizando las herramientas descritas en este estudio.

Extraer fracciones membranales de pelos radicales y analizar en contenido lipídico en las fracciones de membrana plasmática total y DRM. Además de hacer un estudio proteómico de las fracciones membranales.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson RG, Jacobson K** (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**: 1821-1825
- Bagnat M, Keranen S, Shevchenko A, Shevchenko A, Simons K** (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3254-3259
- Bhat RA, Panstruga R** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5-19
- Bohn M, Heinz E, Luthje S** (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays L.*) roots. *Arch Biochem Biophys* **387**: 35-40
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104-116
- Bouvrais H, Pott T, Bagatolli LA, Ipsen JH, Meleard P** Impact of membrane-anchored fluorescent probes on the mechanical properties of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*
- Buchanan G, Jones** (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. American Soc of Plant Biol
- Cárdenas L, Aleman E, Nava N, Santana O, Sanchez F, Quinto C** (2006) Early responses to Nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant. *Planta* **223**: 746-754
- Cárdenas L, Dominguez J, Quinto C, Lopez-Lara IM, Lugtenberg BJ, Spaik HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE** (1995) Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* **29**: 453-464
- Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Hepler PK** (2008) Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol* **146**: 1611-1621
- Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Hepler PK** (2005) Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**: 112-127
- Cárdenas L, McKenna ST, Kunkel JG, Hepler PK** (2006) NAD(P)H Oscillates in Pollen Tubes and Is Correlated with Tip Growth. *Plant Physiol* **142**: 1460-1468
- Caroni P** (2001) New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J* **20**: 4332-4336

- Coelho SM, Brownlee C, Bothwell JH** (2008) A tip-high, Ca²⁺-interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes. *Planta* **227**: 1037-1046
- Chichili GR, Rodgers W** (2007) Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **282**: 36682-36691
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH** (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* **38**: 2264-2272
- Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, Gratton E** (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* **80**: 1417-1428
- Giocondi MC, Milhiet PE, Dosset P, Le Grimellec C** (2004) Use of cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation. *Biophys J* **86**: 861-869
- Grennan AK** (2007) Lipid rafts in plants. *Plant Physiol* **143**: 1083-1085
- Heerklotz H** (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* **83**: 2693-2701
- Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG** (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**: 7-14
- Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX** (2009) Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**: 612-623
- Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M** (2003) Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13964-13969
- Lakowicz JR** (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. *In*, Ed third. springer, pp 1-26
- Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet M, Lessire R, Hartmann MA, Moreau P** (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol* **143**: 461-472
- Lefebvre B, Furt F, Hartmann MA, Michaelson LV, Carde JP, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule JJ, Mongrand S** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**: 402-418
- Liu P, Li RL, Zhang L, Wang QL, Niehaus K, Baluska F, Samaj J, Lin JX** (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J* **60**: 303-313

- Lucero HA, Robbins PW** (2004) Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* **426**: 208-224
- Maloof JN** (2004) Plant development: slowing root growth naturally. *Curr Biol* **14**: R395-396
- Martin SW, Konopka JB** (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 675-684
- Meiri KF** (2005) Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**: 1663-1672
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* **279**: 36277-36286
- Peskan T, Westermann M, Oelmuller R** (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur J Biochem* **267**: 6989-6995
- Pike LJ** (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**: 281-292
- Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet JM, Simon-Plas F** (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *Faseb J* **22**: 3980-3991
- Scheres PBA**LD (2002) The *Arabidopsis* Book. In CRSaEM Meyerowitz, ed, *Root Hairs: Cell Biology and Development*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD
- Simons K, Ikonen E** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572
- Simons K, van Meer G** (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochem* **27**: 6197-6202
- Singer SJ, Nicolson GL** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- Wan J, Torres M, Ganapathy A, Thelen J, DaGue BB, Mooney B, Xu D, Stacey G** (2005) Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 458-467
- Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C, London E** (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J Biol Chem* **276**: 33540-33546
- Xu X, London E** (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochem* **39**: 843-849

Yuan C, Furlong J, Burgos P, Johnston LJ (2002) The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J* **82**: 2526-2535

Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**: 913-916

Zeiger T (2002) Growth, Development, and Differentiation. *In* *Plant Physiology* Sinauer Associates, Sunderland, Mass, pp 354–355