



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE QUÍMICA

Proteínas Asociadas a Membranas
Resistentes a la Solubilización por
Detergente (DRM), de una Línea de
Arabidopsis thaliana con Inhibición en la
Síntesis de Esfingolípidos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA



MARÍA GUADALUPE PONCE LEYVA

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Homero Hernández y Montes
Vocal	Marina Gavilanes Ruíz
Secretario	José Ignacio Paramo Ramírez
1er suplente	Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2º suplente	Laura Carmona Salazar

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Lab.101, Depto. de Bioquímica, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM

Asesora Dra. Marina Gavilanes Ruíz.

_____.

Supervisora técnica M.C. Laura Carmona Salazar.

_____.

Sustentante María Guadalupe Ponce Leyva.

_____.

Agradecimientos.

Ma. Guadalupe Ponce Leyva, realizó esta tesis de licenciatura, gracias a una Beca de CONACYT por parte del Proyecto 55610.

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de los Proyectos PAPIIT DGAPA, UNAM IN207806 e IN 211409 y del proyecto de CONACYT 55610.

Agradecemos a la Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera de la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de de Medicina Genómica (INMEGEN) por la asesoría y supervisión dedicadas al análisis de proteínas de DRM en geles 2D-DIGE y por espectrometría de masas MALDI (TOF/MS).

Agradecemos al Dr. Edgar B. Cahoon, del Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, EU., por haber proporcionado las semillas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas Silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* para la realización de este trabajo de tesis.

Agradecemos al Dr. Santiago March Mifsut, Director de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por haber permitido el uso del equipo e instalaciones para el análisis de proteínas 2D-DIGE. y a Gutiérrez Nájera de la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Agradecemos al M. en C. Raúl Aguilar Caballero la asesoría y el uso del equipo PROTEAN IEFcell, del Laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Agradecemos a la M. en C. Laura Carmona Salazar, su asesoría y apoyo durante la realización de este trabajo de tesis.

Agradecemos la ayuda técnica de la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo, durante la realización de este trabajo de tesis.

Agradecemos la ayuda técnica de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Dedicatorias.

A Dios, gracias por haberme permitido llegar hasta este momento en mi vida.

A mi padre, J. Cristóbal Ponce E. †, a quien sin importar el tiempo transcurrido desde su partida, sigue presente cada día de mi vida, en cada pensamiento y en cada oración. Gracias por tu amor, por los cuidados y por tus enseñanzas que son la raíz de lo que hoy soy.

A mi madre, gracias por todo tu amor y apoyo incondicional, sobretodo en los momentos más difíciles; por darme la oportunidad de terminar esta etapa de mi vida.

A mi hermana, gracias por tu amor, apoyo y comprensión que me has brindado hasta ahora.

A mis Amigas Pilar Rodríguez, Elizabeth Cisneros, Diana Castellanos y Lizeth Meza; a mis Amigos Eduardo Hernández, Rubén Monsalvo, Mayell Soto, Rogelio Ibarra y Agustín Olmedo; quienes me han brindado amistad sincera y cariño incondicional.

A Juan J. Ponce M. y Aurora Sánchez, de quienes he recibido cariño y apoyo en todo momento, sobretodo a mí querida sobrina Ximena, quien con una sonrisa en su rostro, hace que un mal día se olvide en un instante.

A familiares y amigos, que han creído en mí y de quienes he recibido palabras de aliento para alcanzar mis metas.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado, por todas sus enseñanzas y consejos que recibí durante mi estancia en el laboratorio.

A Chelo, gracias por tu amistad y consejos que me brindaste durante este tiempo.

A mi adorada Universidad Nacional Autónoma de México, mil gracias por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella.

A mi querida Facultad de Química, gracias por la formación profesional que he recibido, por todas las experiencias que tuve durante mi estancia en ella.

INDICE.

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3-19
2.1. Membranas celulares	3
Estructura	3
2.2. Modelo del mosaico fluido	4
2.3. Componentes de la bicapa lipídica	5
2.3.1. Lípidos	5
2.3.2. Esfingolípidos	5
Esfingolípidos de plantas	8
Función de esfingolípidos en plantas	9
2.3.3. Esteroles	11
Funciones de los esteroles	12
2.3.4. Carbohidratos	12
2.3.5. Proteínas de membrana	13
Proteínas integrales	14
Proteínas periféricas	14
Función de proteínas membranales	15
2.4. Microdominios ó balsas lipídicas	16
Antecedentes inmediatos	19
3. HIPÓTESIS	20
4. Objetivo general	21
4.1. Objetivos particulares	21
5. Materiales y Métodos	22-45
5.1. Material biológico	22
5.2. Crecimiento de plantas de <i>A. thaliana</i>	22
5.3. Aislamiento de fracción microsomal a partir de hojas de <i>A. thaliana</i>	24

	Página
5.4. Obtención de Membranas Resistentes a Detergentes de <i>A. thaliana</i> .	25
5.5. Determinación de proteína	26
5.6. Análisis de proteínas	29
5.6.1. Separación de proteínas por enfoque isoelectrico (EIE) (1-D)	29
5.6.2. Separación de proteínas por peso molecular (2-D)	31
5.6.3. Tinción del gel con plata (método de Vorum)	34
Análisis de proteínas de DRM de las diferentes líneas de <i>A. thaliana</i> en geles 2-D con fluorescencia diferencial (DIGE)	36
5.6.4. Análisis de proteínas de DRM mayormente expresadas en la línea <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-TOF/MS).	42
6. RESULTADOS	46-83
6.1. Crecimiento de plantas de <i>A. thaliana</i> de las líneas <i>Silvestre</i> , <i>AtLcb2a-1</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> . Inducción del silenciamiento del gene de la SPT	46
6.2. Obtención de homogenados, fracciones microsomales y DRM de las líneas <i>Silvestre</i> , <i>AtLcb2a-1</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> , con y sin inductor MFZ	47
6.3. Análisis de Proteínas	52
6.3.1. Análisis de proteínas de homogenados y fracciones microsomales separadas por geles en una dimensión (peso molecular)	52
6.3.2. Separación de proteínas por enfoque isoelectrico 1-D y por peso molecular 2-D	54
6.3.3. Análisis de proteínas de DRM de <i>A. thaliana</i> de las líneas <i>Silvestre</i> , <i>AtLcb2a-1</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> , en geles 2D, con fluorescencia diferencial (2D-DIGE)	60

	Página
Registro coloreado de fluorescencia de las proteínas separadas bidimensionalmente (2D-DIGE)	66
Resultados de la identificación de las proteínas mayoritariamente representadas en las muestras de DRM de la línea AtLcb2b hp/AtLcb2a (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS)	77
7. DISCUSIÓN	84-95
8. CONCLUSIÓN	96
9. PERSPECTIVAS	98
10. BIBLIOGRAFÍA	99-104

ÍNDICE DE TABLAS.

Número de Tabla	Página
1. Proteínas identificadas en DRM de plantas.	18
2. Descripción de las líneas de plantas de <i>A.thaliana</i> , usadas en este trabajo, de acuerdo a los genes modificados y a su fenotipo	23
3. Composición de amortiguadores utilizados durante el aislamiento de fracciones subcelulares.	25
4. Composición del amortiguador de solubilización de proteínas para separarse por EIF.	29
5. Composición del amortiguador de equilibrio.	31
6. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS.	32
7. Estándares de peso molecular.	33
8. Composición del amortiguador de solubilización de proteínas para separarse por EIF (por Ettan DIGE).	36
9. Marcaje de proteínas con CyDyes.	38
10. Composición de geles de poliacrilamida de Laemmli.	41
11. Preparaciones subcelulares obtenidas de <i>A.thaliana</i> , líneas <i>Silvestre</i> , <i>AtLcb2a-1</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> , con y sin inductor	49-51
12. Resumen de rendimientos obtenidos en las fracciones subcelulares de Homogenado, Microsomas y DRM en hojas de <i>A. thaliana</i> con y sin inductor.	52
13. Condiciones de solubilización de las proteínas de las muestras membranales de microsomas.	57
14. Lista de proteínas detectadas en muestras analizadas por 2-D DIGE.	65

Número de Tabla	Página
15. Proteínas que presentaron variabilidad biológica significativa $p \leq 0.05$.	71
16. Equivalencia numérica de las líneas de <i>A. thaliana</i> en las Figuras 18 a 22 en el eje de las abscisas.	72
17. Proteínas que se expresan más en la línea <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> con inductor, en comparación con las demás líneas	76
18. Identificación de proteínas de DRM de la línea <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> (bajo inducción), por Espectrometría de Masas MALDI-ToF (MALDI-ToF/MS).	79-83
19. Rendimientos obtenidos en fracción microsomal y DRM reportados en la literatura	87

ÍNDICE DE FIGURAS.

Número y Nombre de Figuras	Página
1. Estructuras de algunas bases de cadena larga comunes en plantas (Lynch & Dunn, 2004).	7
2. Estructuras de esfingolípidos complejos encontrados en plantas (Lynch & Dunn, 2004).	10
3. Modelo de membrana plasmática.	13
4. Modelo de estructura de balsa lipídica.	17
5. Proceso de obtención de fracción microsomal de hojas de <i>A.thaliana</i> .	27
6. Obtención de membranas resistentes a detergentes (DRM) de <i>A. thaliana</i> .	28
7. Condiciones de corrida y gráfica de EIF (2D- DIGE).	40
8A. Esquema general del procedimiento de análisis de proteína 2D-DIGE.	42
8B. Localización de las 7 proteínas que se expresan mas en la línea <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> +MFZ en comparación con las demás muestras de DRMs	43
9. Proceso de obtención de plantas de <i>A. thaliana</i> ecotipo Silvestre (Col-0).	46
10.Fenotipo de las plantas de las líneas <i>Silvestre</i> , <i>AtLcb2a-1</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> , sin y con MFZ 6 días post inducción.	47
11.Separación de proteínas por peso molecular, de homogenados y microsomas de las líneas silvestre, <i>AtLcb2a-1</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> , con y sin inductor.	53
12.A Y B. Establecimiento de las condiciones de separación de proteínas membranales por pH isoelectrico y por peso molecular.	58,59

Número y Nombre de Figuras	Página
13. A, B y C. Separación de proteínas de DRM de <i>AtLcb2a-1</i> sin inductor y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> más inductor, <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> sin y con inductor y línea silvestre y <i>AtLcb2a-1</i> sin inductor, respectivamente en geles 2D-DIGE.	62,63,64
14. A, B y C. Imágenes coloridas de geles 2D-DIGE, correspondientes a las líneas <i>AtLcb2a-1</i> sin inductor y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> más inductor MFZ, <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> sin y con inductor MFZ y línea silvestre y <i>AtLcb2a-1</i> sin inductor, respectivamente.	66,67,68
15. Establecimiento del perfil de proteínas (matching) en geles de todas las líneas y con todas las condiciones probadas.	69
16. Análisis de comparación y cuantificación de manchas de proteínas equivalentes encontradas en los geles.	70
17. Ubicación de las proteínas con variación biológica significativa.	72
18. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en muestras de DRM de las líneas <i>AtLcb2a-1</i> más inductor MFZ y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> más inductor MFZ.	73
19. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en muestras de DRM de las líneas silvestre y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> más inductor.	74
20. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en muestras de DRM de las líneas <i>AtLcb2a-1</i> sin inductor y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> más inductor.	74
21. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en muestras de DRM de las líneas <i>AtLcb2a-1</i> -MFZ y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> +MFZ	75
22. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en muestras de DRM de las líneas <i>AtSilvestre</i> y <i>AtLcb2a-1</i> +MFZ.	75

I. RESUMEN.

Las membranas biológicas son bicapas de lípidos que actúan como una matriz en la cual se insertan proteínas. Recientemente se ha descrito que las membranas plasmáticas, si bien mantienen a sus componentes con la disposición de un mosaico fluido, contienen ciertas regiones que están enriquecidas en esfingolípidos y esteroides. Estas regiones se caracterizan por presentar una fase líquida ordenada, lo que corresponde a una zona rígida y altamente estructurada dentro de la misma matriz membranal (Edidin, 2001). Tales dominios lipídicos se han denominado balsas ó microdominios de lípidos y su existencia se ha asociado a su extractibilidad con detergentes como el Tritón X-100, el lubrol y el Brij; en los cuales estas regiones submembranales son insolubles y por lo cual se les ha llamado dominios resistentes a la solubilización por detergente (DRM). Se ha determinado que tales DRM concentran proteínas receptoras y moléculas que participan, no sólo en la recepción de las señales sino en los pasos subsecuentes, por lo cual se ha sugerido que la función de estas regiones es la de ser plataformas de detección y transmisión de estímulos hacia el interior celular (Xu et al., 2001).

En el laboratorio se dispone de unas líneas de *Arabidopsis thaliana* en la que puede inducirse una inhibición en la síntesis de esfingolípidos, gracias a un silenciamiento génico de la primera enzima de la síntesis de esfingolípidos, la serina palmitoiltransferasa o SPT. En este trabajo se estudia el perfil de proteínas de las DRM obtenidas de la línea con la SPT silenciada y se compara con el de las líneas control. El estudio incluyó el aislamiento de 17 fracciones microsomales de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana*, expuestas o no al inductor del silenciamiento de la SPT. De estas fracciones microsomales se obtuvieron los DRM en cada condición y en estas 17 fracciones de DRM se hizo la separación de proteínas. Para ello se usó el sistema bidimensional de separación electroforética de proteínas, primero de acuerdo a su pI y luego según su peso molecular, usando el sistema de marcaje diferencial de las proteínas con tres fluoróforos (Sistema Ettan DIGE, Amersham).

Una vez que las muestras de proteínas se separaron en duplicado, los patrones de expresión fueron analizados y se seleccionaron las proteínas que estaban más expresadas en la línea mutante silenciada que en todos los controles, llegando así a 7 proteínas. Las proteínas se analizaron posteriormente por espectrometría de masas para su identificación. Los resultados indican que los DRM de la línea deficiente de esfingolípidos reclutan selectivamente proteínas que no están presentes en las otras líneas, lo cual implica que la composición celular de esfingolípidos influye en el tipo de proteínas que pueden asociarse a las balsas lipídicas.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. MEMBRANAS CELULARES.

a) Estructura.

Las células están delimitadas por membranas biológicas, barreras que definen el interior y el exterior de una célula y que evitan la liberación selectiva al exterior de las moléculas generadas en el interior, así como permitiendo una entrada diferenciada de moléculas no deseadas. También los organelos están rodeados de membranas.

Las membranas difieren en estructura y en función, según el tipo celular y su localización subcelular, sin embargo, tienen en común algunas propiedades (Stryer, 2003; Luckey, 2008):

- Son estructuras laminares, compuestas por dos monocapas contrapuestas entre sí.
- Están constituidas por moléculas asociadas no covalentemente.
- Constan principalmente de lípidos, proteínas y carbohidratos; estos últimos están unidos a los lípidos y a las proteínas de manera covalente.
- Los lípidos membranales tienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, lo que las hace moléculas anfipáticas ó anfifílicas; por lo cual en un medio acuoso como el celular, forman láminas bimoleculares cerradas.
- Por su disposición en ambas monocapas, los lípidos, proteínas y carbohidratos hacen que las membranas sean asimétricas.
- Las proteínas membranales son mediadoras de funciones fundamentales.
- Son estructuras fluidas, se pueden considerar disoluciones bidimensionales de proteínas y lípidos orientados específicamente.
- La mayoría de las membranas están cargadas eléctricamente. Las cargas pueden estar dadas por los grupos cargados de lípidos, carbohidratos o proteínas. Adicionalmente, las membranas adquieren un potencial eléctrico transmembranal dado por los sistemas proteicos transportadores de iones, concediéndoles una carga positiva hacia el exterior y una carga negativa hacia el interior, en el caso particular de la membrana plasmática.

2.2. MODELO DEL MOSAICO FLUIDO.

La formación de membranas es una consecuencia de la naturaleza anfipática de las moléculas que la constituyen y del efecto hidrofóbico. Mientras las cabezas polares facilitan el contacto con el agua, las colas hidrocarbonadas interactúan entre sí excluyéndose del agua y asociándose entre sí de manera no covalente.

Las moléculas en medio acuoso se ordenan formando micelas, estructuras globulares en las que las cabezas polares están rodeadas de agua y las colas están secuestradas en el interior de modo que interactúan una con otra.

Otra forma de asociación de los lípidos es en bicapas compuestas por dos monocapas de lípidos anfipáticos, en donde las colas hidrocarbonadas de cada capa individual interactúan una con otra formando un interior hidrofóbico que actúa como barrera de permeabilidad a moléculas polares y/o cargadas.

La estructura más favorable para la mayoría de los glicerofosfolípidos y esfingolípidos en medios acuosos es la de la bicapa lipídica en vez de la micela.

La formación de la bicapa lipídica es un proceso de autoensamblaje ó autoasociación, en el que la formación de estas bicapas a partir de fosfolípidos es un proceso rápido y espontáneo en el agua, siendo las interacciones hidrofóbicas las principales fuerzas que determinan la formación de estas bicapas de lípidos; estas interacciones hidrofóbicas tienen tres consecuencias biológicas: las bicapas lipídicas tienen una tendencia inherente a extenderse y tienden a cerrarse con ellas mismas para evitar que existan cadenas hidrocarbonadas expuestas, de modo que se autosellan formando compartimentos, ya que una discontinuidad en una bicapa es desfavorable energéticamente.

Otra propiedad de los lípidos membranales es que también pueden formar vesículas lipídicas llamadas liposomas, las cuales se emplean para el estudio de la permeabilidad de la membrana o para liberar fármacos en las células (Holthuis y Levine, 2005).

Las membranas despliegan características que dependen de su estructura (Stryer, 2003):

- a. fluidez
- b. asimetría química y funcional

- c. especificidad proteica
- d. carga eléctrica
- e. permeabilidad selectiva.

2.3. COMPONENTES DE LA BICAPA LIPÍDICA.

2.3.1. LÍPIDOS.

Los ácidos grasos son componentes clave de los lípidos, siendo éstos los que les dan la propiedad de hidrofobicidad a los lípidos, además de desempeñar un papel importante en las vías transductoras de señales, cuando son liberados enzimáticamente y específicamente del glicerofosfolípido ó del esfingolípido correspondiente.

Los tres tipos principales de lípidos presentes en las membranas son los fosfoglicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides.

La composición de lípidos en la membrana plasmática de plantas es altamente variable. Muchas clases de estos lípidos son esteroides, los cuales constituyen de un 20 – 50 %, glicolípidos 5 – 40 % y fosfolípidos 10 – 60 %. En adición a esto, la composición lipídica puede variar con el tiempo y adaptación al medio ambiente (Larsson *et al.*, 2007).

2.3.2. ESFINGOLÍPIDOS.

Los esfingolípidos tienen dos funciones: la de conformar las bicapas lipídicas de las membranas junto con los glicerofosfolípidos y los esteroides y la de ser segundos mensajeros. En células vegetales, las evidencias experimentales directas que apoyan estas funciones son escasas y se han limitado a los siguientes casos: a) los esfingolípidos complejos como componentes típicos de dominios resistentes a la solubilización por detergente (DRM), sugiriendo su asociación a microdominios o balsas lipídicas, en la membrana plasmática (Mongrand *et al.*, 2006) y b) las bases de cadena larga esfingosina-1P y fitoesfingosina-1P que participan en la vía de transducción del cierre de los estomas (Hannun y Obeid, 2008) y en la muerte celular programada (Shi *et al.*, 2007).

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas complejas y con gran diversidad, cuyas estructuras van desde las más simples como las de las bases esfingoideas (figura 1), también llamadas bases de cadena larga (LCB), pasando por las de las ceramidas y llegando a las de los esfingolípidos complejos. Las LCB son cadenas hidrocarbonadas largas con una región polar en donde se encuentran substituyentes OH (en el C₁) y NH₃⁺ (en el C₂). Cuando al grupo amino de la base esfingoidea se acila un ácido graso mediante un enlace amida, se forma la ceramida. Las ceramidas se encuentran en pequeñas cantidades en los tejidos de plantas y animales, pero dan origen a los esfingolípidos más abundantes (Vázquez-Contreras, 2003). Tanto las LCB como los ácidos grasos varían en longitud, número y posición de insaturaciones e hidroxilaciones. Al OH del C₁ de las ceramidas se unen grupos polares tan diversos como carbohidratos o alcoholes fosforilados. (Kolter *et al.*, 2002).

Se han encontrado más de 300 diferentes tipos de esfingolípidos complejos en plantas. Se ha hecho necesario desarrollar un sistema de nomenclatura para esfingolípidos a fin de denominar cada una de las especies de una manera lógica de acuerdo a su estructura. Sin embargo, todavía hay una considerable variabilidad en los nombres que se utilizan para estos compuestos. Por ejemplo, esfingosina es todavía de uso común, aunque los nombres recomendados por la IUPAC son (E)-4-esfinganina o (2S, 3R, 4E)-2-aminooctadec-4-ene-1,3-diol (por su recomendación, dihidro-esfingosina es esfinganina. Fitoesfinganina, también llamada 4-hidroxisfinganina es (2S, 3S, 4R)-2-aminooctadecan-1, 3,4-triol; (Merrill Jr. y Sandhoff, 2002).

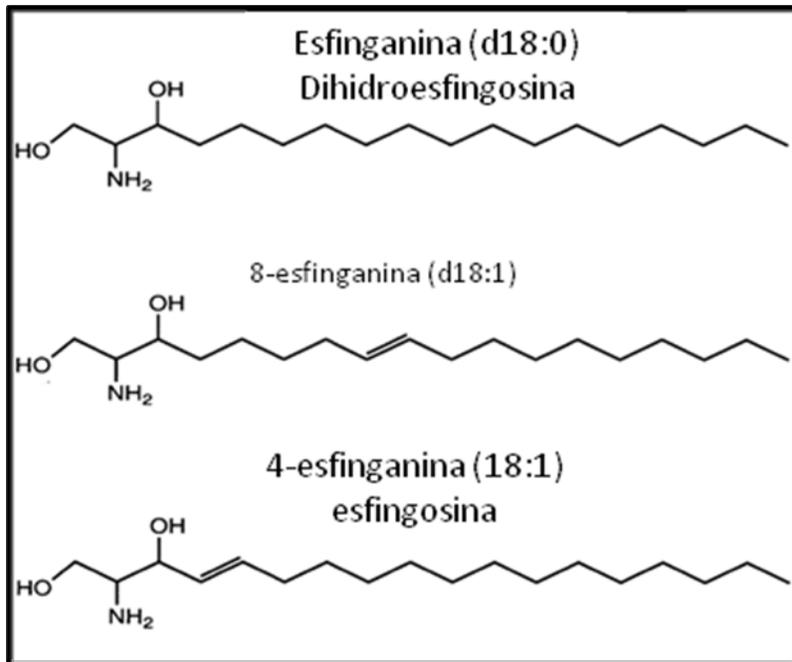


Figura 1. Estructuras de algunas bases de cadena largas comunes en plantas (Lynch y Dunn, 2004).

Los esfingolípidos son a menudo agrupados sobre la base de los grupos de la cabeza polar: en los fosoesfingolípidos y glicosfingolípidos, sin embargo, estas categorías no se excluyen mutuamente: los principales esfingolípidos de levadura son fosforilinositol ceramida. Los glicosfingolípidos se clasifican en grandes grupos sobre la base de la composición de hidratos de carbono. Los glicosfingolípidos neutros contienen azúcares, como glucosa (GLC), galactosa (Gal), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), y fucosa (Fuc). Los glicosfingolípidos ácidos contienen grupos funcionales ionizados, tales como fosfato, sulfato (sulfatoglicosfingolípidos), o con un azúcar, tales como residuos de ácido siálico en gangliósidos o ácido glucurónico en algunos vegetales (Merrill Jr. y Sandhoff, 2002).

Algunos glicosfingolípidos y esfingomielinas tienden a agruparse en la membrana (es común que los esfingolípidos tengan una fase de transición a temperaturas > 37° C), en lugar de comportarse como los lípidos de la fase desordenada de la bicapa lipídica de las membranas, que es una fase fluida y por tanto más homogénea.

Los esfingolípidos contribuyen a la estabilidad de otros tipos de estructuras biológicas, como los cuerpos laminares que mantienen la barrera de permeabilidad de

la piel y de las lipoproteínas. Sin embargo, no todos los esfingolípidos están ordenados y algunos como esfingosina-1-fosfato y esfingosilfosforilcolina, son lo suficientemente polares para existir en ambientes acuosos (Merril Jr, y Sandhoff, 2002).

Esfingolípidos de plantas.

La composición de los esfingolípidos en plantas es variable, incluyendo más de ocho diferentes bases esfingoideas C18 derivadas de D-eritroesfinganina. Debido a un nuevo C8 cis o trans insaturado predominan isómeros insaturados como la BCL (E/Z)-8-esfinganina (D 18: 1), (4E, 8E/Z)-esfinga-4,8-dienina (D 18:2) y (8E/Z)-4-hidroxi-8-esfinganina (t 18:1).

En *Arabidopsis thaliana*, la (8Z)-t18 es una de las BCL más abundantes en cerebrósidos recuperados de extractos lipídicos de hojas que se han sometido a hidrólisis alcalina directa. En la ceramida de los esfingolípidos de plantas hay más de 10 diferentes ácidos grasos que pueden ser *N*-acilados a 8 diferentes BCL. Estos ácidos grasos son de longitudes que van de los 14 a los 26 C, pueden contener insaturaciones e hidroxilaciones (figura 2). En algunas plantas, pueden ser detectados incluso hasta un 2-3% de ácidos grasos 2,3-dihidroxilados, lo cual sugiere la existencia de regiones no selectivas a la *N*-acilación por una α -hidroxilasa o por una C3-hidroxilasa (Sperling *et al.*, 2003).

Estudios en especies moleculares de residuos de ceramidas muestran que hay una enorme riqueza de estructuras de esfingolípidos complejos en plantas debido a todas las posibles combinaciones de BCL y ácidos grasos que ocurren en la naturaleza.

La biosíntesis de esfingolípidos comienza con la reacción de condensación de la acil Co-A y la *L*-serina para dar lugar a la 3-cetoesfinganina. Esta reacción es catalizada por la serina palmitoiltransferasa, que es una enzima con dos subunidades esenciales: la Lcb1 y la Lcb2; las cuales pueden ser funcionalmente perturbadas y expresarse en mutantes defectuosas en la actividad de esta enzima (Tamura *et al.*, 2001). En el segundo paso, la 3-cetoesfinganina es reducida con NADPH por la D-eritro-esfinganina:NADP⁺ 3-oxireductasa hasta esfinganina (D-eritro-2-amino-1,3-dihidroxicano). En el siguiente paso, el grupo amino de la esfinganina es acilado para obtener la ceramida (*N*-acilesfinganina) (Mandon *et al.*, 1992).

La Fumonisina B1 (FB1) es una toxina producida por *Fusarium verticillioides* y otras especies de *Fusarium*, las cuales son patógenas del maíz y de otras especies. La FB1 es un potente inhibidor de la esfinganina *N*-aciltransferasa (una enzima que se localiza en el retículo endoplásmico), lo que resulta en una inhibición de la biosíntesis de ceramida y en una acumulación de bases esfingoideas (Abbas *et al.*, 1994). Con ello, los niveles endógenos de lípidos complejos se ven disminuídos, mientras que sus precursores aumentan (Simons *et al.*, 1998).

Función de esfingolípidos en plantas.

Los esfingolípidos están involucrados en la señalización celular, estabilidad de la membrana, respuesta al estrés, patogénesis y apoptosis (Sperling *et al.*, 2003):

- a) Señalización celular. En *A. thaliana* la cadena de genes que codifica para una proteína, que *in vitro* acelera la transferencia de la (E)-esfing-4-enina entre membranas, lo cual causa la activación de la muerte celular y activación de los genes de respuesta de defensa. Se ha observado, que la inactivación de la SPT (Lcb2) en *A. thaliana*, indica que los esfingolípidos son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular y en el progreso del ciclo celular de la planta (Cheng *et al.*, 2001; Brodersen *et al.*, 2002).
- b) Estabilidad de la membrana. Los esfingolípidos tienen la tendencia de asociarse con esteroides, y forman grupos como balsas ó dominios, los cuales parecen ser importantes para funciones de señalización y en el tráfico celular. Además, también las pequeñas cantidades de ceramida libre estabilizan significativamente la formación de dominios, lo que sugiere que esta molécula de señalización se concentra en los esfingolípidos y esteroides de las balsas (Dobrowski, 2000; Simons y Toomre, 2000; van Meer y Lisman, 2002).
- c) Respuesta al estrés. Los esfingolípidos están implicados en la estabilidad de las membranas en plantas contribuyendo a la aclimatación a la sequia y resistencia al frío en plantas sometidas a enfriamiento. Se ha observado que la proporción de glucosilceramidas en membranas plasmáticas de plantas tolerantes al frío es más bajo que en las plantas sensibles al frío y que el contenido de

glucosilceramidas se reduce con la aclimatación al frío (Lynch, 1987; Norberg *et al.*, 1991; Uemura *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1997).

- d) Fitopatogénesis. Otra de las funciones de los esfingolípidos comprende la interacción planta–patógeno. Recientes estudios muestran que los cerebrósidos fúngicos funcionan como elicitores, causando la muerte de las células en sitios en contacto con el patógeno en la llamada Reacción de Hipersensibilidad, produciendo varias reacciones, entre ellas una acumulación de fitoalexinas, lo cual confiere mayor resistencia a las infecciones posteriores por patógenos en plantas (Koga *et al.*, 1998; Uemura *et al.*, 2000, 2002).
- e) Muerte celular programada. La evidencia de la participación de los esfingolípidos en la apoptosis en plantas proviene de estudios con micotoxinas análogas a la esfinganina (SAMs) como las fumonisinas. Las SAMs han demostrado inducir la necrosis, fragmentación del ADN y la acumulación de BCL libres en diferentes tejidos de la planta (Abbas *et al.*, 1994; Merrill Jr. *et al.*, 1996; Gilchrist, 1997; Minorsky, 2002).

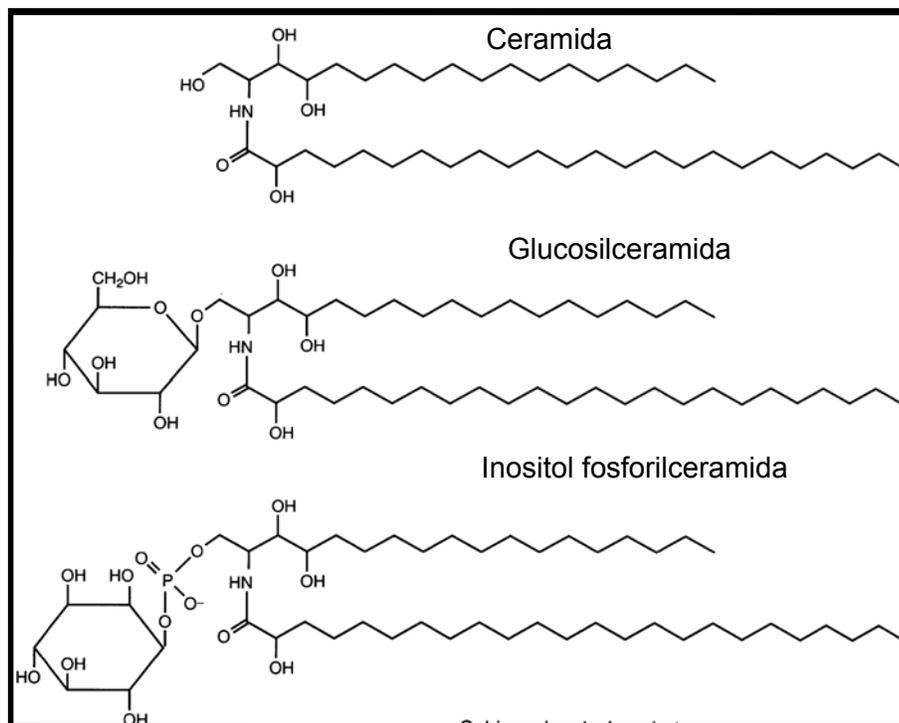


Figura 2. Estructuras de esfingolípidos complejos encontrados en plantas (Lynch y Dunn, 2004).

2.3.2. ESTEROLES.

Esterol fue el nombre originalmente propuesto para describir a un grupo 3 β -monohidroxilo, ligado a un sistema de anillos perhidro-1,2-ciclopentano fenantreno, con una sustitución metilo en el C10 Y C13. La nomenclatura de esteroides es larga si nos basamos en las recomendaciones de la IUPAC-IUB de 1989. Los esteroides son parte de una vasta familia de isoprenoides, los cuales muestran una gran complejidad química y una marcada diversidad y función en organismos vivos. Las variaciones estructurales surgen de las diferentes sustituciones en la cadena, así como en número y posición del doble enlace en el esqueleto tetracíclico (Hartmann, 1998).

El sitosterol, campesterol y estigmasterol son los esteroides más abundantes en las membranas de plantas, pero otros esteroides pueden predominar en ciertas especies, como es el espinasterol en espinaca y el cicloartenol en avena (Larsson *et al.*, 2007).

Los esteroides son biosintetizados por la vía citosólica del mevalonato y por la vía plasmática del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Se ha mostrado que la estructura esteroidea es biosintetizada en 11 pasos por la acetil-Co A (Suzuki y Muranaka, 2007).

Aunque la ruta de biosíntesis de esteroides en plantas es similar a la de los vertebrados, en la síntesis de esteroides en plantas se han encontrado características particulares. Los 12 tipos de enzimas que catalizan estos pasos de síntesis son codificadas por 24 genes en plantas de *Arabidopsis thaliana*, las cuales a veces tienen varios genes para un paso como en los casos de las enzimas: acetoacetil-CoA tiolasa (AACT), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), mevalonato-difosfato decarboxilasa (MVD), isopentenil-difosfato isomerasa (IPI), farnesil-difosfato sintasa (FPS), escualeno sintasa (SQS) y escualeno epoxidasa (SQE). Ésta es la mayor diferencia en la biosíntesis de esteroides entre plantas y vertebrados como los mamíferos, que generalmente tienen un sólo gen para cada paso enzimático (Suzuki y Muranaka, 2007).

La síntesis de esteroides se lleva a cabo en el retículo endoplasmático y su acumulación en la membrana plasmática, lo cual implica transporte entre estos dos compartimentos membranales (Hartmann, 1998). Usualmente los esteroides de plantas aparecen como esteroides libres, como ésteres de esteroides y particularmente como

esteroles glicosilados acilados. La glicosilación del esteroles ocurre en la membrana plasmática y es catalizada por la enzima esteroles glicosiltransferasa, que utiliza glucosa-uridin-difosfato (Larsson *et al.*, 2007).

Funciones de los esteroides.

Las moléculas de esteroides son incorporadas a las membranas a través de los grupos 3 β -hidroxilo, en donde el sustituyente OH del C3 se orienta hacia la interface acuosa, mientras que los anillos se extienden paralelamente a las cadenas de los ácidos grasos y las LCB's y la cadena alifática sustituyente del C se extiende hasta el centro hidrofóbico de la bicapa. Los esteroides modulan el estado físico de las bicapas restringiendo la movilidad de los ácidos grasos, mismas que a temperatura fisiológica se encuentran en una fase líquida cristalina. El sitosterol y el 24-metil-colesterol son los esteroides más eficientes para restringir la movilidad de los fosfoglicelolípidos (Moreau, 1998).

Una de las funciones más importantes de los esteroides en plantas además de contribuir al control de la fluidez de las membranas es su asociación con los esfingolípidos para formar las llamadas balsas de lípidos (Hartman, 1998).

Los esteroides son fundamentales en la conformación de las membranas, como lo demuestra el hecho de que la activación de la síntesis de esteroides se produce después de la germinación de la semilla para satisfacer las necesidades de nuevas membranas, generando un aumento de la concentración de esteroides libres. La tasa de síntesis de esteroides gradualmente disminuye con la madurez de la semilla (Hartmann, 1998).

2.3.4. CARBOHIDRATOS.

Los carbohidratos no se encuentran en forma libre en las membranas de plantas, sino que se encuentran unidos a las partes hidrofílicas de proteínas y de lípidos membranales. Hay oligosacáridos unidos a las proteínas integrales de membrana y a muchas proteínas de secreción; muchas proteínas de membrana contienen unidas covalentemente unidades de azúcares o de oligosacáridos en su superficie extracelular.

La diversidad y complejidad de las uniones de azúcares de las glicoproteínas sugiere que son ricas en información y resultan funcionalmente importantes, éstas contienen cinco tipos diferentes de residuos, unidos por muchas clases de enlaces glicosídicos (Stryer, 1993; Luckey, 2008). Algunos se hallan asociados mediante enlaces covalentes (glicosídicos) a lípidos llamados glicolípidos y se dividen en dos grupos: los que contienen acilgliceroles y en los que contienen ceramida, generalmente forman parte importante del ambiente de la matriz extracelular de la membrana plasmática (Stryer, 1993).

2.3.5. PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

Las proteínas de las membranas son las responsables de la mayoría de los procesos dinámicos llevados a cabo por la membrana. Por lo tanto, proteínas específicas hacen de mediadoras del resto de funciones propias de la membrana. Las proteínas se encargan de transferir compuestos e información a través de la membrana y los lípidos se encargan de crear un ambiente adecuado para ello, si bien los lípidos también pueden participar activamente como transmisores de información (moléculas señal) (Cooke *et al.*, 1992).

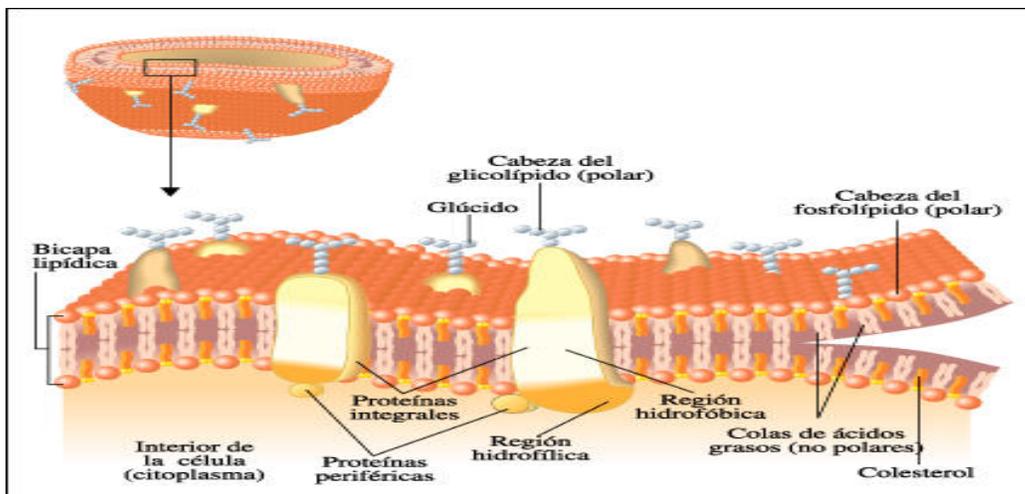


Figura 3. Modelo de la membrana plasmática. Se observan las proteínas periféricas y las integrales.

Hay un número extenso de proteínas en una misma membrana. Si bien sus estructuras y funciones son diversas, todas caen en uno de dos tipos de proteínas membranales: integrales y periféricas (figura 3). Ambas difieren por su grado de interacción con la matriz lipídica.

PROTEÍNAS INTEGRALES.

Una proteína integral de membrana es aquella que se halla embebida en la bicapa lipídica, y por tanto su separación implica la destrucción de la estructura de membrana. Es necesario para ello el uso de detergentes iónicos fuertes como el SDS o no iónicos como Tritón X-100 o disolventes apolares.

La estructura de la mayoría de las proteínas integrales comprende tres diferentes dominios, dos hidrofílicos y uno hidrofóbico. El dominio hidrofílico (formado por aminoácidos hidrofílicos) generalmente contiene el N-terminal, el dominio hidrofóbico contiene de 20 - 30 aminoácidos (con cadenas laterales hidrofóbicas), que son los necesarios para atravesar la membrana. El dominio hidrofílico generalmente contiene el C-terminal que protruye al citoplasma (Cooper, 1997). Las proteínas integrales pueden tener estructura cuaternaria, es decir pueden tener dos o más cadenas polipeptídicas.

Algunas proteínas transmembranales son glicoproteínas, es decir que poseen cadenas de azúcares unidas covalentemente al dominio hidrofílico proteico que se expone al medio externo. Una típica célula de mamífero puede tener cientos de glicoproteínas en su membrana plasmática, cuyo dominio extracelular glicosilado une al carbohidrato, generalmente al aminoácido asparagina. Los residuos de sacáridos forman cadenas con ramificaciones complejas de una o más cadenas glicosídicas (Alberts *et al.*, 2004).

PROTEÍNAS PERIFÉRICAS.

Una proteína periférica es aquella proteína de membrana que se encuentra asociada a la bicapa mediante uniones no covalentes (enlaces de fuerzas electrostáticas) de forma que es fácil separarla de la membrana mediante solubilización con un medio con alta concentración de sal (0,3 M KCl). Las proteínas periféricas se

encuentran tanto en el dominio extracelular de la membrana como en el dominio citosólico, aunque mayoritariamente en este último. La superficie de las proteínas periféricas está compuesta en su mayor parte de aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas (Boos *et al.*, 1995). En la unión de estas proteínas a la membrana no intervienen sin embargo fuerzas hidrófobas. En general las proteínas periféricas de membrana son globulares e hidrofílicas, ya que al estar en la “periferia” de la membrana están expuestas o bien al medio acuoso citosólico o al extracitosólico.

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MEMBRANALES.

Las proteínas membranales pueden desempeñar varias funciones en las células. Se pueden agrupar en varias clases cuyos mecanismos de funcionamiento son específicos ya que la estructura de cada una de ellas determina la manera en que lleva a cabo su función (White, 1995).

Proteínas de transporte.

- a) **Canales:** proteínas integrales que actúan como poros por los que determinadas sustancias o iones pueden entrar o salir de la célula con una selectividad relativa y menor a la de las proteínas acarreadoras, pero una gran velocidad.
- b) **Transportadores o acarreadores o translocadores:** son proteínas que sufren cambios conformacionales para transportar a solutos con muy alta especificidad.
- c) **Bombas:** proteínas que transportan solutos de un lado al otro de la membrana con un gasto energético de hidrólisis de ATP.

Proteínas de reconocimiento.

- a) **Receptores:** Son proteínas integrales que reconocen determinadas moléculas a las que se unen o fijan (ligandos). Frecuentemente son glicoproteínas, estas proteínas pueden identificar una hormona, un neurotransmisor o un nutriente que sea importante para la función celular.
- b) **Proteínas de anclaje del citoesqueleto:** Son proteínas periféricas que se encuentran en la monocapa membranal del citosol y que sirven para fijar los filamentos del citoesqueleto.
- c) **Proteínas específicas de tipos celulares:** Son glicoproteínas y glicolípidos característicos de cada individuo y que permiten identificar a otras células. Al

estar hacia el exterior celular, las cadenas de carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos forma una especie de cubierta denominada matriz extracelular.

Proteínas con función catalítica.

- a) **Enzimas:** Pueden ser integrales o periféricas y sirven para catalizar reacciones desde su ubicación membranal. Algunas de ellas tienen funciones mixtas como la de ser enzimas y receptores o el de ser enzimas y transportadores.

2.4. MICRODOMINIOS O BALSAS LÍPIDICAS.

Desde 1972 se pensaba que en las membranas plasmáticas, los fosfolípidos y las proteínas de membrana estaban ubicuamente distribuidas de acuerdo a un modelo de mosaico fluido (Singer, 1972), pero en 1988 Simons y van Meer sugirieron una idea novedosa, en el sentido de que existen microdominios que están enriquecidos en algunos tipos de lípidos como esteroides, glicolípidos y esfingolípidos; a estas regiones de las membranas se les denominaron balsas lipídicas (Simons e Ikonen, 1997). Ellos propusieron que a estas regiones o dominios se asocian de manera específica proteínas que tienen función en la recepción y transmisión de estímulos extracelulares como factores de crecimiento, receptores, transportadores y otras proteínas, además de proteínas ancladas como las proteínas GPI ancladas a glicosilfosfatilinositol (Borner *et al.*, 2005).

Se han desarrollado formas de estudiar a las balsas lipídicas, la mayoría están basadas en métodos espectroscópicos o de fluorescencia. La única forma de abordar bioquímicamente el estudio de balsas lipídicas es el aislamiento de membranas resistentes a la solubilización con detergente (DRM). Para ello se han usado detergentes no-iónicos, como el Tritón X-100 o Brij-98 a bajas temperaturas (4°C). Cuando estos detergentes se añaden a las células, la fase desordenada de membrana (fase fluida o fase LD) se disuelve, en tanto que los componentes de las balsas lipídicas pueden ser extraídos en forma conjunta, debido a la estructura química de sus componentes y a las propiedades derivadas de ésta (Dietrich, 1999).

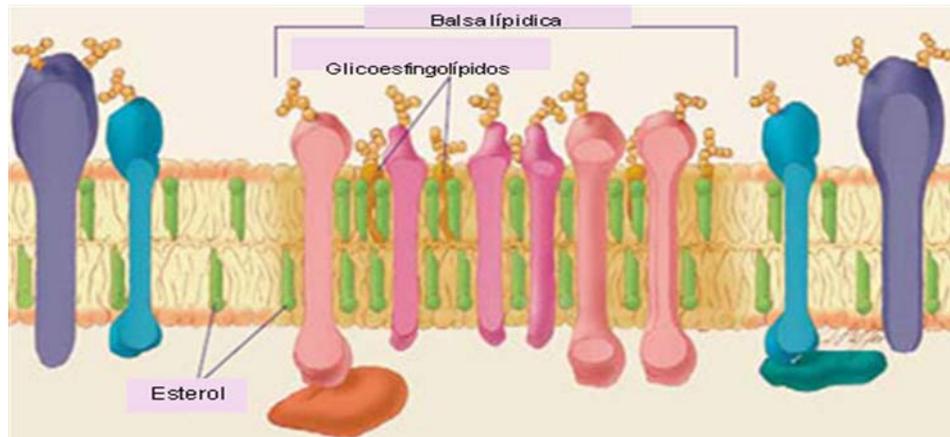


Figura 4. Modelo de estructura de balsa lipídica.

Debido a esta característica de insolubilización a detergentes se ha podido investigar la composición de las proteínas en balsas lipídicas. Se ha observado que ciertas proteínas relacionadas con los procesos de señalización celular están asociadas a estas regiones en células de levadura y mamíferos (Brown, 1992). En este tipo se incluyen las proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), las cinasas de tirosina doblemente aciladas de la familia Src y las proteínas transmembranales (figura 4). Mientras que estas proteínas tienden a estar continuamente presentes en las balsas lipídicas, hay otras que se asocian con ellas sólo cuando estas proteínas están activadas (Petrie *et al.*, 2000). Muchas evidencias indican que los microdominios membranales juegan un papel importante en diversos procesos biológicos, incluyendo numerosas vías de transducción de señales, apoptosis, adhesión celular y migración, transmisión sináptica, organización del citoesqueleto y en la clasificación proteica durante la exocitosis y la endocitosis (Edidin *et al.*, 2003).

Tabla I. Proteínas identificadas en DRMs de plantas. Se enlistan algunos de los ejemplos reportados en los trabajos de Mongrand *et al.*, (2004), Borner *et al.*, (2005), Morel *et al.*, (2006); Lefebvre *et al.*, (2007). En paréntesis se indican las especies, en las que fueron identificadas las proteínas: *Arabidopsis thaliana* (At), *Oriza sativa* (Os), *Medicago truncatula* (Mt), *Nicotiana tabacum* (Nt).

Categorías de proteínas de acuerdo a su función	Proteínas identificadas
Proteínas de transporte	ATPasa de H ⁺ (At, Nt, Mt) Proteína putativa de respuesta hipersensible (Os, At) Canales de agua, acuaporinas (tipos PIPs) (Mt, At) Transportadores ABC (Os, At, Mt) Proteína transportadora de fosfato (Nt, Mt) Proteína 14-3-3 (Nt, At, Mt) Flotilinas (At, Mt, Nt)
Proteínas de señalización y de respuesta a estrés.	Proteínas cinasas (Os, At) Proteína cinasa dependiente de calcio (Nt, At) Proteína cinasa RKL 1 ligada a receptor (At, Nt) NADPH oxidasa (At, Nt) Remorinas (At, Nt, Mt) RLKs (Mt) COBRA anclada a GPI (At, Nt, Mt)
Proteínas relacionadas con tráfico intracelular	Sintaxinas (At, Nt) Caveolinas (Nt, Mt)
Proteínas relacionadas con estabilidad membranar	Proteína putativa glucan sintasa (At) Pectinesterasa (At) Ubiquitina (At, Nt)
Proteínas relacionadas con reacciones Redox	NADH-Ubiquinona oxidoreductasa (Mt) Peroxidasas (Mt) Oxidoreductasas (Mt)
Proteínas de acción metabólica	Proteína SKSI ligada a monocobre oxidasa (Nt, At) 1,4-Benzoquinona reductasa (At, Nt, Mt) Fosfoglicerato cinasa (Os)

Los microdominios membranales también se han descrito como sitios de entrada de patógenos y toxinas microbianas en sistemas de mamíferos (van der Goot y Harder, 2001). En plantas, los análisis más extensos de las proteínas encontradas en DRMs han sido realizados en *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2005), si bien también se han reportado en tabaco (Morel *et al.*, 2006), arroz (Borner *et al.*, 2005) y *Medicago truncatula* (Lefebvre *et al.*, 2007). Las proteínas encontradas son muy diversas y se han agrupado por su función en varias categorías: proteínas de transporte, de

señalización, de tráfico celular y un grupo que incluye varios tipos de proteínas (Tabla I). Algunos ejemplos de estas proteínas son remorinas, cinasas, NADPH oxidasa, que son proteínas involucradas en reacciones de defensa contra patógenos; dentro de las proteínas involucradas en el tráfico vesicular encontramos a la sintaxina y caveolinas. Con respecto a proteínas implicadas en crecimiento celular se encuentra la ATPasa de H^+ , la proteína 14-3-3 (Lafebvre, *et al.*, 2007).

ANTECEDENTES

Además de la información contenida en la introducción, este trabajo tiene antecedentes experimentales obtenidos en el laboratorio y que son los siguientes:

- a) Las membranas de embriones de maíz expuestos a la fumonisina B1 (FB1), un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos, presentaron un perfil de proteínas fosforiladas diferente al del control, sugiriendo que hay actividades de cinasas membranales que se modulan diferencialmente según los niveles de esfingolípidos membranales y que por tanto las proteínas membranales pueden cambiar su actividad dependiendo del entorno lipídico (Carmona, 2003).
- b) Las membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRMs), presentaron cambios en la ultraestructura en embriones de maíz y hojas de frijol expuestos a la FB1.
- c) Las membranas plasmáticas de embriones de maíz expuestos a la FB1 presentaron una actividad de ATPasa de H^+ disminuída en comparación con la enzima de plantas controles (Gutiérrez, 2005; Vázquez, 2007).
- d) Las membranas plasmáticas deficientes en esfingolípidos complejos obtenidas de la línea mutante (*Atlcb2b hp/Atlcb2a*) presentaron una actividad de ATPasa de H^+ aumentada en comparación con la enzima de plantas controles (Vázquez, 2009, no publicado).

Todos estos trabajos hechos en nuestro laboratorio indican que los esfingolípidos participan de forma importante en la actividad y la incorporación de proteínas en la membrana plasmática. Además, el hecho de que en la membrana plasmática existan microdominios enriquecidos en esfingolípidos y esteroides, sugiere que los esfingolípidos también pueden ser determinantes en la selección de proteínas residentes en estos dominios.

3. HIPÓTESIS

La modificación en los niveles celulares de esfingolípidos, altera el perfil de proteínas de las membranas celulares y por tanto es posible que en las membranas resistentes a la solubilización por detergentes (DRM) haya proteínas cuya abundancia aumente y otras que disminuya.

4. OBJETIVO GENERAL.

Establecer el perfil electroforético de las proteínas de preparaciones de DRM que han sido aisladas de microsomas de una línea que expresa un nivel reducido de esfingolípidos complejos y compararlas con preparaciones control para conocer si hay proteínas cuya abundancia aumenta o disminuye en términos de los niveles de esfingolípidos presentes en las membranas.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Aislar membranas microsomales de las plantas control de *Arabidopsis thaliana* (genotipo silvestre Col-0, línea *Lcb2a-1* expuesta al inductor y línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* sin exposición al inductor) y de la línea de *Arabidopsis thaliana* con niveles disminuidos de esfingolípidos complejos (*AtLcb2b hp/AtLcb2a* expuesta al inductor).
- Aislar membranas resistentes a la solubilización por detergentes (DRM) a partir de membranas microsomales de las plantas control de *Arabidopsis thaliana* (genotipo silvestre Col-0, línea *Lcb2a-1* expuesta al inductor y línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* sin exposición al inductor) y de la línea de *Arabidopsis thaliana* con niveles disminuidos de esfingolípidos complejos (*AtLcb2b hp/AtLcb2a* expuesta al inductor).
- Determinar el perfil proteico de las DRM de las plantas control de *Arabidopsis thaliana* (genotipo silvestre Col-0, línea *Lcb2a-1* expuesta al inductor y línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* sin exposición al inductor) y de la línea de *Arabidopsis thaliana* con niveles disminuidos de esfingolípidos complejos (*AtLcb2b hp/AtLcb2a* expuesta al inductor).

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Material biológico.

Se utilizaron líneas de *Arabidopsis thaliana* de 2 meses de edad, ya que en este periodo de tiempo la planta presenta su ciclo de vida completo y las plantas se pueden cosechar en estado adulto proporcionando más material. El genoma de esta planta ya está secuenciado y por lo tanto se sabe que gen codifica para cada proteína. Se trabajó con la línea de *Arabidopsis thaliana AtLcb2a-1* como control y en la que el gene de la subunidad Lcb2a presenta una mutación por inserción. Sobre esta línea, se hizo una construcción de una asa de RNA que permitió que además del defecto en el gene *lcb2a*, el gene de la subunidad LCB2b no se expresara (silenciamiento génico). Esta línea corresponde a la línea *AtLcb2b-hp/At Lcb2a*) que resulta defectuosa en la síntesis de esfingolípidos una vez que el silenciamiento de la Serina-PalmitoilTransferasa (SPT), se induce por la adición del insecticida Intrepid, cuyo ingrediente activo y que funciona como inductor del silenciamiento es la metoxifenazida. Ambas líneas fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, EU.) (Tabla 2).

5.2. Crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

- a) Las semillas se colocaron en un tubo eppendorf y se le agregó 1 ml de NaHClO₄ al 20% estéril y 1 µl de Tween 20 (cf. 0.1%). Se agitó vigorosamente durante 20 min.
- b) El tubo con las semillas se centrifugaron por aproximadamente 10 seg en una minifuga y se eliminó el sobrenadante con micropipeta.
- c) Se volvieron a lavar las semillas con NaHClO₄ al 20% y se agitó durante 10 min.
- d) Se repitió el paso b.
- e) Las semillas se enjuagaron varias veces (aproximadamente 5 veces), cada una con 1 ml de agua estéril y con agitación durante 30 seg hasta eliminar

completamente el NaHClO₄ y el Tween 20. Cada vez se centrifugó en la minifuga por 10 seg y se eliminó el sobrenadante con micropipeta. Después del último lavado se le agregó 1ml de agua estéril.

- f) Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri conteniendo el medio Gamborg's B-5, agar al 1%, sacarosa al 1% estéril.
- g) Las cajas con las semillas sembradas se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron por 48 h a 4°C. Posteriormente, se pasaron a la cámara de incubación a 22°C con un fotoperiodo de 16 h oscuridad / 8 h de luz.
- h) Después de dos semanas, las plántulas se trasplantaron a macetas con una mezcla de sustratos (1 ½ parte de Mix 4 Aggregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), ½ parte de vermiculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticultura; Canada Ltd.) y ½ parte de agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo. de México) humedecido con agua estéril.

Tabla 2. Descripción de las líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* usadas en este trabajo, de acuerdo a los genes modificados y a su fenotipo.

Nombre de la línea	Gene modificado	Fenotipo
<i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre (ecotipo Col-0)	Ninguno	Silvestre, crecimiento, desarrollo y reproducción normales. Niveles normales de esfingolípidos.
<i>Atlcb2a-1</i>	<i>LCB2A</i> de la subunidad <i>LCB2</i> correspondiente de la serina palmitoiltransferasa.	Silvestre, crecimiento, desarrollo y reproducción normales. Niveles normales de esfingolípidos
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	<i>LCB2A</i> de la subunidad correspondiente de la serina palmitoiltransferasa. Contiene la construcción de un asa de RNA que es inducida para silenciar el gene <i>LCB2B</i> (el otro gene de la subunidad 2 de la serina palmitoiltransferasa) por adición del insecticida Intrepid-2, cuyo ingrediente activo es la metoxifenoazida (MFZ)	Silvestre, crecimiento, desarrollo y reproducción normales. Niveles normales de esfingolípidos en ausencia del inductor (MFZ). Una vez que el inductor es añadido, los niveles de esfingolípidos de la planta decaen un 36 % a los 6 días después de la inducción (6dpi) (Dietrich <i>et al.</i> 2008). A este tiempo, las plantas muestran un fenotipo de manchas cloróticas en hojas.

Se crecieron en invernadero con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Cuando las plantas alcanzaron la edad y tamaño deseado (al cabo de dos meses y medio, aproximadamente), se procedió a cosechar las hojas, cortando con tijeras toda el área foliar que incluía tanto hojas jóvenes como adultas, pero no tallos ni raíces. Se congelaron con N₂ líquido inmediatamente después de cortarlas. Se almacenaron a -70°C hasta su uso para aislar fracciones microsomales.

5.3. Aislamiento de fracción microsomal a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Se realizó la obtención de la fracción microsomal (Packer y Douce, 1987) a partir de las hojas de *Arabidopsis thaliana* congeladas, (Fig. 5) Las cuales se pesaron y con base en el peso de las hojas se añadió 3 veces el volumen de buffer de homogenización (1 gramo de peso de hojas congeladas por 3 vol de buffer) y se procedió a moler en homogenizador eléctrico. El homogenizado se filtró a través de 4 capas de gasa previamente humedecida con agua destilada, se distribuyó el homogenado en tubos y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min a 4°C, en centrífuga JOUAN MR, utilizando el rotor Nalgene para tubos de 50 ml de capacidad. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se distribuyó en tubos de policarbonato (No. Cat. 355654), para Ultracentrífuga Beckman XL 100K y se utilizó el rotor 60 Ti (no. Serie 1697), se centrifugó a 45 000 rpm durante 1 h 30 min, a 4°C. Terminado el tiempo de centrifugación, se eliminó el sobrenadante, el botón se resuspendió en amortiguador TNE y se hizo el registro del volumen final de fracción microsomal obtenida, determinándose la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (1977). Se alicuotó en tubos eppendorff, se congeló con N₂ líquido y se guardó a -70°C hasta su uso.

Las soluciones empleadas para la obtención de fracciones subcelulares de hojas de *Arabidopsis thaliana* se muestra a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Composición de amortiguadores utilizados durante el aislamiento de fracciones subcelulares.

Amortiguador	Composición de la solución.
De homogenización.	Sorbitol 620 mM, HEPES 50 mM pH 7.8, β _mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, KCl 1 mM, BSA 0.2%, DTT 1 mM, PVP 0.6%, Cocktail de inhibidores de proteasas
De resuspensión del botón microsomal.	Amortiguador TNE: NaCl 150 Mm, Tris/HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 5 mM pH 7.8, y cocktail de inhibidores (casero).

Para la preparación de los diferentes amortiguadores se usaron las siguientes soluciones concentradas:

- a) HEPES 500 mM
- b) DTT 300 mM
- c) KCl 50 mM
- d) EDTA 100 mM pH 7.8, ajustar con KOH.

5.4. Obtención de Membranas Resistentes a Detergentes (DRM) de *Arabidopsis thaliana*

La fracción de DRMs se obtuvo a partir de la fracción microsomal obtenida (Fig. 5). Una vez conociendo la concentración de proteína de la fracción microsomal se procedió a realizar el cálculo para saber el volumen necesario para tener 500 μ g de proteína de fracción microsomal. En un tubo de policarbonato Beckman de 3.5 ml (No. Cat. 349622) para rotor SW 50.1, se añadió el vol. correspondiente a 500 μ g de

proteína microsomal que estaba en TNE y se agregó el volumen necesario de amortiguador TNE para completar un volumen final de 315 μ l. A lo anterior, se añadieron 35 μ l de Tritón X-100 al 10%, (CAS 9002-93-1; No. Producto 28314. Pierce and brand of qb Perbio, es una Marca Registrada de Rohm and Haas; Rockford, IL, USA.), la suspensión se mezcló en vortex vigoroso aprox. 5 seg y se incubó durante 30 min a 4°C sin agitar. Terminado este tiempo, se añadieron 700 μ l de la solución comercial de Optiprep (OptiprepTM, hecho por Fresenius Kabi Norge AS para Axis-Shield PoCAS; Oslo, Noruega. No. Producto 2010-02), que está al 60% a 4 °C, se mezcló con vortex vigoroso aprox. 5 seg todo el contenido del tubo. Después se agregó con mucho cuidado 1.7 ml de Optiprep al 30% en TXNE, evitando que se mezcle con la suspensión original. Finalmente se depositaron 280 μ l de TXNE (Tritón X-100 1% en amortiguador TNE) sobre las dos fases anteriores, también con mucho cuidado y sin mezclar. Se partió de un mínimo 500 μ g de proteína microsomal por tubo y en general se procesó material para cargar 18 tubos con el gradiente de Optiprep, como mínimo. Se centrifugaron los tubos a 45000 rpm a 4°C, durante 2 h 5 min en el rotor SW 50.1, en Ultracentrífuga Beckman XL-100K. Terminado este tiempo, se recolectaron 505 μ l de la fracción superior de cada tubo (un total de aprox. 9 ml por los 18 tubos) y se transfirieron a un solo tubo para rotor 60 Ti, y se añadió aprox. 10 a 15 ml de amortiguador TNE hasta completar el vol. permitido para el tubo, y así lavar el Optiprep residual. Para recuperar el botón de DRMs se centrifugó el tubo del 60 Ti a 45000 rpm durante 1 h 8 min en Ultracentrífuga Beckman XL-100K. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en un máximo de 80 μ l de amortiguador TNE. Se determinó proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (1987) Se congeló inmediatamente con N₂ líquido, guardándose a -70°C hasta su uso.

5.5. Determinación de Proteína.

Se llevó a cabo por la técnica de Lowry modificada por Peterson (1977).

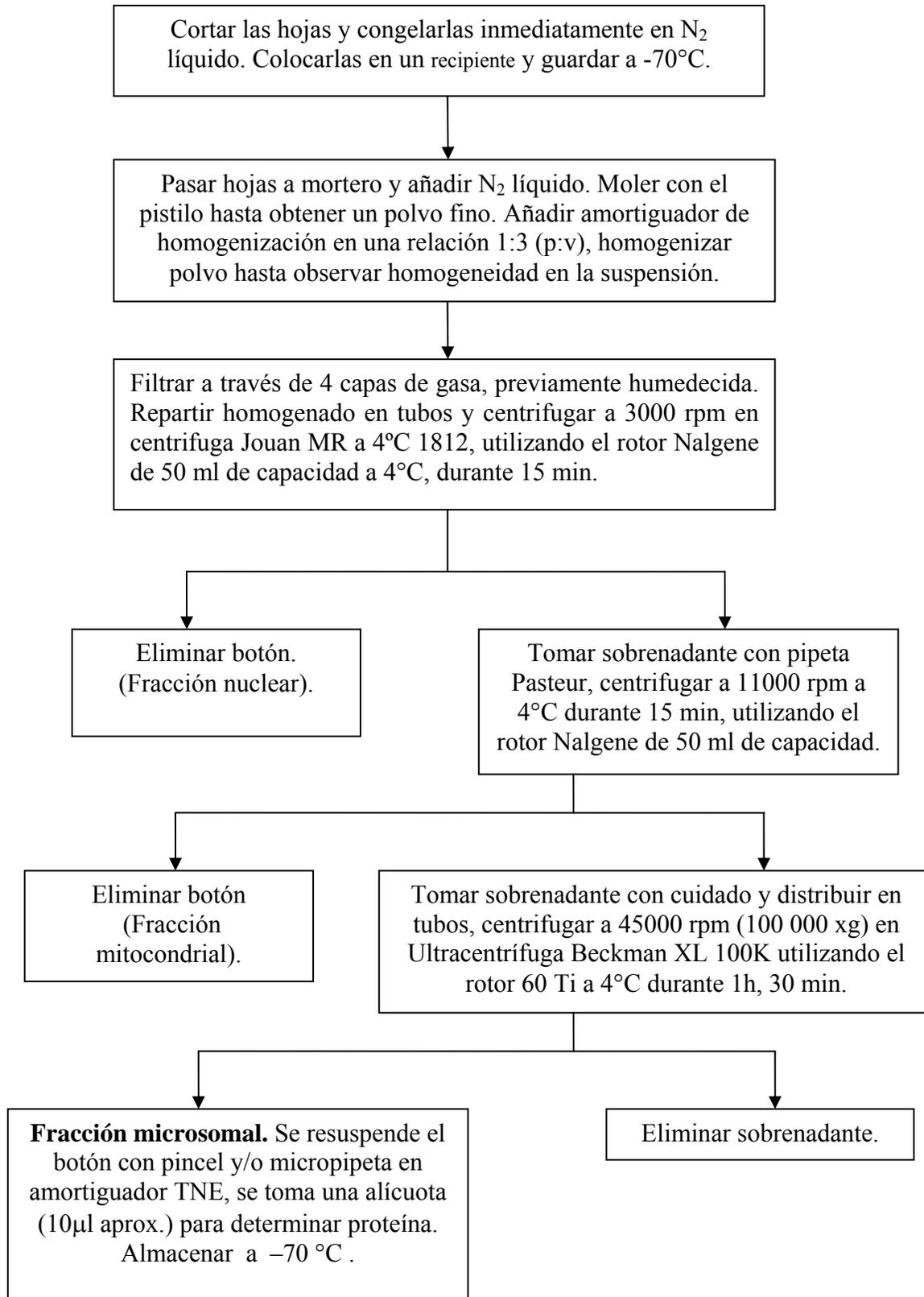


Figura 5. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

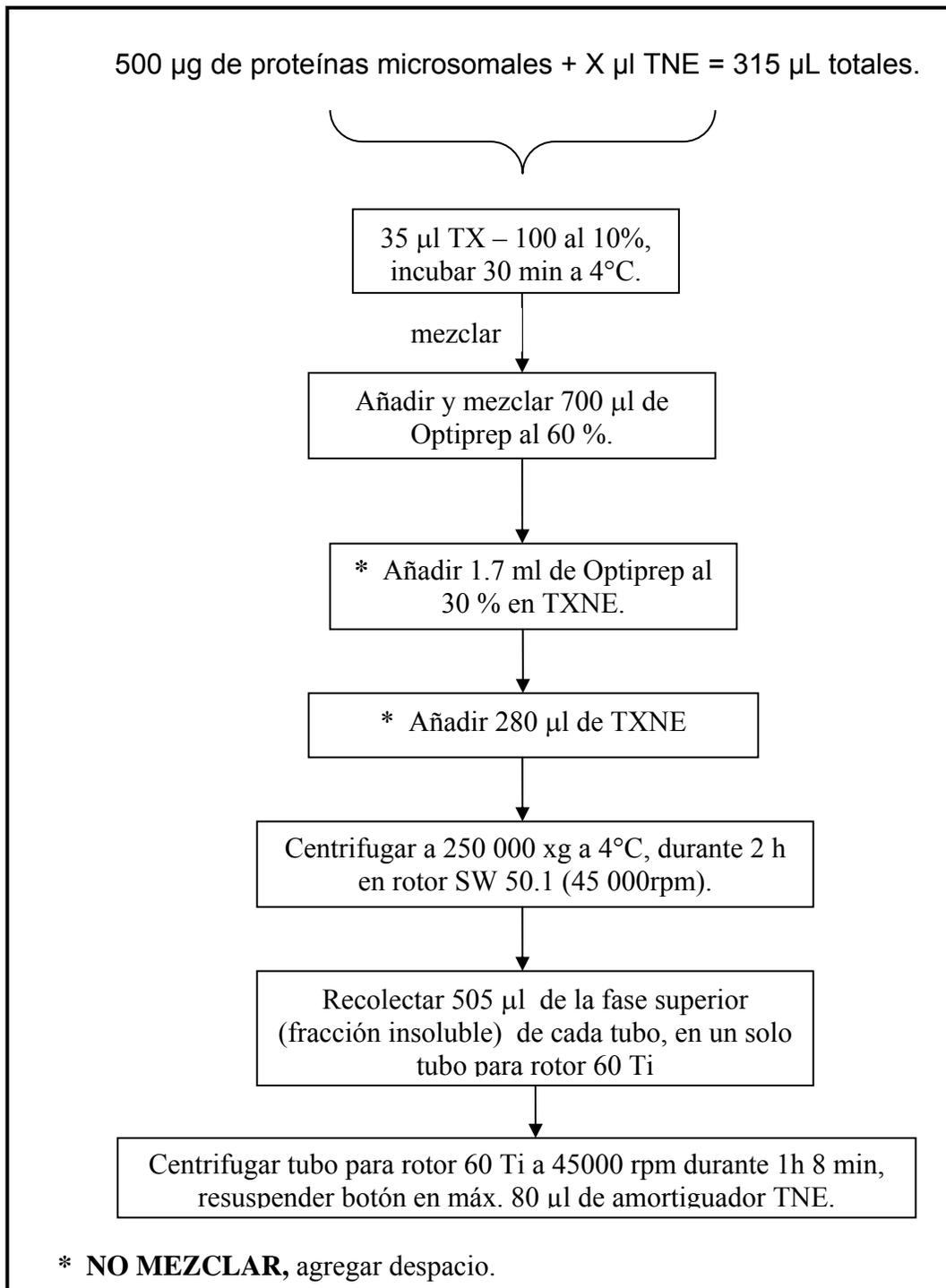


Figura 6. Obtención de Membranas Resistentes a la Solubilización por Detergente (DRM) de *Arabidopsis thaliana*.

5.6. Análisis de proteínas.

Las proteínas de microsomas y de DRMs se separaron electroforéticamente en geles de doble dimensión, siendo una dimensión de pH isoelectrico y la segunda dimensión de peso molecular (Schägger y Von Jagow, 1987; Carmona, 2006).

5.6.1. Separación de proteínas por enfoque isoelectrico (EIE) (primera dimensión).

Para realizar el EIE primero se preparó la muestra como se menciona a continuación:

a) Precipitación de las proteínas. Este paso se llevó a cabo para lograr la precipitación de las proteínas membranales que se van a separar por EIE, así se concentran y se eliminan componentes no proteicos (Carmona, 2003). Se añade una mezcla de etanol:acetona (1:1, v:v) fría en una relación con respecto a la muestra 1:3, v:v (un vol. de muestra y tres de etanol:acetona). Todo se mezcló e incubó a -20°C durante una h. Una vez terminado el tiempo de incubación en frío, las muestras fueron centrifugadas a 14 500 rpm durante 15 min a 4°C, en centrifuga JOUAN MR 18.12, rotor angular No. Cat. 11174622.

b) Resuspensión de la muestra. Se desechó el sobrenadante y se hizo una resuspensión del botón en el amortiguador de solubilización que se menciona en la Tabla 4, utilizando siempre como volumen final 135 µl, que es el indicado para poder realizar una separación por punto isoelectrico (Borner *et al.*, 2005).

Tabla 4. Composición del amortiguador de solubilización de proteínas para separarse por EIF.

Componentes (concentraciones finales)	
Anfolinas pH 3 /10	1.2%
DTT	50 mM
Tris – HCl	10 mM, pH 8.5
Urea	7 M
Tiourea	2 M
N-Octilglucopiranosido	2 %
Tritón X-100	0.5 %

Se utilizaron tiras con gel preformado (BIO-RAD catálogo 163-200, pH 4-7), las cuales tienen anfolinas e inmovilinas adheridas a una tira plástica, que generan un gradiente inmóvil de pH a lo largo del gel para separar a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Las tiras necesitan hidratarse previamente a su corrimiento, lo cual se realiza con el cargado de la muestra utilizando el amortiguador indicado en la Tabla 4 y en general, las condiciones descritas en Carmona (2003). El procedimiento se describe a continuación.

c) Hidratación. Se utilizó una bandeja de hidratación, la cual consta de 12 carriles, a cada carril le corresponde una tira. La muestra se preparó como se mencionó en el punto b, los 135 μ l se distribuyen a lo largo del carril correspondiente, posteriormente se coloca la tira con el gel preformado, con la cara del gel en contacto con el amortiguador que contiene la muestra ya solubilizada. Se cubrió la tira con 2 ml de aceite mineral de Bio-Rad, (catálogo 163-2129) y se deja durante toda la noche a 4°C.

d) Condiciones de corrida. Se usó la bandeja de corrimiento, la cual es como la de hidratación, pero que contiene los electrodos, los cuales deben ser cubiertos con papel absorbente prehumedecido con agua bidestilada, en cada uno de los extremos del carril correspondiente, con lo cual la bandeja está lista para cargarse con la tira hidratada; para ello, debe quitarse el exceso de aceite mineral, sacando la tira de la bandeja de hidratación con ayuda de unas pinzas y se dejó escurrir el exceso de aceite mineral, posteriormente se colocó la tira en la bandeja de corrimiento, con la cara que contiene el gel en contacto con los electrodos de ésta; se cubrieron las tiras con 1.5 ml de aceite mineral, se tapó y se llevó la bandeja de corrimiento al equipo de PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad). Se programan las condiciones de corrida que son aproximadamente de 5 h con un voltaje que va de 800 V hasta los 10 000 V. Una vez terminado el tiempo de corrida, las tiras se sacaron de la bandeja de corrimiento, se quitó el exceso de aceite mineral y se guardaron a -70°C.

e) Digestión de las tiras con el gel preformado. Las tiras que ya fueron separadas por IEF, se descongelaron dejándolas a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en un tubo de plástico con tapa, en donde se les añadió 1 ml de amortiguador de equilibrio para geles de poliacrilamida-SDS durante 5 min, cuya composición se muestra en la Tabla 5. Este paso se hace para digerir a las proteínas y facilitar una mejor separación por peso molecular.

Pasados los primeros 5 min, se les retira este amortiguador de digestión a las tiras y se les volvió a adicionar 1 ml del mismo amortiguador durante otros 5 min; terminado este tiempo, se retiró el amortiguador a las tiras. Las tiras están listas para introducir las en los geles de poliacrilamida-SDS.

Tabla 5. Composición del amortiguador de equilibrio.

Componentes del amortiguador de equilibrio.	
Concentraciones finales.	
SDS	10 %
Tris	100 mM, pH 6.8
Azul de bromofenol	0.6 %
β-mercaptoetanol	4 %

5.6.2. Separación de proteínas por peso molecular (segunda dimensión).

Se prepararon los geles de acrilamida-bisacrilamida (10% - 0.3%) de 1 mm de grosor (Schägger y Von Jagow, 1987) para determinar el patrón de las proteínas de las preparaciones de fracciones microsomales y de DRMs separadas antes por punto isoeléctrico. El gel consta de dos partes. Una es un gel separador y otra, uno concentrador. Las cantidades y reactivos utilizados para cada uno se muestran en la Tabla 6.

Las soluciones que se utilizaron para la preparación de los geles de poliacrilamida–SDS, así como las utilizadas para el corrimiento electroforético se muestran a continuación:

a) Solución de acrilamida–bisacrilamida (30% - 0.938%).

b) Amortiguador del gel:

Tris 3 M

SDS 0.3 %

Ajustar el pH a 8.9 – 9.0 con HCl

TABLA 6. Composición de los geles de poliacrilamida – SDS.

REACTIVOS	Gel Separador (µl)	Gel Concentrador (µl)
Acrilamida-bisacrilamida (30 % - 0.938%)	1631.9	528.5
Amortiguador del gel Tris / SDS, pH 8.9	1631.9	991
Glicerol	660.16	-----
H ₂ O	990.98	2442.3
* Persulfato de amonio 10%	16.5	33
* TEMED	1.65	3.3
Cantidad total (vol.)	4975.7	4000

* Una vez que se han añadido, se debe manejar muy rápido la solución.

c) Amortiguador del cátodo:

Tris 0.1 M

Tricina 0.1 M

SDS 0.1 %. Sin ajustar el pH.

d) Amortiguador del ánodo.

Tris 0.2 M

Ajustar el pH a 8.9-9.0 con HCl

e) Amortiguador de digestión.

SDS 10 %

Tris 100 mM, pH 6.8

Azul de bromofenol 0.6 %

β -mercaptoetanol 4%.

f) Solución de marcadores de peso molecular.

Se utilizó un estándar de proteínas (InvitroGen Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder, No. Cat.: 10748-010), que estaba compuesto por las siguientes proteínas:

Tabla 7. Estándares de peso Molecular.

Proteína	Peso Molecular
Banda no.	(KDa)
1	180
2	115
3	82
4	64*
5	49
6	37
7	26
8	19
9	15
10	6

* Banda de orientación (color rosa).

Los geles se realizaron de la siguiente manera:

- a) Se montaron las placas de vidrio con un separador de 1 mm de ancho, en cada soporte, sellando los extremos con vaselina; posteriormente se hizo la prueba para que no hubiera fugas durante el corrimiento.
- b) Se removió el agua y se preparó el gel separador (ver Tabla 6) y se vació entre las dos placas de vidrio, se añadió 1 ml de SDS al 0.3 % para evitar la formación de menisco en el gel, se dejó polimerizar por 30 min.
- c) Se removió el exceso de SDS y se procedió a preparar el gel concentrador (ver Tabla 6) que también fue vertido entre las placas de vidrio, dejando un pequeño espacio para que se colocara la tira.
- d) Se montaron los soportes en la cámara y se hizo el cargado de las tiras.
- e) Se corrió la electroforesis de las muestras a 60 V, 30 min. y después a 90 V hasta que salió del gel todo el frente de corrida, después se dejó sobrecorrer el gel durante 30 min más.
- f) Se removió el gel de las placas de vidrio y de los soportes al término de la corrida, y se colocó en un recipiente de vidrio limpio y seco al cual se le agregó solución fijadora para teñir con plata por el método de Vorum (Mortz *et al.*, 2001).

5.6.3. Tinción del gel con plata (método de Vorum, Mortz *et al.*, 2001).

Para realizar la tinción con plata se siguió el procedimiento que se detalla a continuación. Es importante señalar que todos los pasos deben realizarse en los tiempos indicados. Las cantidades finales de soluciones que se agregan al gel son de 40-50 ml. Para realizar esta tinción se utilizó siempre un recipiente de vidrio, por cada gel que se procesa. El recipiente debe estar muy limpio y seco. Todo el tiempo se deben usar guantes, siempre evitando tocar el gel, para impedir la porción de manchas en el revelado.

1. Fijación. Se preparó una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.05% (sólo puede ser el de Sigma, No. cat. 200-001-8). Se dejó el gel en esta solución durante dos h con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
2. Lavador. Se quitaron los geles de la solución fijadora y se hicieron tres lavados de 20 min cada uno con *etanol al 35%*, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente. Entre cada lavado hay que decantar con cuidado sin tocar el gel.
3. Sensibilización. Se mantuvo el gel durante 5 min en una solución de tiosulfato de sodio 0.02%, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
4. Lavado. Se llevó a cabo con agua bidestilada, tres veces durante 5 min cada uno, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente. **Este lavado es crítico, pues de excederse el tiempo, el gel no se tiñe y se tiene que volver a empezar en el paso 1.**
5. Adición de la solución de plata. Se colocó el gel ya enjuagado, en una solución de AgNO_3 0.2%, formaldehído 0.076%; durante 20 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
6. Lavado. Se llevó a cabo con agua bidestilada, dos veces, cada uno durante 1 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
7. Revelado. Después de enjuagar, se puso el gel en una *solución de Na_2CO_3 6%, formaldehído 0.05%, tiosulfato de sodio 0.0004%*, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente, hasta que aparecieron las bandas. Se decantó la solución reveladora una vez que se obtuvo la intensidad deseada.
8. Terminación del revelado. Se añadió la *solución Stop consistente en metanol 50% y ácido acético 12%*, manteniendo por 5 min, con agitación constante, suave, a temperatura ambiente.
9. Almacenamiento del gel. Se preparó una solución de ácido acético al 1% en la que se guardó a 4°C. Antes se puede escanear y ya posteriormente, secar.

Análisis de proteínas de DRM de las diferentes líneas de *A. thaliana* en geles 2-D con fluorescencia diferencial (DIGE)

Tabla 8. Composición del amortiguador de solubilización de proteínas para separarse por EIF. (GE Healthcare, Amersham CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE).

Componentes (concentraciones finales)	
Tris – HCl	30 mM, pH 8.5
Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	4 %

- a) **Reconstitución de las soluciones stock de CyDyes en Dimetilformamida (DMF) anhidra.** Se reconstituyeron los colorantes fluorescentes CyDyes (CyDye Fluor Cy2 minimal dye, No. cat. 25-8010-82), CyDye Fluor Cy3 minimal dye (no cat. 25-8010-83) y CyDye Fluor Cy5 minimal dye (no. cat. 25-8010-85)), en dimetilformamida anhidra 99.8% (Aldrich 22,705-6), agregando $\approx 5 \mu\text{l}$ a cada tubo de CyDye y se agitó en vortex vigorosamente y centrifugando; esto se hizo en oscuridad para no afectar las propiedades fluorescentes de los CyDyes. Después de la reconstitución en DMF, cada CyDye da un color diferente: Cy2-amarillo, Cy3-rojo y Cy5-azul; la concentración final de los stocks de CyDyes es de 1mM.
- b) **Preparación de solución de trabajo de CyDyes para marcar proteínas.** Se recomienda (GE Healthcare, Amersham CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE), que para marcar 50 μg de proteínas se usen 400 pmoles de CyDye, por lo tanto se realizó una dilución de cada solución stock de CyDye, tomando 2 μl de cada stock de CyDye a los que se le agregaron 3 μl de DMF anhidra, para tener un volumen final de 5 μl y una concentración de cada CyDye de 400 pmoles/ μl ; esto se hizo en baño de hielo, en oscuridad, agitando vigorosamente y centrifugando brevemente para bajar el material adherido a las paredes de cada tubo.

c) Marcaje mínimo de cada muestra de proteínas. En este caso se marcaron 40 μg de proteína de cada muestra de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b-hp/Atlcb2a*) con y sin el inductor metoxifenoazida (MFZ), las cuales debían tener un $\text{pH} \geq 8.5$ antes de agregar los CyDyes; las muestras se marcaron con 400 pmoles de CyDye, agregando un CyDye diferente a cada tubo eppendorf de cada muestra, como se indica en la Tabla 9, se agitó vigorosamente y se centrifugó brevemente en microfuga, posteriormente los tubos eppendorf se incubaron en baño de hielo durante 30 min, en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se agregó 1 μl de Lisina 10 mM, a cada tubo, se mezcló con micropipeta y posteriormente se centrifugó brevemente en microfuga, se dejó en incubación 10 min en hielo y en oscuridad, para detener la reacción de marcaje de las proteínas. Posteriormente, se seleccionaron las muestras para mezclarse por pares: muestras 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6 según se muestra en la Tabla 9, agregando además el estándar interno a cada mezcla que se hizo, de manera de cargar a cada tira de gel preformado un par de muestras más su estándar interno.

Se utilizaron tiras con gel preformado (Amersham, pH 4-7 lineal, de 13 cm, que necesitan 250 μl de volumen total de hidratación), las cuales tienen anfólicas e inmobilinas adheridas a una tira plástica, que generan un gradiente inmóvil de pH a lo largo del gel para separar a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico.

Tabla 9. Marcaje de proteínas, se indica cada CyDye con la que fue marcada cada muestra de proteínas de DRMs. La cantidad de muestra agregada corresponde a 40 µg de proteína en cada caso.

No. gel	No. muestra	Muestra de DRMs	Vol. muestra (µl)	CyDye	Vol. CyDye (µl)	Vol. Lisina 10 mM (µl)
1 y 2	1	<i>Silvestre</i>	10	Cy3	1	1
	2	<i>AtLcb2a-1</i> -MFZ	10	Cy5	1	1
3 y 4	3	<i>At Lcb2a-1</i> +MFZ	10	Cy3	1	1
	4	<i>AtLcb2b- hp/Atlcb2a</i> +MFZ	10	Cy5	1	1
5 y 6	5	<i>AtLcb2b- hp/Atlcb2a</i> -MFZ	10	Cy3	1	1
	6	<i>AtLcb2b- hp/Atlcb2a</i> +MFZ	10	Cy5	1	1
	*EI	Mezcla de todas las muestras	10	Cy2	3	3

*EI: se refiere al estándar interno, el cual también fue mezclado con cada par de muestras.

Las tiras necesitan hidratarse previamente a su corrimiento, lo cual se realiza con el cargado de la muestra utilizando la solución de hidratación como se indica en el siguiente inciso.

d) Hidratación. Debido a que cada tira requiere de un volumen de hidratación de 250 µl se hicieron los cálculos necesarios para tener este volumen final, por lo tanto de cada mezcla de muestras y el estándar interno se tiene un volumen de 27 µl, por lo tanto se agregaron 223 µl de solución de hidratación (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Anfolitas 1.25%, DTT 18 mM, Azul de Bromofenol 0.002%) a cada par de muestras que se mezcló. Se utilizó una bandeja de hidratación, la cual consta de 12 carriles, a cada carril le corresponde una tira. Ya teniendo los 250 µl se distribuyeron a lo largo del carril correspondiente, para cada par de muestras, posteriormente se colocó la tira con el gel preformado, con la cara del gel en

contacto con el amortiguador que contiene la muestra ya solubilizada. Se cubrió la tira con 3 ml de aceite mineral y se dejó hidratando durante toda la noche a temperatura ambiente, cuidando que la bandeja de hidratación con las muestras, no se encontrara expuesta a la luz.

- e) Condiciones de corrida.** Se usó el equipo Ettan™ IPGphor™3 (No. de serie: 01205389, Versión: A11 09/14/05), para realizar el enfoque isoeléctrico, el cual se llevó a cabo en 4 pasos hasta llegar a 20000 Vh, como se muestra en la Figura 7. Para esto, la bandeja de corrimiento, la cual es como la de hidratación pero que contiene los electrodos en cada uno de los extremos del carril correspondiente, debe tener los electrodos cubiertos con papel absorbente prehumedecido con agua bidestilada. De esta manera, la bandeja está lista para cargarse con la tira hidratada; para ello, debe quitarse el exceso de aceite mineral, sacando la tira de la bandeja de hidratación con ayuda de unas pinzas y dejando escurrir el exceso de aceite mineral. Posteriormente, se colocó la tira en la bandeja de corrimiento, con la cara que contiene el gel en contacto con los electrodos de ésta; se cubrieron las tiras y el resto de la bandeja de corrimiento con aceite mineral, se tapó y se procedió a encender el equipo. Se programaron las condiciones de corrida (Figura 7A), además de que también se fue monitoreando el progreso de ésta (Figura 7B). Una vez terminado el tiempo de corrida, las tiras se sacaron del equipo, se quitó el exceso de aceite mineral, se realizó la digestión de las tiras y posteriormente se colocaron en geles de Laemmli para realizar la separación por peso molecular (2-D).
- f) Digestión de las tiras con el gel preformado.** Al término de las 6 horas de corrida del enfoque isoeléctrico, se sacaron las tiras del equipo y se pusieron en las soluciones de equilibrio que siguen: (a) SDS 10%, Tris 100 mM, pH 6.8, Azul de bromofenol 0.6%, DTT 100 mg/10ml, b) SDS 10%, Tris 100 mM, pH 6.8, Azul de bromofenol 0.6%, iodoacetamida 250 mg/10 ml), primero durante 15 min en la solución a) y posteriormente 15 min en la solución b), para posteriormente cargarlas al gel de poliacrilamida, siempre evitando que las tiras estuvieran expuestas directamente a la luz.

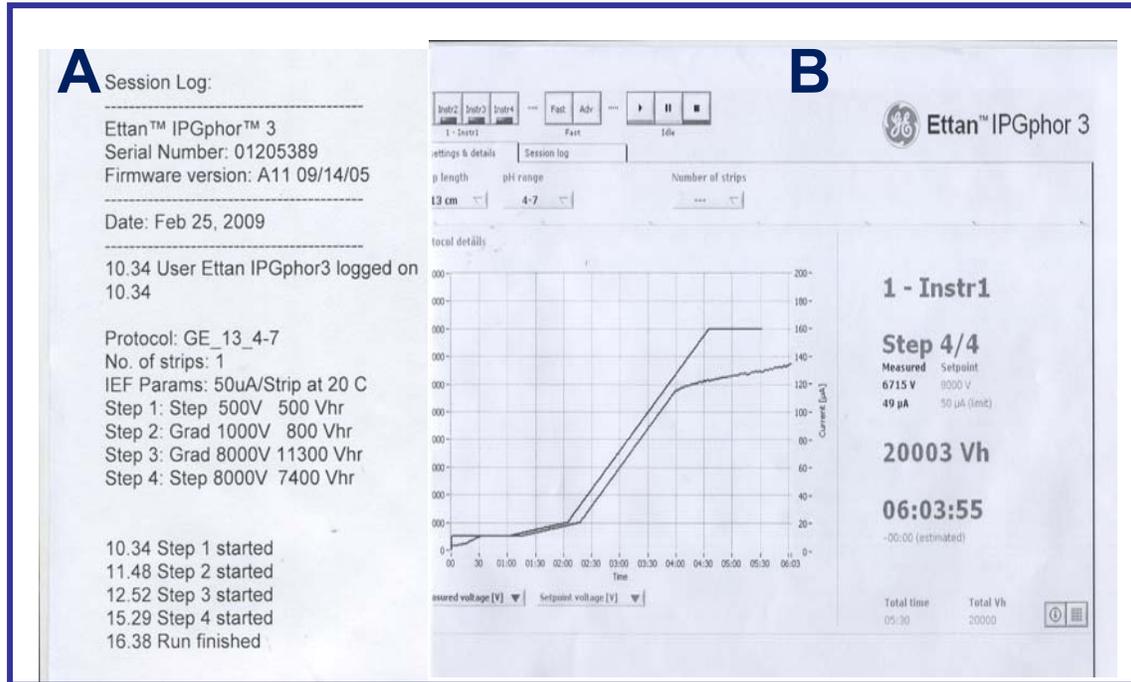


Figura 7. En A se muestran las condiciones de corrida para realizar el enfoque isoeléctrico, el cual constó de 4 pasos (1:500 V/ 500 Vh, 2:1000V/800Vh en gradiente, 3:8000V/11300 Vh en gradiente y 4:8000 V/ 7400 Vh) y en B se muestra la gráfica obtenida durante el progreso de la corrida de las tiras.

g) Separación de proteínas por peso molecular (2-D). Mientras se llevaba a cabo el enfoque isoeléctrico de las proteínas, se prepararon los geles de acrilamida en placa, para realizar la separación de proteínas por peso molecular (2-dimensión). La composición de estos geles se muestra en la Tabla 10; estas cantidades son para preparar 150 ml de gel separador de acrilamida al 10% (geles planos de 18cm de ancho x 20cm de alto). Se montó el equipo correspondiente para la realización de los geles, los cuales se dejaron polimerizar durante 3 horas.

Posteriormente, las tiras de gel preformado ya digeridas según lo indicado en el inciso h, se colocaron en la parte superior de los geles, añadiendo después un poco de agarosa al 0.5% que contenía azul de bromofenol 0.002%, para sellar completamente. Los geles se montaron en la cámara electroforética, se agregó buffer de corrida de Laemmli 10X (Tris 0.25 M, Glicina 1.92 M, SDS 1 %, pH 8.3), y se comenzó la corrida, se dejó toda la noche (15 h) a 30V, posteriormente se subió a 70 V 1h y finalmente a 90 V 2h. Al término de la corrida se sacaron los geles de la cámara y se colocaron en el cartucho para escanearlo en el equipo Ettan DIGE Image, uno por uno y se obtuvieron las imágenes correspondientes a cada muestra las cuales fueron analizadas con el programa DeCyder 2D Software, versión 6.5, módulo DeCyder-DIA (Differential In-gel Analysis) y módulo DeCyder-BVA (Biological Variation Analysis); además de que con la ayuda del Software Image Quant TL V2005 – 1D gel Analysis de Amersham Biosciences, se lograron obtener las imágenes coloridas separadas de cada gel, de cada muestra de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo silvestre Col-0, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b-hp/AtLcb2a*) con y sin inductor metoxifenoazida (MFZ), realizados durante este análisis.

Tabla 10. Composición de geles de poliacrilamida de Laemmli.

Reactivos	Volumen final (ml)
Acrilamida 10% conc. final Stock BIO-RAD (No cat. 161-0158, 30 % Acrylamide/bis solution, 37.5:1 {2.6 %C})	50
Tris pH 8.5	37.5
SDS 10%	1.5
H ₂ O MiliQ	60.116
Persulfato de amonio 10%	0.833
TEMED	0.05

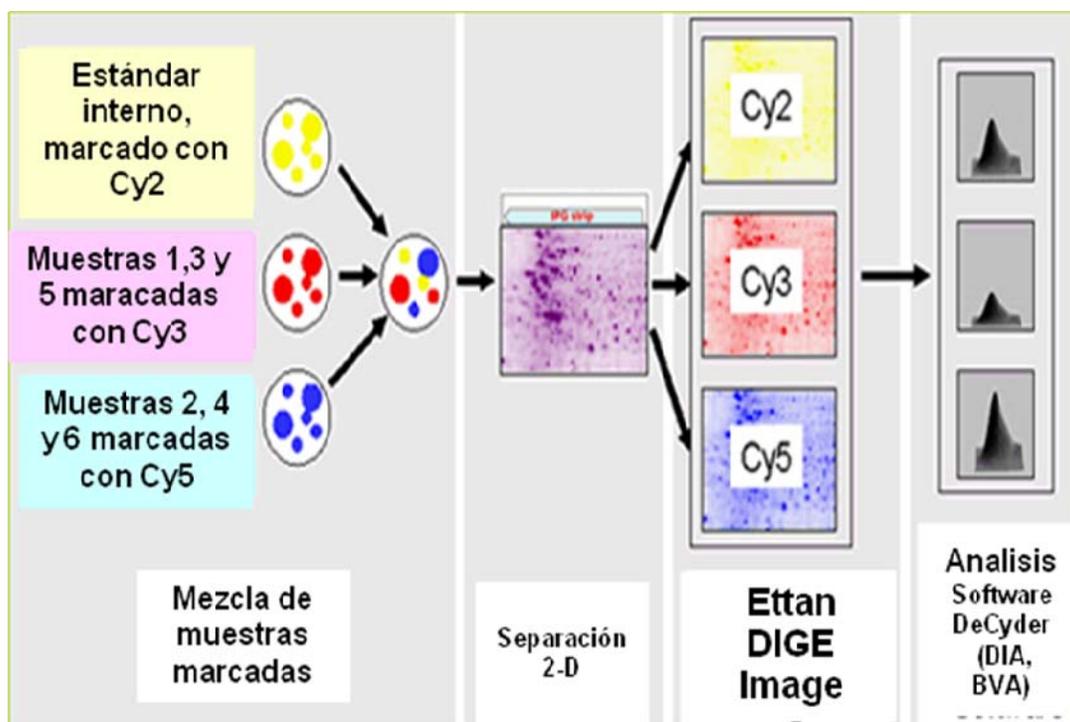


Figura 8A. Esquema general del procedimiento de análisis de proteínas 2D-DIGE. De izquierda a derecha, primero se presenta el marcaje y mezclado de las muestras, en este caso de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b-hp/Atlcb2a*) con y sin inductor metoxifenozida (MFZ), posteriormente se realiza la separación por *pI* y por peso molecular (2D), subsecuentemente se escanean los geles en el equipo Ettan DIGE Image para obtener las imágenes que serán analizadas con el software DeCyder (módulos DIA, BVA).

5.6.4. Análisis de proteínas de DRM mayormente expresadas en la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-TOF/MS).

Para llevar a cabo el análisis de Espectrometría de Masas de las 7 proteínas que se mencionan en la Tabla 17, se realizaron dos geles de Laemmli (para separación de proteínas por peso molecular), cada uno cargado con 350 μg de proteína total proveniente de una mezcla de todas las muestras de DRM de todas las líneas y todas las condiciones tratadas (para reunir la suficiente cantidad de proteína para ser separada en el gel); el procedimiento electroforético seguido con este gel fue el mismo que se menciona en Materiales y Métodos (página 36, desde el inciso a hasta el inciso g). Posteriormente, se realizó la digestión de las proteínas seleccionadas, ya separadas y cortadas del gel como se menciona a continuación:

Las proteínas fueron localizadas en el gel según su posición en la Figura 8B, en donde se marcó la localización de las 7 proteínas. Se indica su posición con una flecha y el número de proteína asignado por el programa DeCyder Módulo DIA.

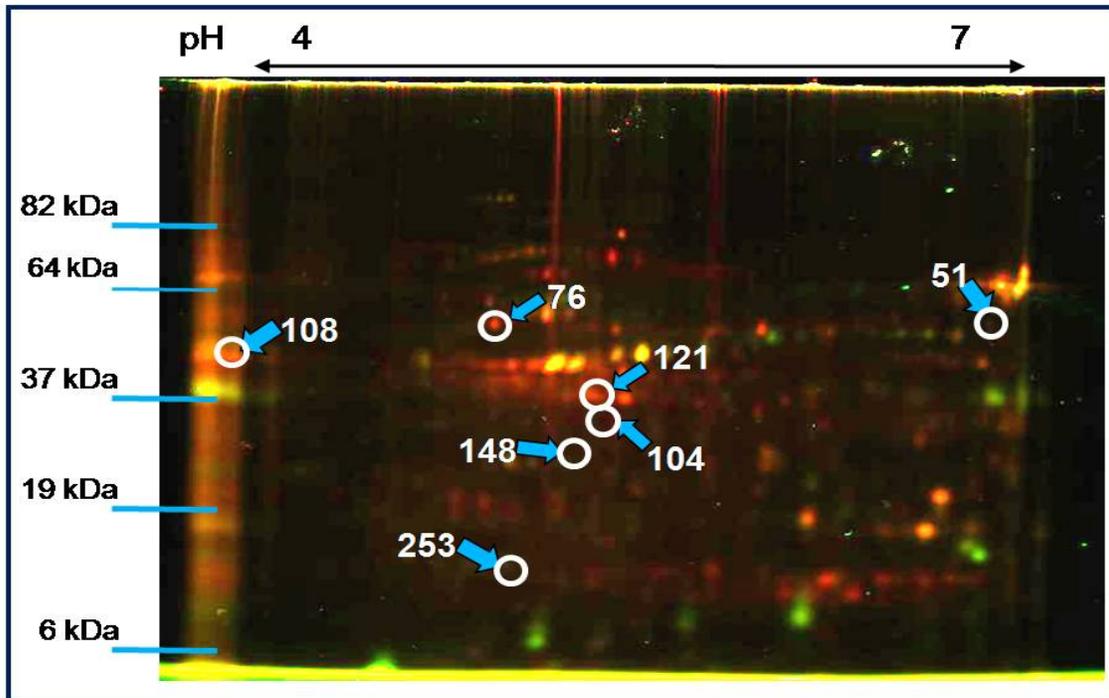


Figura 8B. Localización en el gel de las 7 proteínas (51, 76, 104, 108, 121, 148 y 253) de DRM que se expresaron más en la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor MFZ, en comparación con las demás muestras de DRM. En azul se señala la localización y número de proteína identificada con el Módulo DIA.

1. Se cortaron las bandas o manchas de proteínas (aproximadamente 1mm³ ó 2 mm³) con una punta de micropipeta y se colocaron en tubos eppendorf, removiéndose el exceso de líquido.
2. Se agregaron 500µl de una solución de Acetonitrilo 50%-NH₄HCO₃ 50 mM a cada corte de gel y se incubó a 50°C durante 5 min.
3. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior hasta limpiar el Azul de Coomassie de la muestra (es recomendable dar vortex después de agregar la solución para evitar que los pedazos de gel se adhieran al tubo).
4. Se agregaron 100 µl de Acetonitrilo al 100% y las piezas de gel se dejaron deshidratando por 5 min a temperatura ambiente. (Las piezas están

- deshidratadas cuando se tornan de un color blanco opaco y su tamaño se ha reducido significativamente).
5. Se removió el sobrenadante y las piezas del gel se secaron por completo a temperatura ambiente (tubo destapado, pero cubierto con kimwipes para evitar contaminación).
 6. Se añadieron 15 μl o el vol necesario para cubrir el gel, de una solución de Tripsina 25 ng/ μl (Gold, marca PROMEGA), y se dejó que las piezas de gel se rehidrataran durante 10 min mezclando ocasionalmente con vortex. Es importante que la cantidad de Tripsina agregada sea suficiente para cubrir los trocitos de gel.
 7. Se removió el excedente de la solución de Tripsina y se añadieron 20 μl de bicarbonato de amonio 50 mM (o un volumen suficiente para cubrir el gel hidratado). Se llevó a a cabo la reacción de digestión durante toda la noche a 37°C (aprox. 12 h).
 8. Se añadieron 20 μl de bicarbonato de amonio 50 mM a la mezcla de digestión y se incubaron las muestras por 10 min mezclando ocasionalmente con vortex. Se bajó la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 seg. Se colectó el sobrenadante cuidadosamente con la punta de una pipeta y se transfirió a un tubo de centrifuga nuevo de 0.5 ml.
 9. Se añadieron 20 μl de solución de extracción (50% v/v acetonitrilo y 5% v/v ácido fórmico) a las piezas de gel y se incubó tres veces las muestras (una de 30 min y dos de 10 min) cada vez, mezclando ocasionalmente con vortex. Se bajó la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 seg. Se colectaron los sobrenadantes cuidadosamente con la punta de una pipeta y se combinaron con el extracto anterior.
 10. Se redujo el volumen del extracto a 20 μl evaporando en una centrifuga con vacío (Eppendorf Concentrator S301A6), a temperatura ambiente. No dejar secar por completo.
 11. Se realizó la limpieza de muestras con ZIP-TIP (C18, Tip size:P10, Cat. No. ZTC185096, Materiales: Punta: polipropileno, C18: Sílica esférica 15 μm ,

tamaño de poro de 200 Å; Vol: 10 µl; Millipore Corporation Billerica, MA01821, USA), como se menciona a continuación:

- i. Se revisó el pH de la solución, éste debe ser <4. Se puede acidificar con Ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% o con ácido fórmico, comenzando con 1µl.
- ii. Se adicionaron 10 µl de Acetonitrilo (ACN) 100% (tomar y tirar) con la punta ZIP-TIP y posteriormente 10 µl de TFA 0.1% (tomar y tirar); esto se repitió tres veces.
- iii. Se tomaron 10 µl de muestra 50 veces (subiendo y bajando).
- iv. Se lavó con solución TFA 0.1% la ZIP-TIP tres veces (tomar y tirar).
- v. Se eluyó con 10 µl TFA 0.1% en un tubo eppendorf los péptidos adheridos a la ZIP-TIP (50veces).
- vi. Después de la limpieza, las muestras fueron colocadas en la placa MALDI.

12. Se preparó la matriz para colocar las muestras en la placa MALDI. Matriz: ácido α-ciano-4hidroxi-cinámico, CAS 2866-4-8 (50mg/5ml), ACN 50% y TFA 0.1%.

13. Se colocaron 0.7 µl de muestra y 0.7 µl de matriz en cada pozo de la placa MALDI (Placa LTQ-Orbitrap TOF-TOF), por quintuplicado.

Las muestras se colocaron de la siguiente forma: la proteína 108 se marcó como L1 y se colocó en los pozos A15-A19; la proteína 253 se marcó como L2 y se colocó en los pozos B15-B19; la proteína 148 se marcó como L3 y se colocó en los pozos C15-C19; la proteína 104 se marcó como L4 y se colocó en los pozos D15-D19; la proteína 76 se marcó como L5 y se colocó en los pozos E15-E19; la proteína 121 se marcó como L6 y se colocó en los pozos F15-F19 y la proteína 51 se marcó como L7 y se colocó en los pozos G15-G19.

6. RESULTADOS

6.1. Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*, de las líneas silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a*. Inducción del silenciamiento del gene de la SPT.

Con objeto de obtener las preparaciones subcelulares requeridas para este trabajo, las semillas de plantas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas y crecidas hasta el estado adulto (de 8-10 semanas) en las condiciones descritas (agua, luz, nutrientes, control de plagas, etc.) en Materiales y Métodos. Las fases de crecimiento se muestran en la Figura 9.

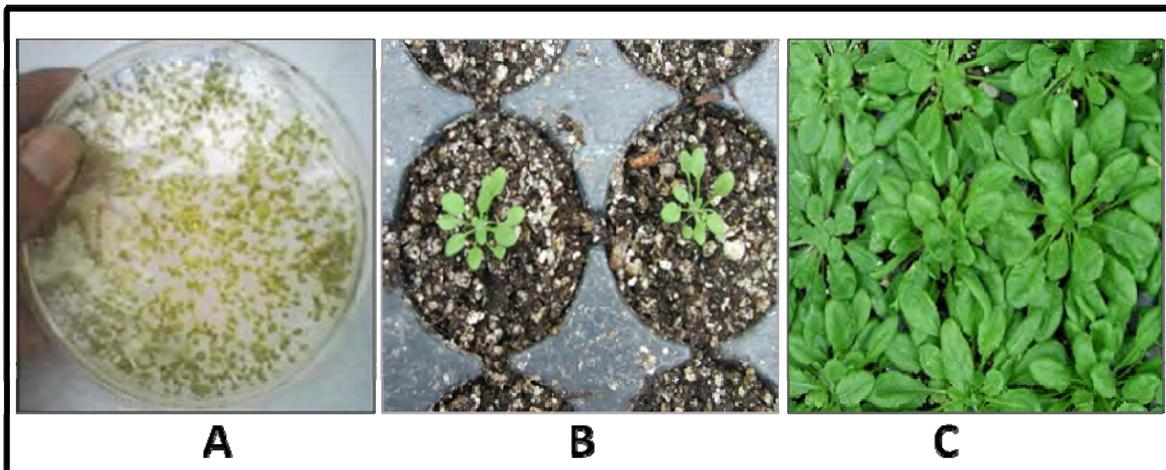


Figura 9. Proceso de obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre (*Col-0*). En (A) se observa la germinación de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, las cuales al cabo de dos semanas se trasplantaron a la mezcla de sustratos (B), para continuar con su crecimiento hasta la edad de 8-10 semanas (C), y ser tratadas como controles o con metoxifenoizida (MFZ) para cosechar las hojas.

Cuando las plantas alcanzaron el tamaño deseado, se llevó a cabo la inducción del silenciamiento del gene de la SPT, utilizando la aspersion del insecticida Intrepid F2 (con la metoxifenoizida o MFZ como ingrediente activo) sobre las plantas de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* (silvestre, *AtLcb2a-1*, *AtLcb2b hp/AtLcb2a*), pero dejando plantas sin inducir para utilizarlas como controles. En la Figura 10 se puede observar que el insecticida no produjo ningún efecto en el fenotipo de las líneas silvestre y *AtLcb2a-1*, mientras que la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* comenzó a presentar zonas cloróticas en las hojas desde los 3 días, mismas que se fueron extendiendo progresivamente. Después de 6 días

posteriores al inicio de la inducción del silenciamiento de la SPT, las hojas fueron cosechadas, para posteriormente obtenerse las fracciones subcelulares correspondientes. Es importante indicar en este punto que en el laboratorio se ha establecido que a los 6 días post-inducción, el transcrito de la SPT tienen una disminución aproximada del 40 % con respecto a los niveles de transcrito en los controles (líneas *AtLcb2a-1* con inductor y línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* sin inductor) (Carmona *et al.*, 2007).

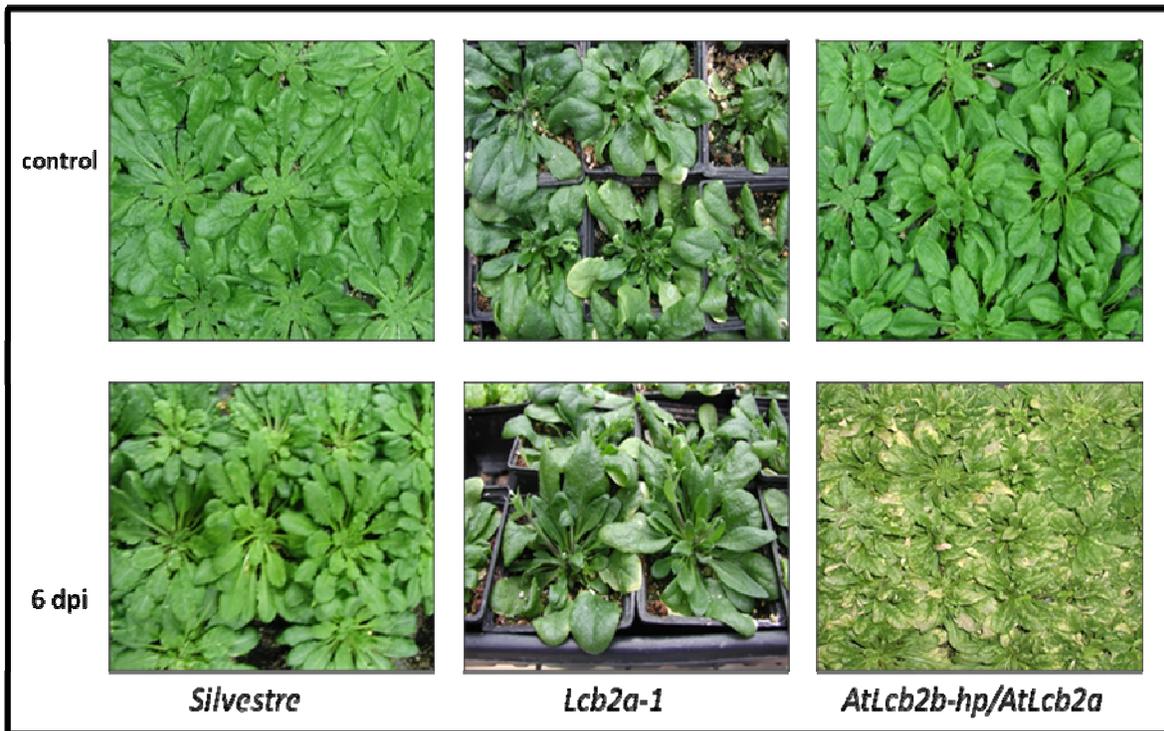


Figura 10. Fenotipo de las plantas de las líneas *Silvestre*, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* sin tratar y tratadas con metoxifenozida, 6 días después de la inducción (6 dpi). En la parte superior se observan los controles de las tres líneas y en la parte inferior las plantas que fueron inducidas.

6.2. Obtención de Homogenados, Fracciones Microsomales y Membranas Resistentes a Detergentes (DRM) de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *AtLcb2a-1*, *AtLcb2b hp/AtLcb2a*.

Se obtuvieron los homogenados y las fracciones microsomales de cada una de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo (silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* \pm MFZ) basándose en el método de Packer y

Douce (1987). Lotes de plantas crecidas en tiempos diferentes y mantenidas en congelación fueron procesados de manera independiente para ser fraccionadas. En la Tabla 11 se agrupan todos los datos de los fraccionamientos realizados en todas las líneas. Se puede observar que de las líneas silvestre, *AtLcb2a-1*± MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* ± MFZ se hicieron 3, 4, 4, 2 y 4 preparaciones respectivamente, haciendo un total de 17 preparaciones. En la cuarta columna de la Tabla 11, secciones A, B, C, D y E, se pueden observar las cantidades de tejido con las que se empezaron las diferentes preparaciones estuvieron entre los 10 g y los 60 g de tejido de hojas (en peso fresco). Estas cantidades de tejido fueron procesadas independientemente para hacer el fraccionamiento subcelular respectivo y obtener los homogenados y los microsomas correspondientes de cada línea. En cada etapa del fraccionamiento se determinó el contenido de proteína por el método de Lowry.

La información relativa a la cantidad de proteína obtenida en cada preparación fue variable en términos de concentración, como se aprecia en las columnas 6 y 7 de la Tabla 11, ya que aunque el tejido se homogeniza siempre en la misma relación de peso de tejido:volumen de amortiguador, la intensidad del procedimiento de homogenización puede dar algunas variaciones. Las cantidades de proteína total obtenida en cada fracción subcelular no pueden compararse entre las diferentes preparaciones, ya que provienen de diferentes cantidades de hojas. Sin embargo, el parámetro que sí puede ser comparable es el del rendimiento, mismo que se expresó en mg de proteína de cada fracción/g de hoja (en peso fresco).

Los datos de las secciones A a E de la Tabla 11 se resumieron en la Tabla 12, en la que se puede observar que en los homogenados se obtuvo un total de proteína entre 1.2 y 3.7 g de las preparaciones de las diferentes líneas expuestas o no al inductor a partir de las cuales se obtuvieron de 53 a 209 mg de proteína microsomal que a su vez fueron utilizados para la obtención de 0.3 a 3.3 mg de proteína en los DRM. Tales intervalos son amplios en cada fracción pues dependen de la cantidad de tejido de la que se partió. De manera general se

puede decir que se obtuvo 1.0 mg de proteína microsomal por cada gramo de hoja (peso fresco). De las tres líneas utilizadas con o sin la presencia de inductor, los rendimientos en los homogenados y en las fracciones microsomales fueron muy similares. Asimismo, a partir de la reunión de varias preparaciones microsomales se procedió a realizar la obtención de DRM, usando un protocolo basado en los procedimientos de Fiedler *et al.*, (1993), Carmona (2006) y Borner *et al.*, (2004). Los datos referentes a las preparaciones de DRM también se incluyen en las Tablas 11 y 12. Éstos indican que los rendimientos estuvieron en el rango de \approx 4-30 μ g de proteína de DRM por cada gramo de hoja (peso fresco). Los rendimientos de proteína de DRM por g de tejido fueron muy parecidos para todas las líneas excepto para las silvestre y la *AtLcb2b hp/AtLcb2a* no expuesta al inductor MFZ, en las que los rendimientos fueron alrededor de 10 veces menores que en las otras líneas. Las cantidades de proteína total constituyen las cantidades de proteína disponibles para su análisis en los geles 2-D.

Tabla 11. Preparaciones subcelulares obtenidas de las líneas silvestre (Col-0), *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* de *Arabidopsis thaliana*. Se presentan todas las preparaciones obtenidas a lo largo de este trabajo, con el objeto de mostrar la reproducibilidad del procedimiento. Las diferentes preparaciones se agruparon en secciones según la línea utilizada: sección A: silvestre (Col-0); B: *AtLcb2a-1* menos el inductor; C: *AtLcb2a-1* más el inductor; D: *AtLcb2b-hp/Lcb2a* menos el inductor; E: *AtLcb2b hp/Lcb2a* más el inductor. Pf es peso fresco.

A <i>Línea Silvestre.</i>							
No. de preparación	Fracción subcelular	Fecha de procesamiento	Hojas pf (g)	Vol. (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)
1	Homogenado	11-10-07	49.34	150	6.35	952.5	19.3
	Microsomas			3.6	6.761	24.339	0.493
	DRM			0.216	1.833	0.395	0.008
2	Homogenado	14-02-08	53.4	213.6	4.528	967.18	18.11
	Microsomas	14-02-08		5.0	12.266	61.32	1.148
	DRM						0.0073
3	Homogenado	28-05-08	45.64	183	3.11	569.13	12.46
	Microsomas	28-05-08		3.5	8.018	28.063	0.615
	DRM						0.123
Valores promedio de rendimiento	Homogenado						16.62
	Microsomas						0.752
	DRM						0.0092

RESULTADOS

Tabla 11. Continuación. Preparaciones subcelulares obtenidas de las líneas silvestre (Col-0), *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* de *Arabidopsis thaliana*. Se presentan todas las preparaciones obtenidas a lo largo de este trabajo, con el objeto de mostrar la reproducibilidad del procedimiento. Las diferentes preparaciones se agruparon en secciones según la línea utilizada: sección A: *Silvestre* (Col-0); B: *AtLcb2a-1* menos el inductor; C: *AtLcb2a-1* más el inductor; D: *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos el inductor; E: *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más el inductor. Pf es peso fresco.

B <i>Línea AtLcb2a-1 (-MFZ)</i>							
No. de preparación	Fracción subcelular	Fecha de procesamiento	Hojas pf (g)	Vol. (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)
1	Homogenado	12-02-08	24.05	72	2.037	146.664	2.87
	Microsomos	12-02-08		2.5	9.837	24.592	1.022
	DRM	11-04-08		0.218	2.167	0.472	0.019
2	Homogenado	02-04-08	68.98	207	2.952	611.064	8.858
	Microsomos	02-04-08		1.8	12.643	22.757	0.329
	DRM	24-04-08		0.215	0.32	0.0687	0.00099
3	Homogenado	23-04-08	39.61	118.83	3.607	428.62	10.821
	Microsomos	23-04-08		1.65	17.032	28.103	0.709
	DRM	19-08-08		0.156	0.657	0.103	0.0026
4	Homogenado	27-05-08	38.71	116.13	5.377	624.431	16.131
	Microsomos	27-05-08		2	21.806	43.612	1.126
	DRM	15-08-08		0.387	2.851	1.114	0.0287
Valores promedio de rendimiento	Homogenado						9.67
	Microsomos						0.7965
	DRM						0.0128

C <i>Línea AtLcb2a-1 (+MFZ)</i>							
No. de preparación	Fracción subcelular	Fecha de procesamiento	Hojas pf (g)	Vol. (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)
1	Homogenado		11.37	34.11	2.037	69.258	6.091
	Microsomos			1.4	19.784	27.698	2.436
	DRM	04-04-08		0.246	2.683	0.658	0.058
2	Homogenado	27-05-08	41.95	125.76	5.952	748.52	17.86
	Microsomos	27-05-08		2.8	19.306	54.056	1.29
	DRM	10-07-08		0.481	1.27	0.610	0.0145
3	Homogenado	28-05-08	56.51	226.02	4.841	1091.16	19.364
	Microsomos	28-05-08		3	10.556	31.668	0.56
	DRM	22-08-08		0.281	0.745	0.209	0.0037
4	Homogenado	13-08-08	49.81	150	9.035	1355.25	27.21
	Microsomos	13-08-08		3	31.71	95.13	1.91
	DRM	28-08-08		0.845	1.97	1.669	0.0335
Valores promedio de rendimiento	Homogenado						17.63
	Microsomos						1.549
	DRM						0.027

RESULTADOS

Tabla 11. Continuación. Preparaciones subcelulares obtenidas de las líneas silvestre (Col-0), *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* de *Arabidopsis thaliana*. Se presentan todas las preparaciones obtenidas a lo largo de este trabajo, con el objeto de mostrar la reproducibilidad del procedimiento. Las diferentes preparaciones se agruparon en secciones según la línea utilizada: sección A: silvestre (Col-0); B: *AtLcb2a-1* menos el inductor; C: *AtLcb2a-1* más el inductor; D: *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos el inductor; E: *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más el inductor. Pf es peso fresco.

D <i>Línea AtLcb2b hp/AtLcb2a (-MFZ)</i>							
No. preparación	Fración subcelular	Fecha de procesamiento	Hojas pf (g)	Vol. (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)
1	Homogenado	19-02-08	10.73	32	2.531	80.992	7.548
	Microsomas	19-02-08		0.9	20.31	18.279	1.703
	DRM	23-04-08		0.162	0.137	0.0222	0.0021
2	Homogenado	25-03-08	60.43	180	6.405	1152.9	19.078
	Microsomas	25-03-08		2	17.286	34.572	0.572
	DRM	03-04-08		0.307	0.75	0.2303	0.0038
Valores promedio de rendimiento	Homogenado						13.313
	Microsomas						1.1375
	DRM						0.00295

E <i>Línea AtLcb2b hp/AtLcb2a (+MFZ)</i>								
No. de preparación	Fración subcelular	Fecha de procesamiento	Hojas pf (g)	Vol. (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)	
1	Homogenado	27-02-08	15.1	45	4.34	195.3	12.93	
	Microsomas	27-02-08		-	0.57	22.143	12.62	0.836
	DRM	-		-	-	-	-	-
2	Homogenado	30-10-08	34.47	103.41	11.156	1153.64	33.47	
	Microsomas	30-10-08		2.5	19.711	49.28	1.43	
	DRM	03-11-08		0.547	3.074	1.682	0.0488	
3	Homogenado	30-10-08	40.7	122.1	9.778	1193.89	29.33	
	Microsomas	30-10-08		3.3	17.867	58.96	1.45	
	DRM	20-11-08		0.524	1.082	0.566	0.014	
4	Homogenado	30-10-08	47.65	142.95	4.733	676.58	14.19	
	Microsomas	30-10-08		3.3	15.911	52.51	1.11	
	DRM	21-11-08		0.466	2.294	1.069	0.0224	
Valores promedio de rendimiento	Homogenado						22.48	
	Microsomas						1.21	
	DRM						0.0284	

Tabla 12. Resumen de los rendimientos obtenidos en las fracciones subcelulares de homogenados, microsomas y DRMs de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* de las plantas silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a*, expuestas al inductor MFZ. Todos los datos presentados provienen de la Tabla 11. Se presentan los valores de la proteína total considerando el promedio de las preparaciones de la misma línea, pero no se indica la desviación estándar, debido a que cada preparación partió de diferente cantidad de tejido. Sin embargo, los valores presentados de rendimiento, sí consideran la cantidad de proteína total obtenida en cada preparación de acuerdo a la cantidad de tejido utilizada, expresándose en mg/g de tejido y por ello para estos valores se pueden indicar el promedio y la desviación estándar. Pf es peso fresco.

Línea de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Tejido empleado en cada preparación (g)	FRACCIONES SUBCELULARES					
		HOMOGENADOS		MICROSOMAS		DRM	
		Cantidad promedio de proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)	Cantidad promedio de proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)	Cantidad promedio de proteína total (mg)	Rendimiento (mg/g tejido)
Silvestre	n1 = 49.34 n2 = 53.4 n3 = 45.64	2488.81	16.62±3.65	113.72	0.752±0.35	0.395	0.0092±0.003
<i>Atlcb2a-1</i> (-MFZ)	n1= 24.05 n2= 68.98 n3= 39.61 n4= 38.71	1733.137	10.47±4.25	119.064	0.797±0.36	1.758	0.028±0.012
<i>Atlcb2a-1</i> (+MFZ)	n1= 11.37 n2= 41.95 n3= 56.505 n4= 49.81	3267.188	17.63±8.72	208.552	1.549±0.81	3.146	0.027±0.021
<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> (-MFZ)	n1= 10.73 n2= 60.43	1233.892	13.31±8.15	52.851	1.138±0.8	0.253	0.004±0.012
<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> (+MFZ)	n1= 15.10 n2= 34.47 n3= 40.7 n4= 47.65	3219.41	22.48±10.45	173.37	1.21±0.29	3.317	0.028±0.015

6.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.3.1. Análisis de proteínas de homogenados y fracciones microsomas, separadas por geles en una dimensión (separación por peso molecular).

La separación electroforética por peso molecular de las proteínas de los homogenados y las fracciones microsomas obtenidas de plantas de las líneas *Arabidopsis thaliana* silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a*, expuestas o no al inductor MFZ se muestran en la Figura 11. En los geles A y B se cargaron las mismas cantidades de proteína en cada carril (7 µg), de homogenados y de

fracción microsomal, así como los estándares de peso molecular. Los geles se tiñeron con dos métodos diferentes: con azul de Coomassie y con nitrato de plata. Como puede observarse, el gel B presentó más bandas y con mejor definición que el gel teñido con Azul de Coomassie, debido a que la tinción con nitrato de plata por el método de Vorum, Mortz *et al.*, (2001) tiene mayor sensibilidad.

Se puede observar que el patrón de proteínas fue muy semejante en los homogenados y en las fracciones microsomales de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a*, expuestas o no al inductor MFZ. Sin embargo, el perfil electroforético en todos los casos presentó un gran número de bandas, unas de mayor y otras de menor intensidad, lo cual hace difícil determinar si hay diferencias entre los perfiles proteicos de cada línea en este tipo de separación por peso molecular.

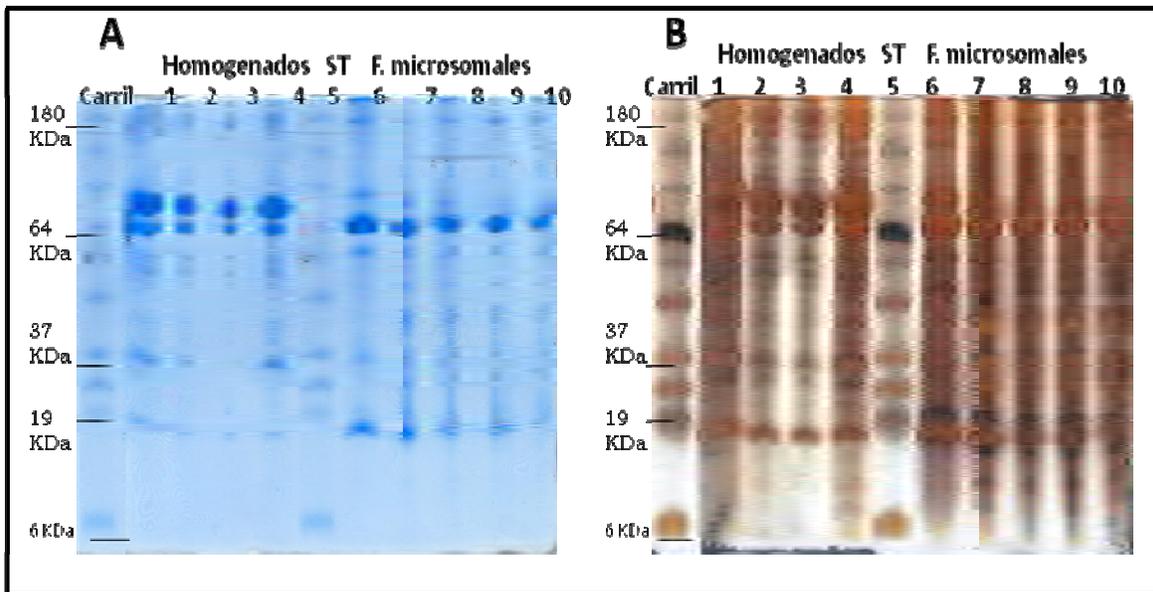


Figura 11. Separación de proteínas por peso molecular de homogenados y de fracciones microsomales de las líneas *Arabidopsis thaliana* Silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a*, expuestas o no al inductor MFZ. Comparación entre dos métodos de tinción: A: Tinción con Azul de Coomassie. B: Tinción con nitrato de plata por el método de Vorum, Mortz *et al.* (2001). En ambos geles las muestras de cada carril son: carril 1: homogenado de *AtLcb2a-1* -MFZ, carril 2: Homogenado de *AtLcb2a-1* +MFZ, carril 3: homogenado de *AtLcb2b hp/AtLcb2a* -MFZ, carril 4: homogenado de *AtLcb2b hp/AtLcb2a* +MFZ, carril 5: estándares de peso molecular, carril 6: microsomas línea silvestre, carril 7: microsomas *AtLcb2a-1* -MFZ, carril 8 microsomas *AtLcb2a-1* +MFZ, carril 9: microsomas *AtLcb2b hp/AtLcb2a* -MFZ, y en el carril 10: microsomas *AtLcb2b hp/AtLcb2a* +MFZ.

6.3.2. Separación de proteínas por enfoque isoelectrico (primera dimensión) y por peso molecular (segunda dimensión).

Para llevar a cabo un análisis comparativo más fino y preciso de las proteínas microsomales y de proteínas de las membranas resistentes a detergentes era necesario recurrir a la separación bidimensional de las proteínas de esas preparaciones, es decir separación de las proteínas primero de acuerdo a su pI y subsecuentemente de acuerdo a su masa molecular. Antes de ello, se optimizaron varios pasos del procedimiento. Estos pasos incluyeron a) la concentración y cambio de las proteínas a un medio compatible con las condiciones electroforéticas de separación por pH isoelectrico, b) la solubilización en un medio adecuado, c) la cantidad de proteína para ser separada y d) las condiciones de la electroforesis y de la tinción. A continuación se detalla cada una de estas condiciones.

a) Concentración y cambio de las proteínas a un medio compatible con las condiciones electroforéticas de separación por pH isoelectrico.- Inicialmente, el buffer en el que estaban contenidas las proteínas cuando fueron obtenidas durante el fraccionamiento de las membranas tuvo que eliminarse para ser sustituido por uno adecuado al procedimiento electroforético subsiguiente y que además limpiara la muestra de contaminantes (especialmente lípidos y detergentes) y que simultáneamente concentrara la proteína para que pudiera ser aplicada al gel de isoelectroenfoco; para esto se establecieron condiciones adecuadas de precipitación de las proteínas y se determinó la cantidad de proteína recuperada después de este paso. Los dos procedimientos probados fueron: 1) Precipitación con $MeOH-ClCH_3$ (Edman, 2002), con el que se obtuvo una recuperación de proteína del 16%, y 2) precipitación con $EtOH$ -Acetona (Carmona, 2003), con el cual se obtuvo un rendimiento del 22.5%, por lo que este método se eligió para precipitar las proteínas de cada muestra.

b) Solubilización en un medio adecuado.- La condición para la solubilización óptima de las proteínas membranales antes de ser separadas por pI se hizo basándose en Borner *et al.* (2004), que reportan como buffer de resuspensión al

Tris-HCl 10mM, pH 8.5, urea 7M, tiourea 2M, amidosulfobetaina - 14, 3 - [N, N - Dimetil (3-miristoilaminopropil) amonio] propansulfonato (ASB 14) 2%, Tritón X-100 0.5% y al que gradualmente se le hicieron modificaciones (Tabla 13). En la condición 1 se sustituyó al ASB 14 por octilglucósido a la misma concentración. La condición 2 fue igual a la 1, sólo se añadió el uso de DTT 50 mM. La condición 3 fue igual a la 2, usando ahora también CHAPS 1% y finalmente la condición 4 tuvo los mismos reactivos que la condición 3, sólo se aumentó la concentración de anfotericina B pH 3/10 de 0.6% a 1.2%. La condición marcada como número 4 en la Tabla 13, fue la que dio mejores resultados en cuanto a un mayor número de manchas de proteínas separadas y mejor resolución (ver en la Figura 12B, los geles k e l).

c) Cantidad de proteína para ser separada.- Se hicieron varios ensayos en donde se modificó la cantidad de proteína aplicada a las tiras de gel de separación por μl (5, 10, 50 y 100 μg de proteína) como se muestra en las Figuras 12A y 12B (geles b, e, f y g). Se encontró que mientras que cantidades de 50 y 100 μg de proteína parecieron ser excesivas, ya que las proteínas formaron franjas densas que no pudieron enfocarse durante la electroforesis, cantidades de 5 y 10 μg de proteína dieron el mejor patrón de separación, con manchas más definidas. La resolución y número de bandas de la separación de bajas cantidades de proteínas estuvo en función tanto de la forma de precipitación de la muestra membranaral como de las condiciones de su solubilización y electroforesis (Figuras 12A y 12B geles b y c).

d) Condiciones de la electroforesis y de la tinción.- Se probó la electroforesis de electroenfoque con dos gradientes de pH: de 3-10 y de 4-7 en las tiras de gel preformado (BIO RAD, ver Materiales y Métodos); después de obtener los patrones de separación de las proteínas por pH isoeléctrico y por peso molecular (Figura 12B, separaciones i, j, k, l), se decidió que la mejor condición era utilizar las tiras de gel preformado BIO-RAD de pH 4-7, ya que al usar las tiras de pH 3-10, se observaba una aglomeración de proteínas en el centro del gel (Figura 12B, gel i), obstaculizando la distinción clara de cada mancha. En cambio,

al usar las tiras de pH 4-7, se observó una mejor distribución de las manchas a lo ancho del gel (Figura 12B, geles j, k, l); por lo tanto este gradiente de pH de 4-7 en las tiras fue el seleccionado para realizar el electroenfoque y posteriormente la separación por peso molecular de las proteínas de las muestras, además de que se dejó sobrecorrer el gel durante 30 min (consistente en que después de que salió el frente de corrida del gel se corrió 30 min más). Para tener una mejor detección, posteriormente se realizó la tinción con nitrato de plata por el método de Vorum (Mortz *et al.*, 2001), sin hacer antes la tinción con Coomassie en el mismo gel, proceso que producía un fondo muy oscuro (Figura 12A, 12B, geles b, c y g), lográndose entonces un fondo más claro para visualizar mejor cada mancha (Figura 12A, 12B, geles a, d, h, i, j, k y l). Para hacer denotar cada mancha en los geles que se muestran en las Figuras 12A y 12B se marcaron con triángulos azules. En esta Figura, en los geles b, c y g, sólo lograron distinguirse de 6 a 8 proteínas, mientras que en las separaciones mostradas en los geles a, e, f, h y j se identificaron de 14 a 19 proteínas. Por último, en las separaciones de los geles d, i, k y l se identificaron de 22 a 43 proteínas, siendo la separación l en la que se observó el mayor número de manchas (43).

Resumiendo los resultados anteriores, se determinó que las mejores condiciones para separación por pI y por peso molecular fueron: utilizar 5 µg de proteína membranal, solubilizándola en la condición de solubilización 4 (Tabla 13) basada en Borner *et al.* (2004), hacer la separación por pI en un gradiente de pH de 4-7, hacer la separación por peso molecular sobrecorriendo el gel durante 30 min y una vez terminada esta segunda dimensión, no teñir con Azul de Coomassie, sólo con nitrato de plata por el método de Vorum (Mortz *et al.*, 2001).

Tabla 13. Condiciones de solubilización de las proteínas de las muestras membranales. Se probaron 4 diferentes condiciones basadas en Borner *et al.*, (2004). En negritas se marcan los cambios que se introdujeron.

Condición de solubilización	Reactivos
1	Anfolinas pH 3/10 0.6%, Tris-HCl pH 8.5 10 mM, Urea 7M, Tiourea 2M, Octilglucósido 2% , TX-100 0.5%.
2	Anfolinas pH 3/10 0.6%, Tris-HCl pH 8.5 10 mM, Urea 7M, Tiourea 2M, Octilglucósido 2%, TX-100 0.5%, DTT 50mM .
3	Anfolinas pH 3/10 0.6%, Tris-HCl pH 8.5 10 mM, Urea 7M, Tiourea 2M, Octilglucósido 2%, TX-100 0.5%, DTT 50 mM, CHAPS 1% .
4	Anfolinas pH 3/10 1.2% , Tris-HCl pH 8.5 10 mM, Urea 7M, Tiourea 2M, Octilglucósido 2%, TX-100 0.5%, DTT 50 mM, CHAPS 1%.

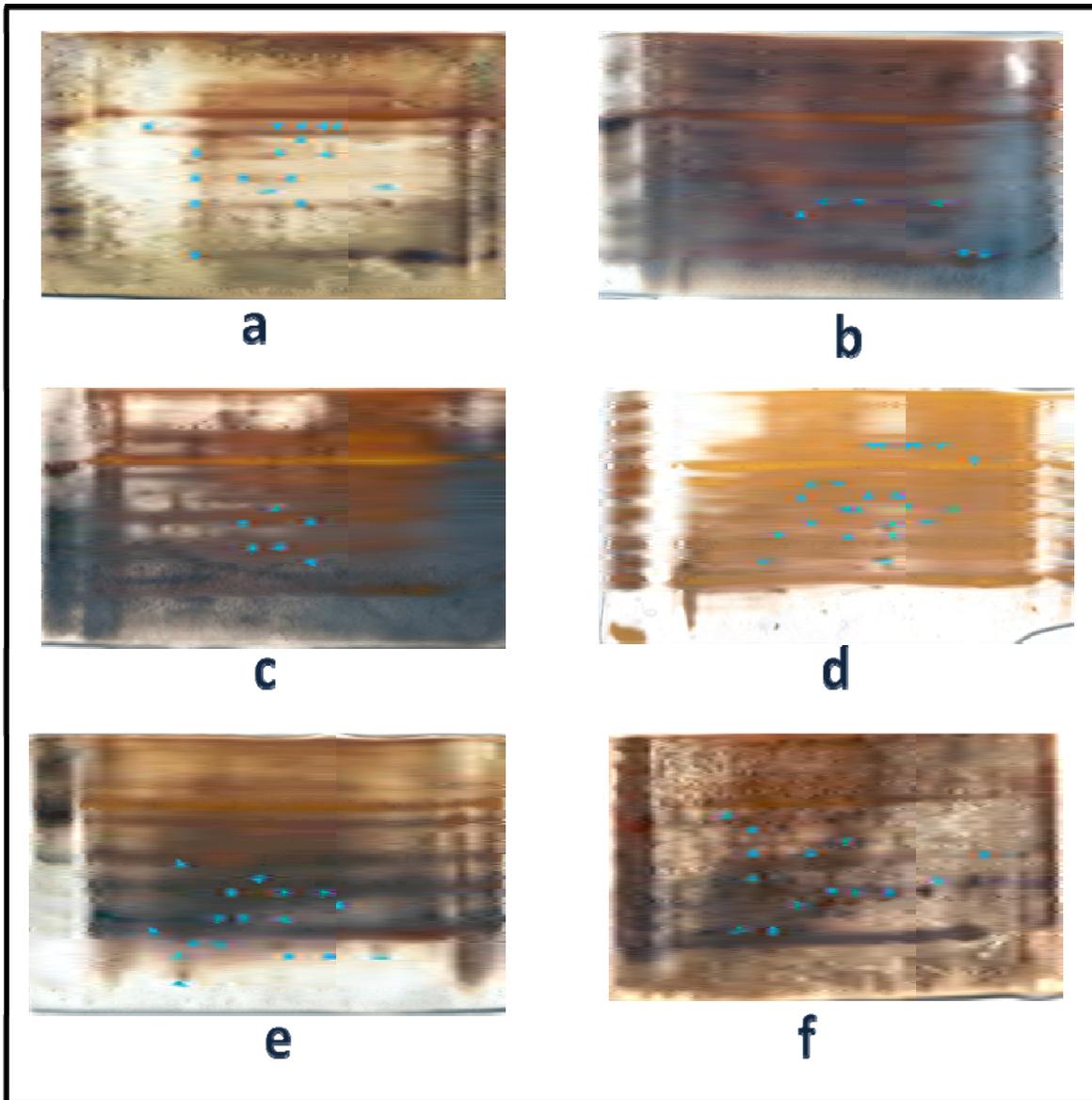


Figura 12A. Establecimiento de las condiciones de separación por pH Isoeléctrico y por Peso Molecular de proteínas membranales. Se muestran los geles 2-D obtenidos con diferentes condiciones en cuanto a la cantidad de proteína, las condiciones de concentración y de solubilización y las de separación electroforética. Se utilizaron proteínas de una muestra de microsomas. **a.** 5 μ g de proteína solubilizada en la condición de solubilización 3 (Tabla 13), Borner *et al.* (2004), condiciones de corrida: S1- 250 volt (15min), S2-4000 v (2h), S3- 4000 v, 20000 v/h, gradiente de pH 4-7. **b.** 100 μ g de proteína precipitada con EtOH/Acetona y solubilizada en la condición de solubilización 3 (Tabla 13), Borner *et al.*, (2004), gradiente de pH 4-7, condiciones de corrida: 5 000 volts. **c.** 100 μ g de proteína precipitada con MeOH-CHCl₃ y solubilizada en mismas condiciones que B, gradiente de pH 4-7. **d.** 100 μ g de proteína solubilizada en la condición de solubilización 1 (Tabla 13), Borner *et al.*, (2004) gradiente de pH 4-7. **e.** 50 μ g de proteína solubilizada en la condición de solubilización 3 (Tabla 13), Borner *et al.*, (2004), gradiente de pH 4-7. **f.** 10 μ g de proteína solubilizada en buffer 2D (Urea 8 M, CHAPS 2% p/v, Anfolinas 2% p/v, Azul de bromofenol (trazas), pH 4-7. Con los triángulos azules se indican las proteínas más visibles.

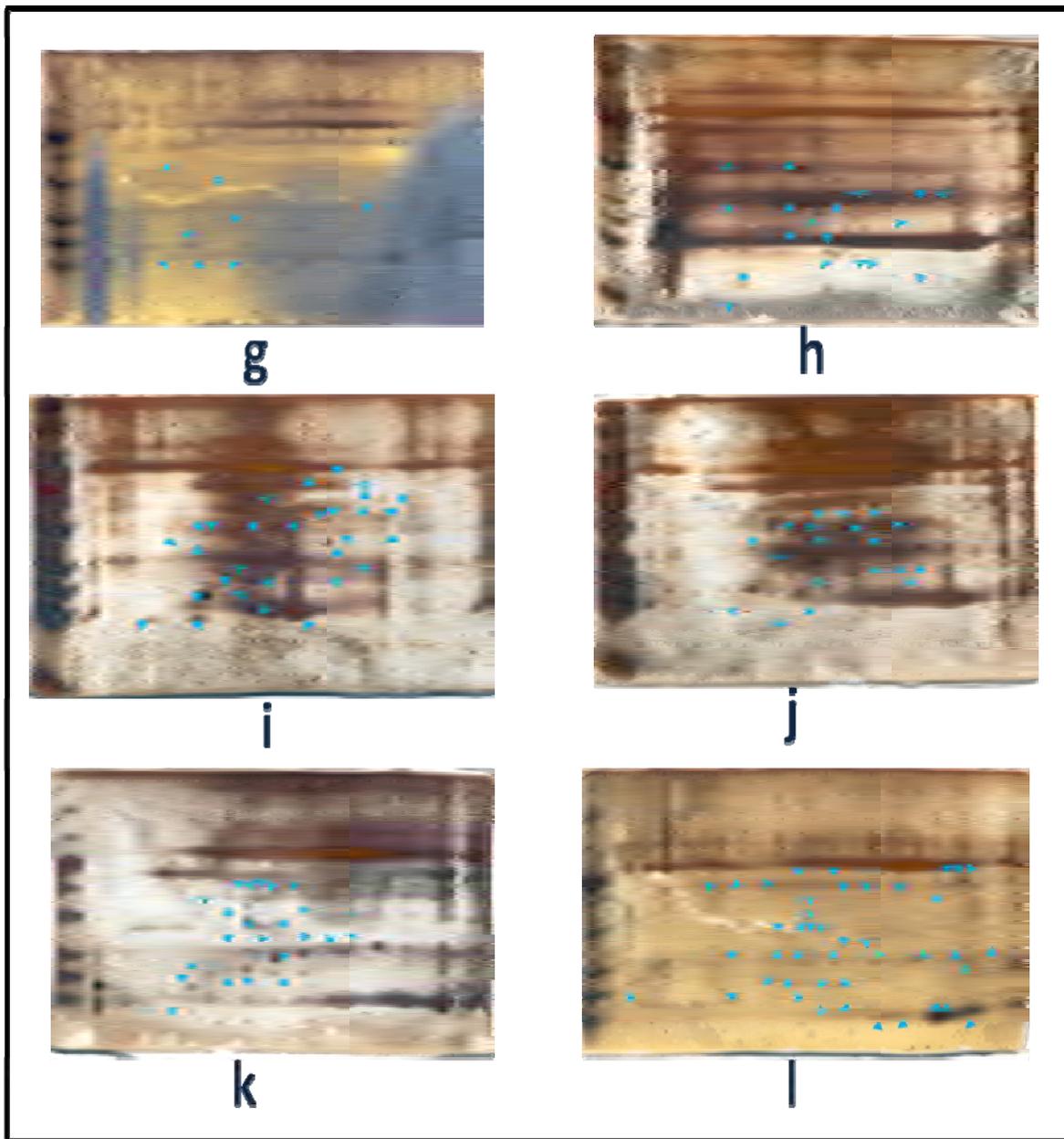


Figura 12 B. Establecimiento de las condiciones de separación por Punto Isoeléctrico y por Peso Molecular de proteínas membranales. Se utilizaron proteínas de una muestra de microsomas. Se muestran los gels 2-D obtenidos con diferentes condiciones en cuanto a la cantidad de proteína, las condiciones de concentración y de solubilización y las de separación electroforética. **g.** 5 μ g de proteína precipitada con MeOH-CHCl₃ solubilizada en la condición de solubilización 3 (Tabla 13), Borner *et al.*, (2004), gradiente de pH 4-7. **h.** 50 μ g de proteína solubilizada en la condición de solubilización 3 (Tabla 13), Borner *et al.*, (2004), pH 4-7. **i.** 10 μ g de proteína solubilizada en mismas condiciones que B, gradiente de pH 3-10. **j.** 10 μ g de proteína solubilizada en mismas condiciones que B, gradiente de pH 4-7. **k.** 5 μ g de proteína solubilizada en las mismas condiciones que B, gradiente de pH 4-7, sobrecorrido 1 h. **l.** 5 μ g de proteína solubilizada en la condición 4 (Tabla 13), Borner *et al.* (2004), sobrecorrido 30 min, sin pre-teñir en Coomassie. Con los triángulos azules se indican las proteínas más visibles.

6.3.3. Análisis de proteínas de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0, silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/Atlcb2a*) con y sin inductor, en geles 2D con fluorescencia diferencial (2D-DIGE).

El proceso de establecimiento de condiciones de separación por doble dimensión de proteínas membranales en las que se usó una muestra de fracción microsomal del ecotipo silvestre Col-0, puso en evidencia que con el sistema de separación bidimensional de proteínas integrado por la primera dimensión en tiras de gel preformado con anfolinas inmovilizadas y por la segunda dimensión en geles desnaturizantes de tricina (Schägger y Von Jagow, 1987), se lograba una separación de alrededor de 40 proteínas, pero la resolución de las manchas y su número eran bajos, ya que se espera que estas fracciones membranales microsomales contuvieran un número mayor de proteínas de alrededor de un orden de magnitud superior. Sin embargo, en los DRM se esperaban poblaciones bastante menores de proteínas. Por ello, se resolvió separar a las proteínas de los DRM de las diferentes líneas con un método automatizado mucho más sensible que podía detectar más proteínas y con un mayor nivel de resolución. Por lo anterior, las muestras de DRM fueron analizadas por el sistema de geles 2D con fluorescencia diferencial (2D-DIGE). Este método usa una primera separación de las proteínas por pI en tiras de gel preformado y una segunda separación en geles desnaturizantes de Laemmli (Laemmli, 1970).

Las muestras de DRM que fueron separadas por esta técnica requirieron de una cantidad mayor de proteína para su separación. Al término de la corrida se sacaron los geles de la cámara y se colocaron en el cartucho para escanearlos individualmente en el equipo Ettan DIGE Image, obteniéndose las imágenes correspondientes a cada muestra. Estas imágenes fueron analizadas con el programa DeCyder 2D Software, versión 6.5, primero con el módulo DIA y posteriormente con el módulo BVA. Hay que hacer notar que en esta técnica se cargan en un mismo gel las muestras que se quieren contrastar, cada una marcada con un fluoróforo diferente y además se aplica también como un estándar

interno, la mezcla de proteínas marcadas con un tercer fluoróforo provenientes de todas las muestras diferentes que se van a contrastar en total en todos los geles. Al hacerse el análisis de cada gel por el programa DeCyder 2D, cada muestra se visualiza separadamente de la otra gracias a que están marcadas con fluoróforos cuyas emisiones de fluorescencia son a longitudes de onda diferentes. Ya que se tenían preparaciones de DRM de cinco diferentes fuentes: Silvestre (Col-0), *AtLcb2a-1* sin y con inductor, *AtLcb2b hp/Atlcb2a* sin y con inductor, se eligió contrastar dos líneas en las siguientes combinaciones, mezclando las preparaciones de DRM de la siguiente forma:

At Silvestre sin MFZ y *AtLcb2a-1* sin MFZ

AtLcb2a-1 más MFZ y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* más MFZ

AtLcb2b hp/Atlcb2a sin MFZ y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* más MFZ

En las Figuras 13 A, B y C, se muestran las imágenes de fluorescencia de la separación en doble dimensión de las muestras de DRMs de *A. thaliana*, líneas silvestre (Col-0) *AtLcb2a-1* con y sin inductor, y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* con y sin inductor. En la misma figura se presentan geles duplicados de la misma combinación de líneas.

Se puede observar que en los geles duplicados de la misma muestra de DRM hubo variaciones en la intensidad de la fluorescencia de las manchas proteicas y en la migración total de las manchas en cada gel. Sin embargo, el patrón de movilidad relativo de cada mancha con respecto a las otras en su propio gel, se conservó. Por eso fue importante hacer una selección manual de las manchas de proteínas más probables.

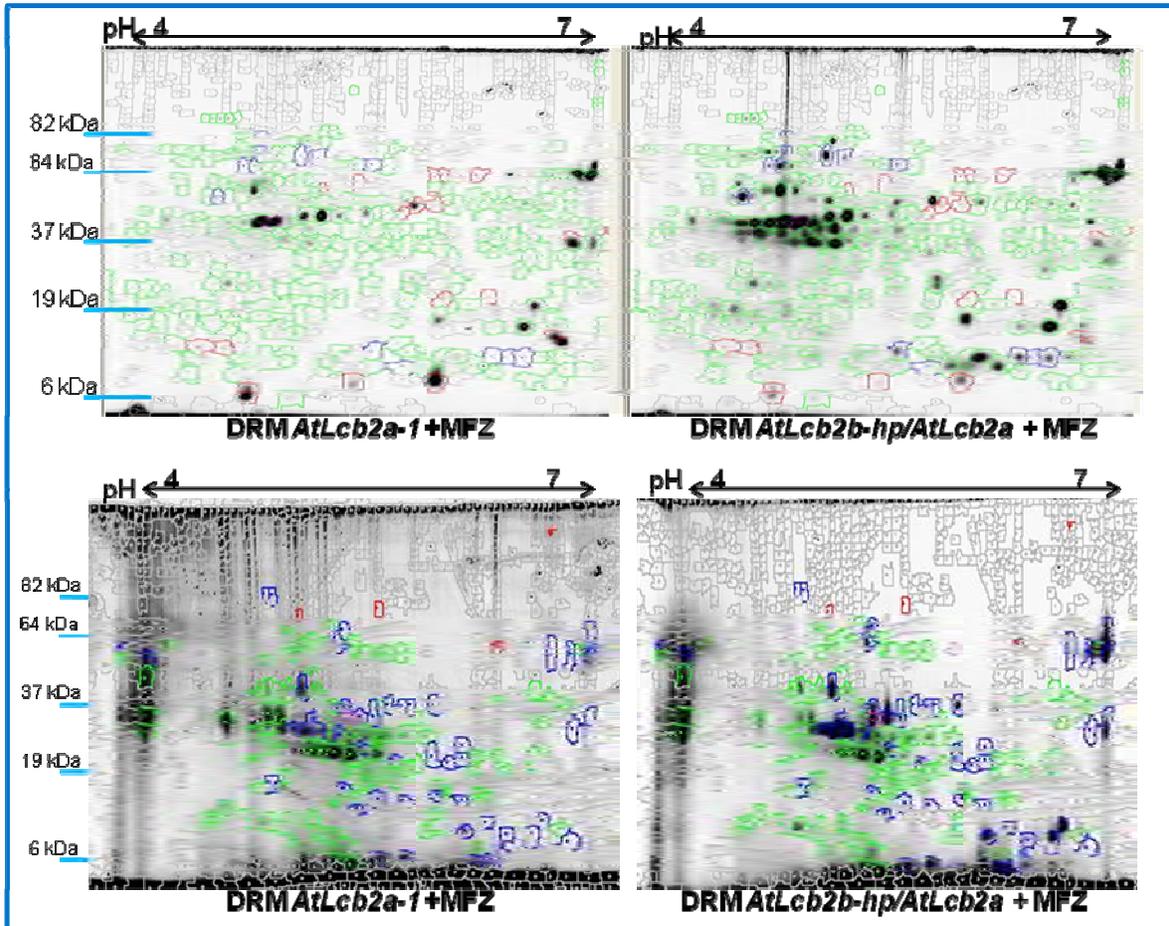


Figura 13A. Separación de proteínas de DRM de *A. thaliana*, líneas *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* más inductor en gels en doble dimensión. Se presenta el resultado obtenido al analizar 40 μ g de proteínas de las muestras de DRMs de *A. thaliana*, líneas *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* más inductor metoxifenozida (MFZ); las proteínas se marcaron con los fluorocromos Cy3 y Cy5. Luego se aplicaron a una tira de gel de inmobilinas y posteriormente las proteínas separadas por su pI se separaron electroforéticamente en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE). Cada gel se analizó con el programa DeCyder (módulo DIA), para identificar la intensidad de las manchas y de acuerdo a ella se hizo una selección manual de las manchas que podían corresponder a proteínas. Se realizó la discriminación de las manchas de proteínas de las manchas no proteicas o de fondo, descartándose las manchas marcadas con gris y en verde, rojo y azul se marcan aquellas seleccionadas como probables proteínas. Se presentan los gels duplicados de la misma línea.

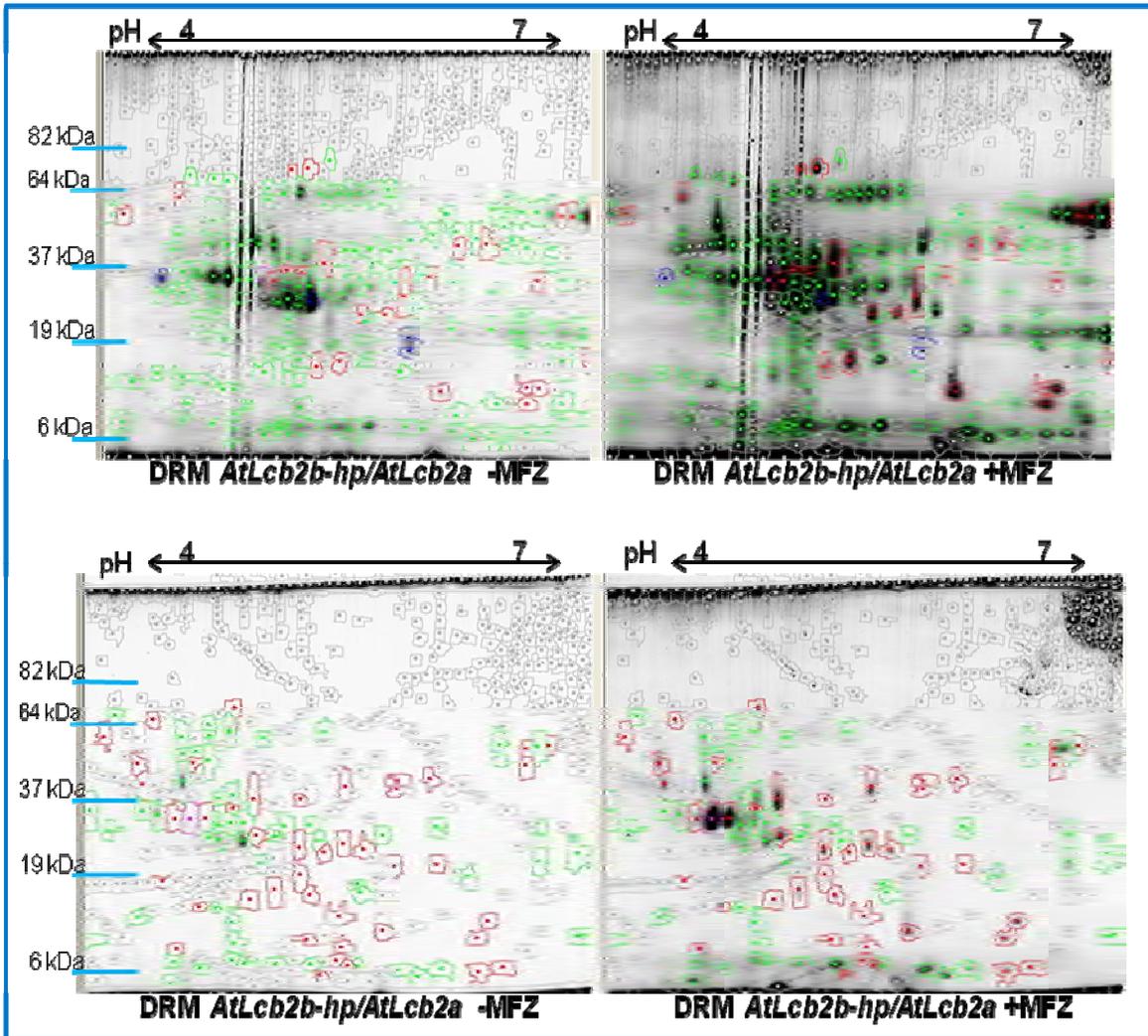


Figura 13B. Separación de proteínas de DRM de *A. thaliana*, líneas *AtLcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* más inductor en geles en doble dimensión. Se presenta el resultado obtenido al analizar 40 µg de proteínas de las muestras de DRMs de *A. thaliana*, líneas *AtLcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor y *AtLcb2b hp/Atlcb2a* más inductor; las proteínas se marcaron con los fluorocromos Cy3 y Cy5. Luego se aplicaron a una tira de gel de inmobilinas y posteriormente las proteínas separadas por su pI se separaron electroforéticamente en un gel desnaturizante (SDS-PAGE). Cada gel se analizó con el programa DeCyder (módulo DIA), para identificar la intensidad de las manchas y de acuerdo a ella se hizo una selección manual de las manchas que podían corresponder a proteínas. Se realizó la discriminación de las manchas de proteínas de las manchas no proteicas o de fondo, descartándose las manchas marcadas con gris y en verde, rojo y azul se marcan aquellas seleccionadas como probables proteínas. Se presentan los geles duplicados de la misma línea.

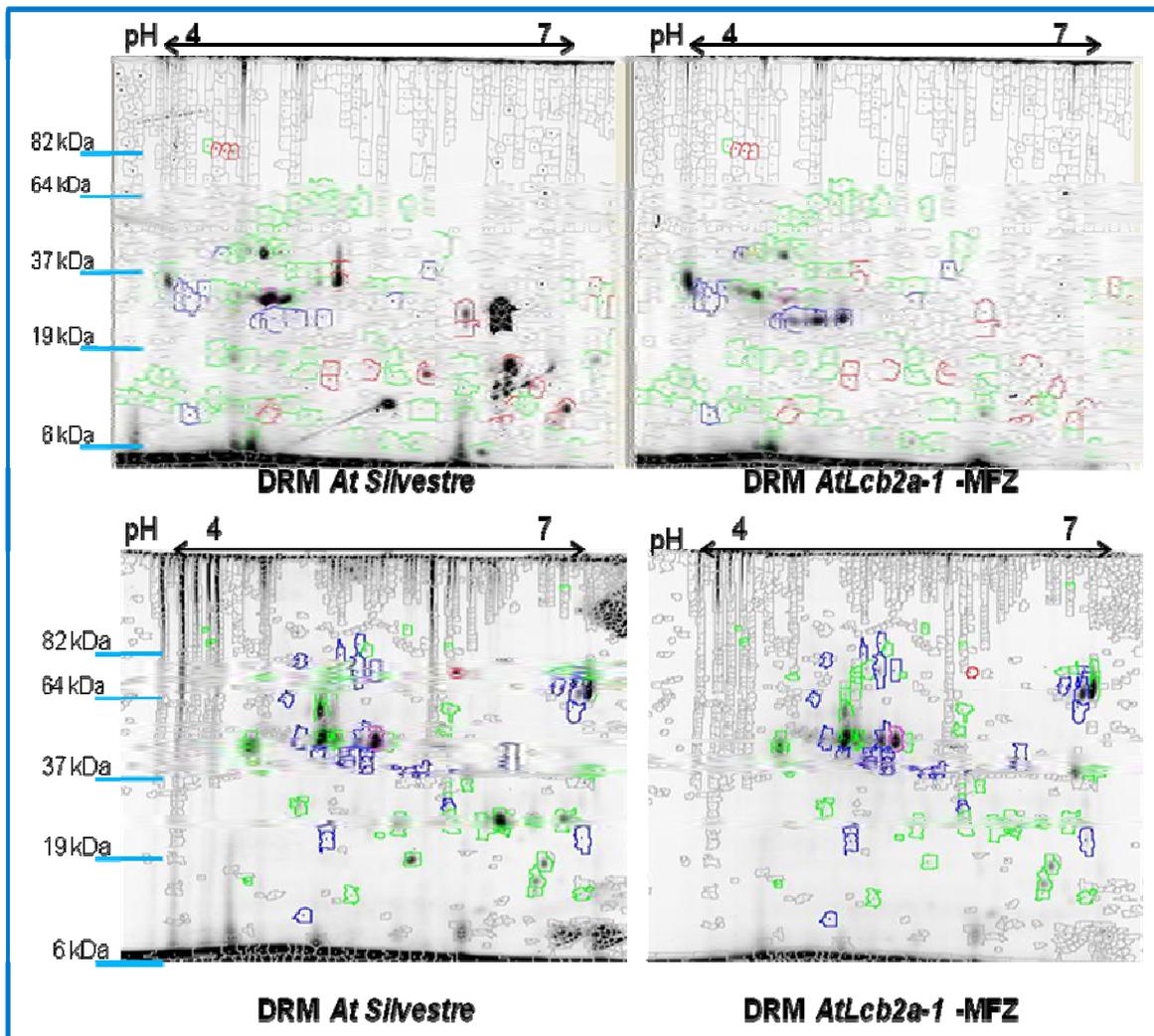


Figura 13C. Separación de proteínas de DRM de *A. thaliana*, líneas *At Silvestre* y *AtLcb2a-1* sin inductor en geles de doble dimensión. Se presenta el resultado obtenido al analizar 40 μ g de proteínas de las muestras de DRM de *A. thaliana*, líneas *At Silvestre* y *AtLcb2a-1* sin inductor; las proteínas se marcaron con los fluorocromos Cy3 y Cy5. Luego se aplicaron a una tira de gel de inmobilinas y posteriormente las proteínas así separadas se separaron electroforéticamente en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE). Cada gel se analizó con el programa DeCyder (módulo DIA), para identificar la intensidad de las manchas y de acuerdo a ella se hizo una selección manual de las manchas que podían corresponder a proteínas. Se realizó la discriminación de las manchas de proteínas de las manchas no proteicas o de fondo, descartándose las manchas marcadas con gris y en verde, rojo y azul se marcan aquellas seleccionadas como probables proteínas. Se presentan los geles duplicados de la misma línea.

Después de haber hecho la discriminación de manchas se llegó a los resultados presentados en la Tabla 14, en donde se muestran el número de posibles proteínas detectadas en cada gel, indicándose cuántas de éstas son

RESULTADOS

similares, cuántas de éstas decremantan de una muestra a otra en cada gel y cuántas de éstas se incrementan de una muestra a otra.

Tabla 14. Se enlistan las proteínas detectadas en total en cada par de muestras analizadas y cuales proteínas que son similares, cuales proteínas decremantan de una a otra muestra y las proteínas que incrementan de una a otra muestra; así como el porcentaje del total de proteínas, al que corresponde cada una de ellas.

No. de gel	Muestras de DRM en cada gel	Total proteínas detectadas	Proteínas similares en ambas líneas		Proteínas que disminuyen su abundancia		Proteínas que Incrementan su abundancia	
			#	%	#	%	#	%
1	<i>At Silvestre -MFZ</i>	90					11	9.9
			79	71.2				
	<i>AtLcb2a-1 -MFZ</i>	100			21	18.9		
2	<i>At Silvestre -MFZ</i>	129					35	25.2
			94	67.6				
	<i>AtLcb2a-1 -MFZ</i>	104			10	7.2		
3	<i>AtLcb2a-1 +MFZ</i>	258					13	4.7
			245	87.8				
	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ</i>	266			21	7.5		
4	<i>AtLcb2a-1 +MFZ</i>	151					48	31
			103	66.5				
	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ</i>	107			4	2.6		
5	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ</i>	105					45	42.9
			60	57.1				
	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a -MFZ</i>	60			0	0		
6	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ</i>	194					28	14.1
			166	83.8				
	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a -MFZ</i>	170			4	2		

Registro coloreado de fluorescencia de las proteínas separadas bidimensionalmente de los DRM de las líneas *A. thaliana* (Silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a*).

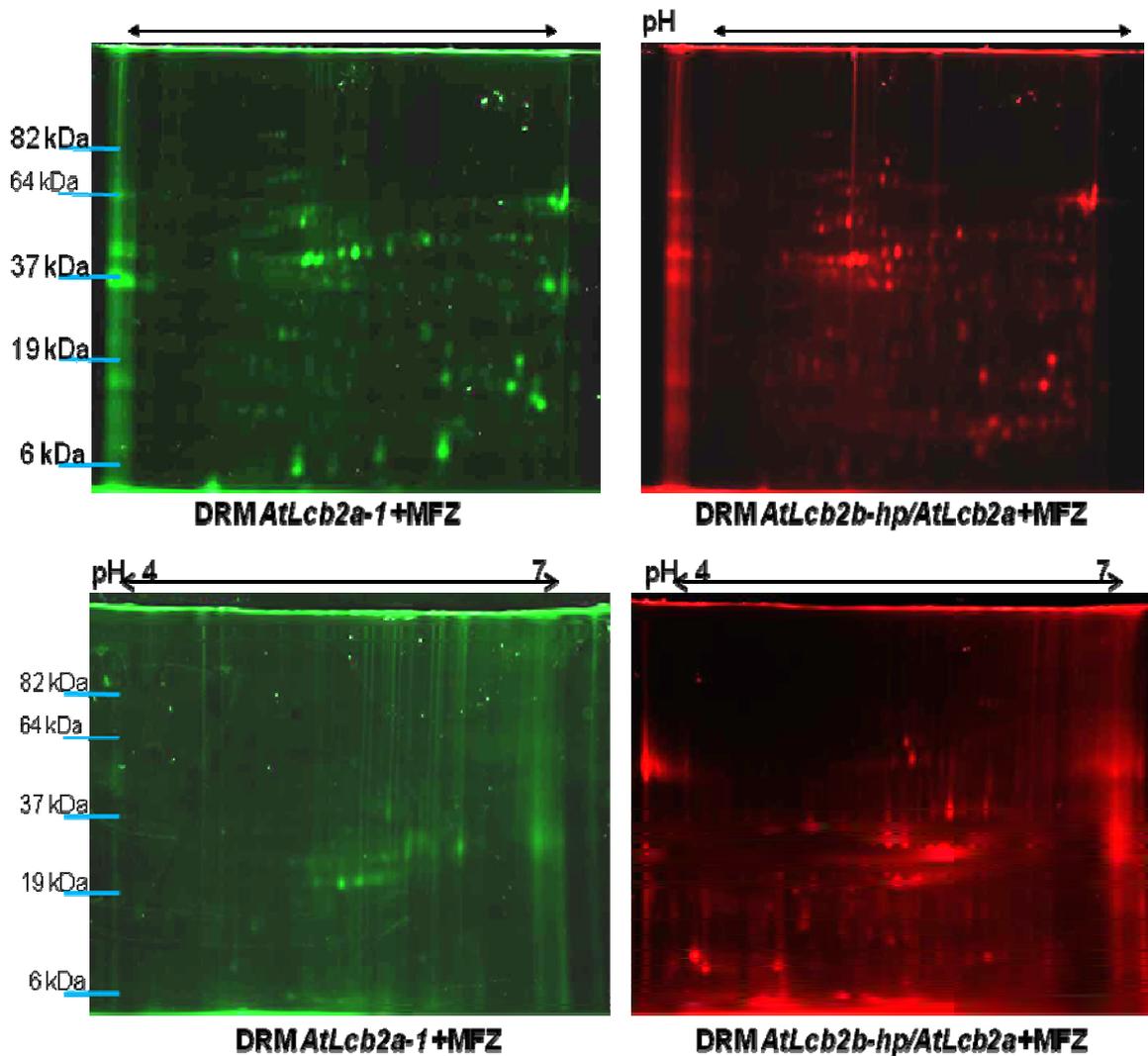


Figura 14 A. Los gels fueron barridos para detectar la fluorescencia con el equipo Ettan DIGE Image, posteriormente con la ayuda del software Image Quant TL V2005 1Dgel analysis (Amersham Biosciences), se lograron obtener las imágenes coloridas de cada gel, en esta figura se muestran los gels correspondientes a las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2a-1* más inductor y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor, los cuales fueron marcados con Cy3 y Cy5 respectivamente.

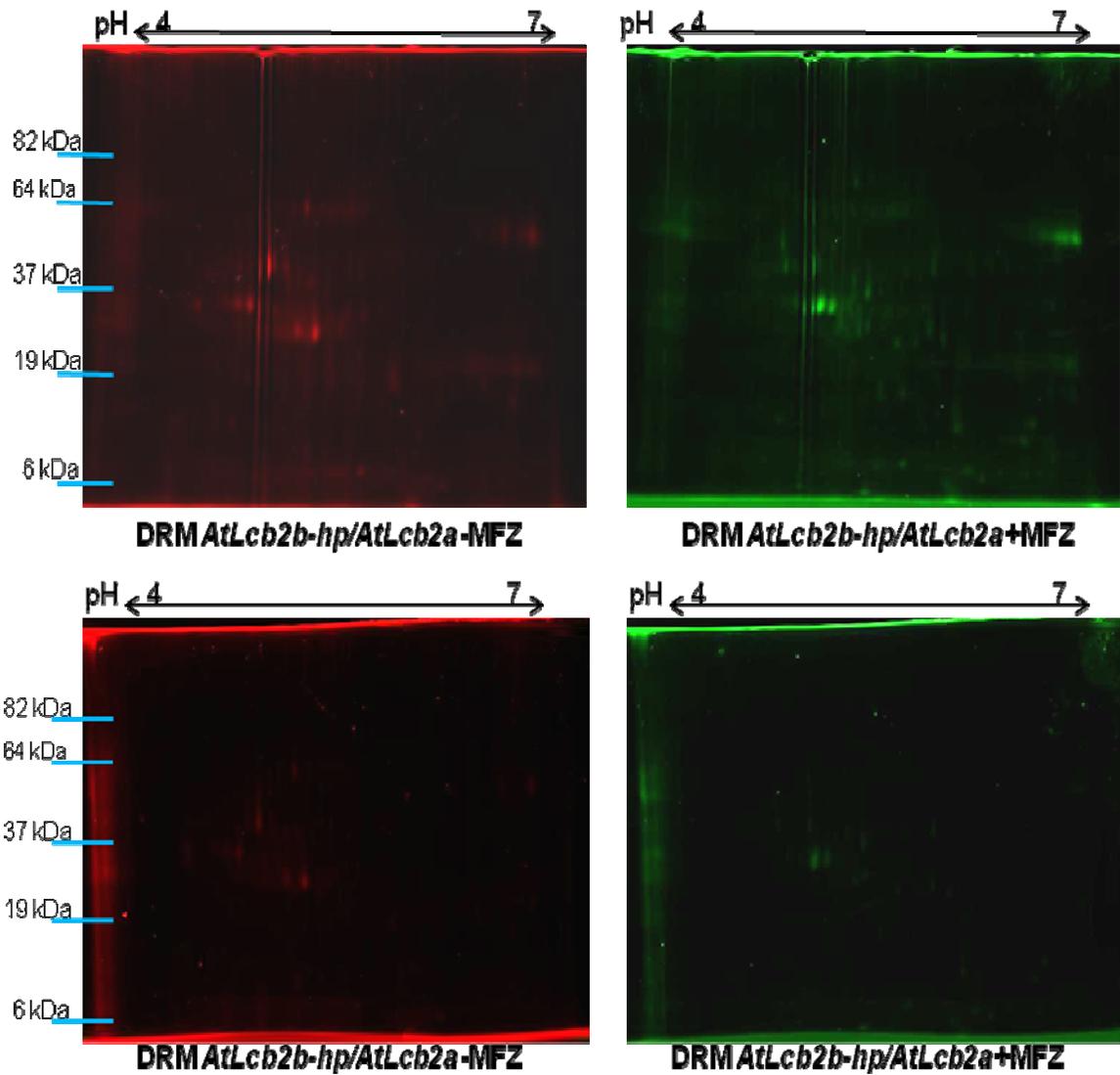


Figura 14 B. Los geles fueron barridos para detectar la fluorescencia con el equipo Ettan DIGE Image, posteriormente con la ayuda del software Image Quant TL V2005 1Dgel analysis (Amersham Biosciences), se lograron obtener las imágenes coloridas de cada gel, en esta figura se muestran los geles correspondientes a las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2b-hp/AtLcb2a* menos inductor y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor, los cuales fueron marcados con Cy5 y Cy3 respectivamente.

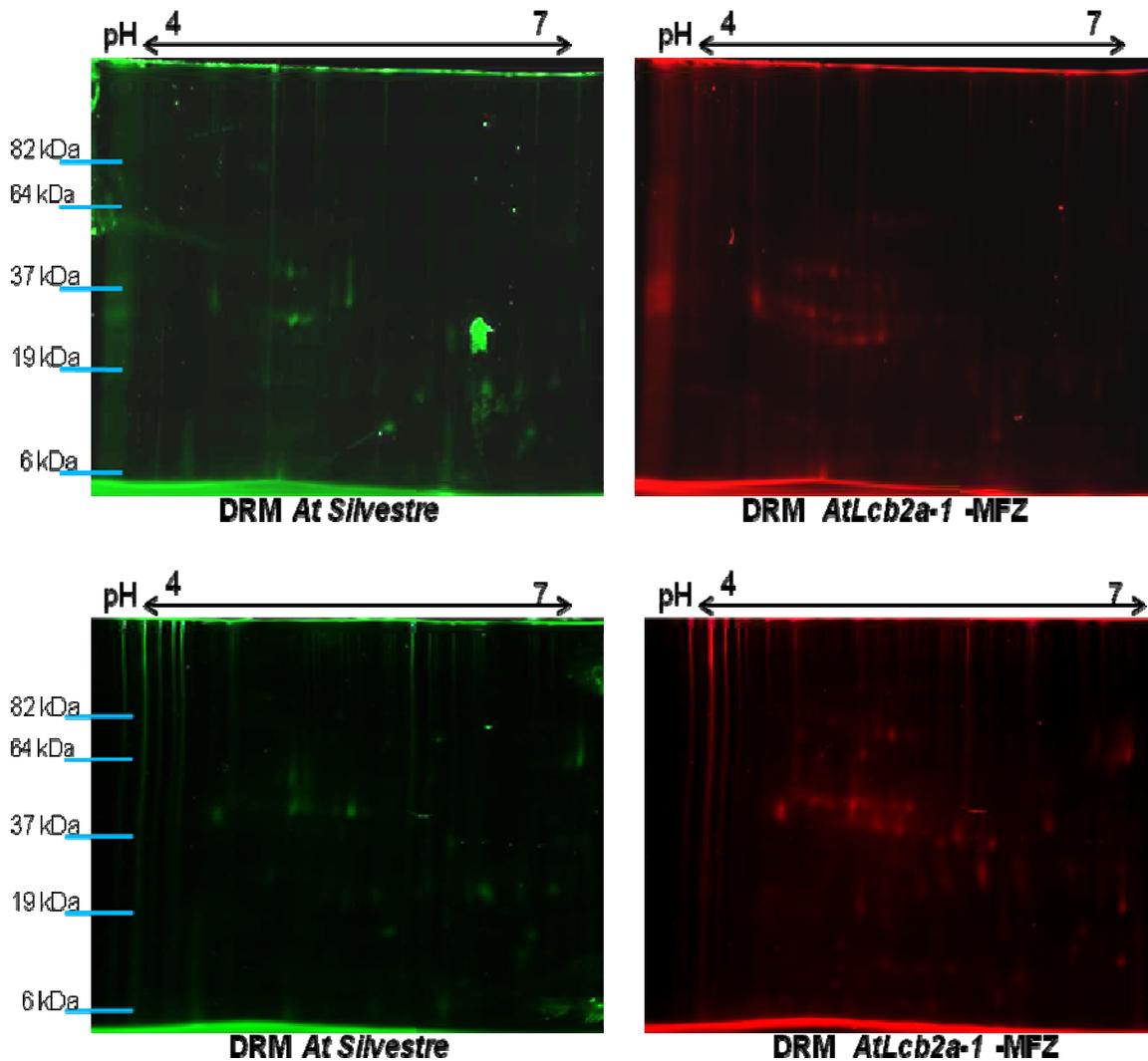


Figura 14 C. Los geles fueron barridos para detectar la fluorescencia con el equipo Ettan DIGE Image, posteriormente con la ayuda del software Image Quant TL V2005 1Dgel analysis (Amersham Biosciences), se lograron obtener las imágenes coloridas de cada gel, en esta figura se muestran los geles correspondientes a las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana AtSilvestre* y *AtLcb2a-1* menos inductor, los cuales fueron marcados con Cy3 y Cy5 respectivamente.

Posteriormente se realizó el establecimiento del perfil de proteínas (Matching), en los geles de todas las líneas de DRMs *Silvestre*, *AtLcb2a-1*, *AtLcb2b hp/AtLcb2a* y en todas las condiciones probadas (con y sin inductor MFZ). En la Figura 15 se presenta un ejemplo en el que el programa DeCyder, módulo BVA, identifica aquellas manchas de proteínas que se encuentran presentes en todos los geles (6) de todas las líneas y condiciones, las cuales son aquellas señaladas con líneas verdes.

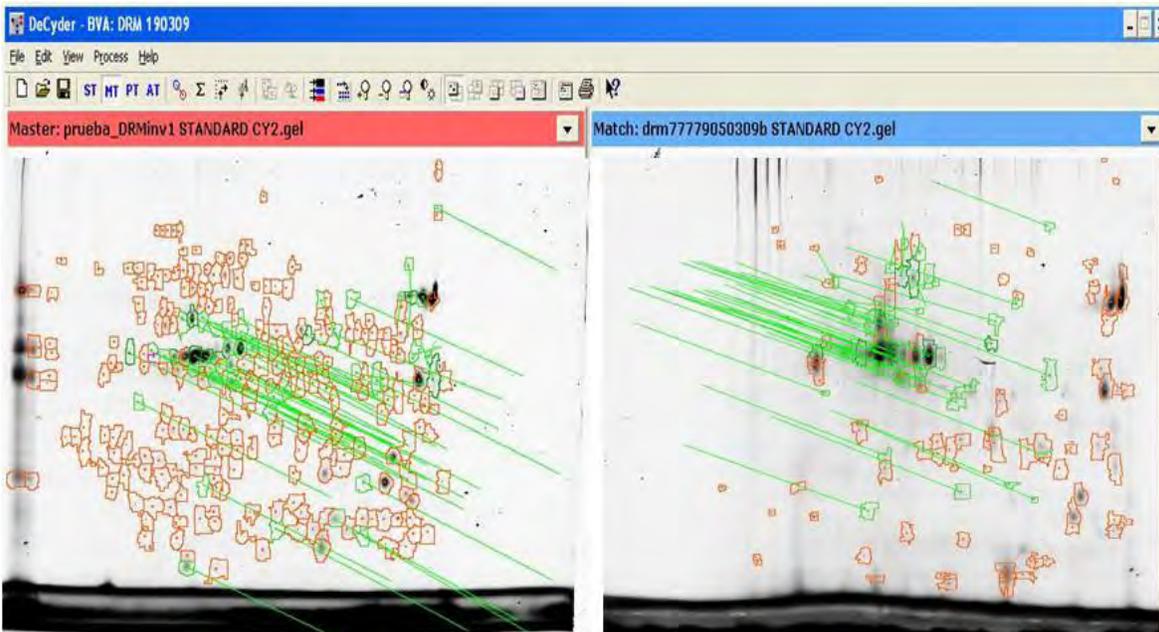


Figura 15. Establecimiento del perfil de proteínas (Matching), en los geles de todas las líneas de DRMs *Silvestre*, *AtLcb2a-1*, *AtLcb2b hp/AtLcb2a* y en todas las condiciones probadas (con y sin inductor MFZ). Se observa un ejemplo de análisis con el software DeCyDer módulo BVA, en el que la función “*matching*”, detecta simultáneamente todas las proteínas similares, en todas las imágenes obtenidas de los geles con el equipo Ettan DIGE Image. Las proteínas que el programa detecta son similares y las marca con un vector color verde.

Después de haber el hecho el “*matching*”, se continuó con el análisis estadístico de las proteínas detectadas, con el fin de determinar si entre las proteínas de cada muestra había variabilidad biológica significativa ($p \leq 0.05$). Ésta es una comparación cuantitativa del nivel de expresión de cada proteína detectada, en cada gel. Dicho análisis se hizo por parejas de muestras, como se

RESULTADOS

muestra en la Figura 16, en donde se observa un ejemplo del análisis de comparación y cuantificación de las manchas de proteínas de las muestras de DRMs de *Arabidopsis thaliana* *AtSilvestre* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor. Posteriormente, en la Tabla 15, se muestran las parejas de muestras de DRMs comparadas, así como los resultados obtenidos de la intensidad de cada mancha y el resultado de la prueba estadística de T-Student ($p \leq 0.05$).

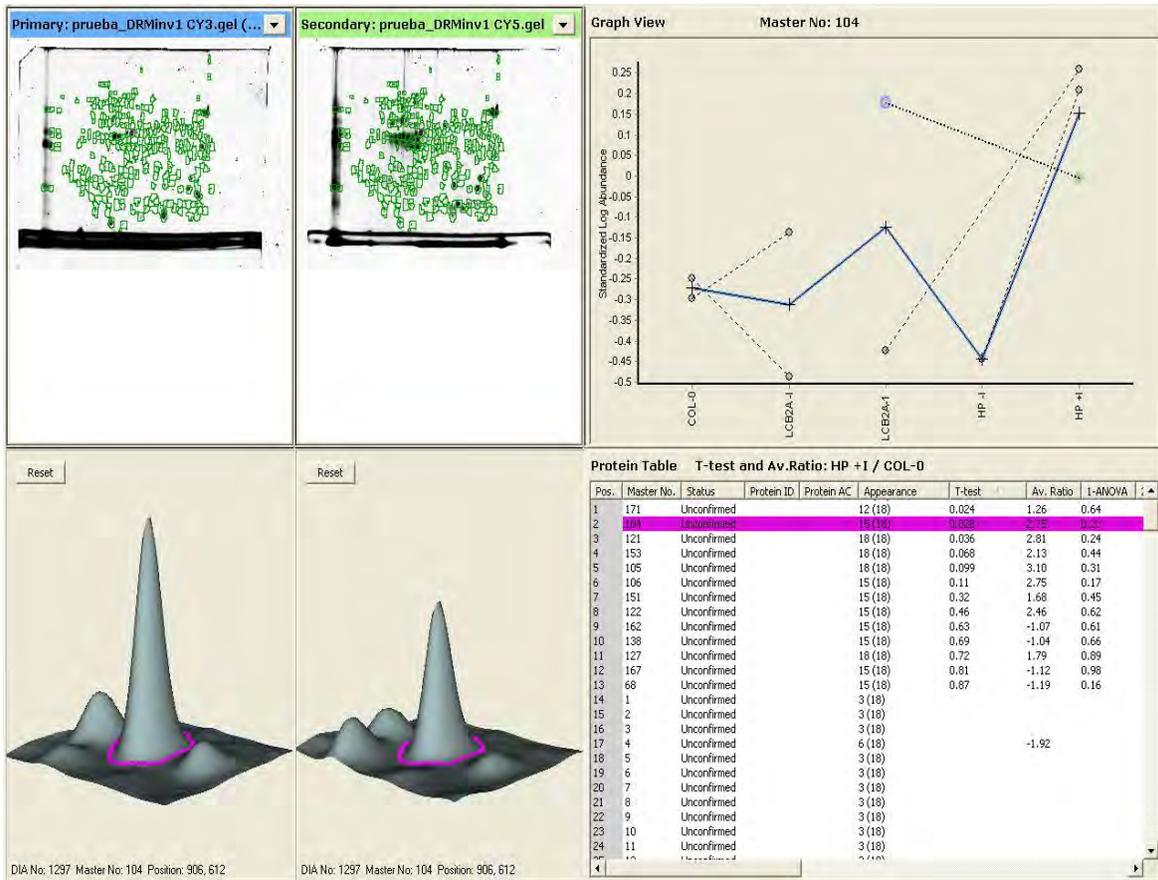


Figura 16. Análisis de comparación y cuantificación de las manchas de proteínas equivalentes encontradas en los gels. En este análisis se hizo la comparación de patrones proteicos entre dos muestras. En la figura se muestra el caso de la comparación entre las imágenes de las muestras de DRMs de *Arabidopsis thaliana* *AtSilvestre* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor (panel superior izquierdo). El análisis de esta comparación muestra las relaciones promedio en los cambios de intensidad en cada mancha (Av. Ratio), con su correspondiente probabilidad calculada de acuerdo a la t-Student (T-test) (panel inferior derecho). El renglón marcado en rosa, muestra la 2ª de las 3 proteínas con valores estadísticos más confiables y cuyas intensidades en ambos gels corresponden a los picos mostrados en el panel inferior izquierdo. Esta mancha al ser analizada en otros gels presenta las intensidades graficadas en la figura del panel superior derecho. Este mismo análisis se hizo para todas las proteínas con cambios de intensidad de alta significancia estadística.

Tabla 15. Proteínas que presentaron variabilidad biológica significativa $p \leq 0.05$, se menciona las muestras de DRMs que se compararon, el número de proteína, la t-Student obtenida en la prueba estadística, con el módulo DeCyder-BVA, la abundancia de dicha proteína (Av. Ratio) y en la última columna el análisis de varianza (1-ANOVA).

Muestras de DRM de <i>Arabidopsis thaliana</i> comparadas	No. de proteína	T- Student	Relación promedio	1- ANOVA
<i>AtLcb2a-1</i> +MFZ y <i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> +MFZ	37	0.047	2.22	0.047
	39	0.037	2.72	0.037
	52	0.029	-4.96	0.029
	108	0.050	1.39	0.050
	146	0.028	2.71	0.028
	203	0.039	1.80	0.039
	216	0.049	2.99	0.049
	218	0.025	1.44	0.025
	253	0.0035	1.49	0.0035
<i>At Silvestre</i> y	104	0.028	2.75	0.23
	121	0.036	2.81	0.24
<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> +MFZ	171	0.024	1.26	0.64
<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> -MFZ y	51	0.033	5.20	0.055
	76	0.033	2.41	0.033
<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> +MFZ	148	0.021	1.59	0.079
<i>AtLcb2a-1</i> -MFZ y	68	0.034	4.34	0.16
	104	0.069	2.79	0.23
<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i> +MFZ				
<i>At silvestre</i> y <i>AtLcb2a-1</i> +MFZ	121	0.0072	1.61	0.24

De los resultados obtenidos con el análisis estadístico, se procedió a marcar las proteínas mencionadas en la Tabla 15 en la imagen de un gel; con el fin de dar una ubicación aproximada de dichas proteínas (Figura 17). Se observó que la mayoría de estas proteínas se encuentran ubicadas en una zona de separación de pI aproximadamente entre pH 4.7-6 y con pesos moleculares entre 19 kDa y 64 kDa.

Conjuntamente, a partir del análisis estadístico se obtuvieron también las gráficas de variación de intensidades (Figuras 18 a 22) de cada par de muestras comparadas, las cuales nos servirán para hacer una discriminación más precisa de las proteínas que presentaron mayor variabilidad biológica. Se detectaron 9 proteínas, que presentan variabilidad biológica significativa

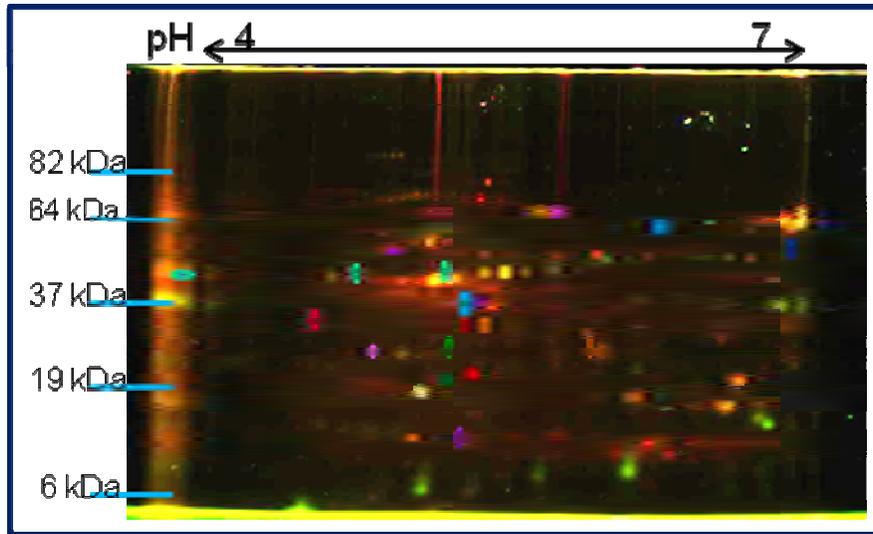


Figura 17. Ubicación de las proteínas con variación biológica significativa. Se muestra un gel en el que fueron marcadas las proteínas mencionadas en la Tabla 15, con el fin de dar una ubicación aproximada de éstas.

Tabla 16. Equivalencia de las líneas numeradas en las Figuras 18 a 22 en el eje de las abscisas. Se asignó un número de equivalencia a las plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas Silvestre *Col-0*, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* tratadas y sin tratar con el inductor metoxifenozida (MFZ), 6 días después de la inducción (6dpi).

Número de equivalencia	Línea de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Tratamiento inductor MFZ
1	Silvestre <i>Col-0</i>	Sin inducción con MFZ
2	<i>AtLcb2a-1</i>	Sin inducción con MFZ
3	<i>AtLcb2a-1</i>	Inducida con MFZ 6dpi
4	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i>	Sin inducción con MFZ
5	<i>AtLcb2b hp/AtLcb2a</i>	Inducida con MFZ 6dpi

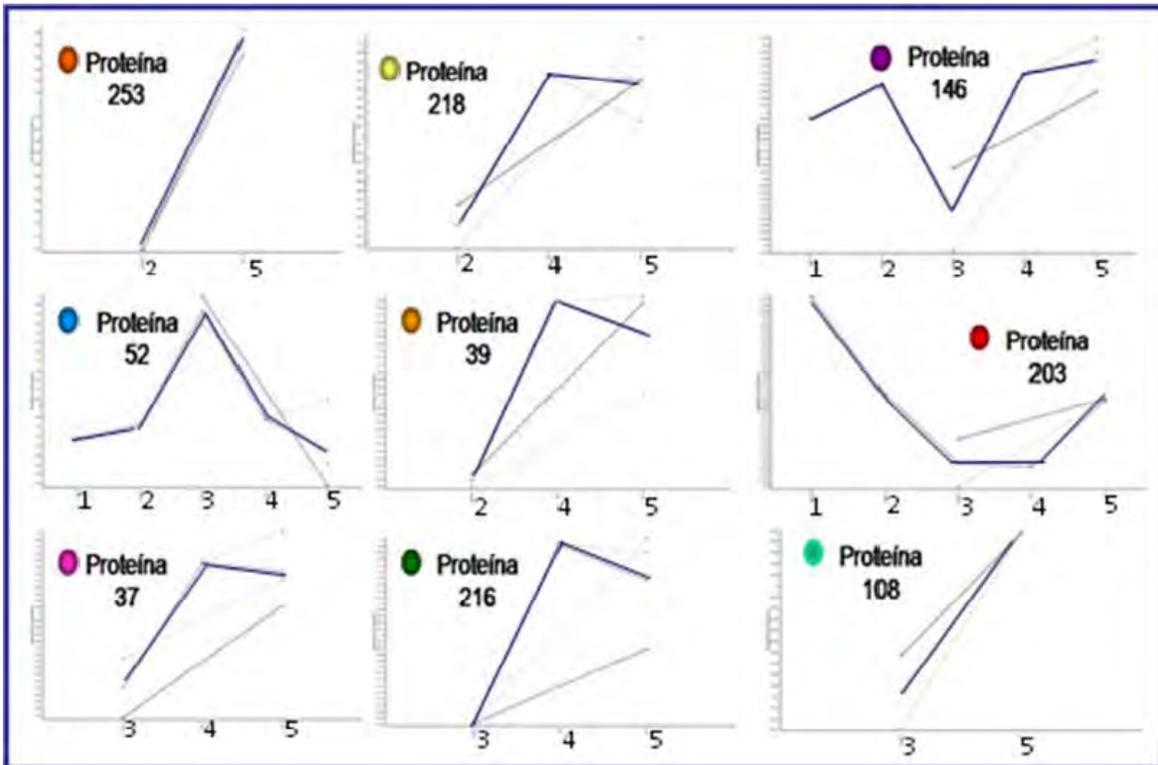


Figura 18. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en las muestras de DRM provenientes de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2a-1* +MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* +MFZ. Esta figura muestra las gráficas obtenidas del análisis estadístico entre las muestras de DRM de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2a-1* +MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* +MFZ. Se grafica la intensidad de cada proteína (eje y) en cada línea/condición (eje x, según Tabla 16). En este caso se detectaron 9 proteínas, que presentan variabilidad biológica significativa; marcada con naranja oscuro la grafica de la proteína 253, en amarillo la proteína 218, en morado la proteína 146, en azul claro la proteína 52, en naranja claro la proteína 39, en rojo la proteína 203, en rosa la proteína 37, en verde la proteína 216 y en verde claro la proteína 108.

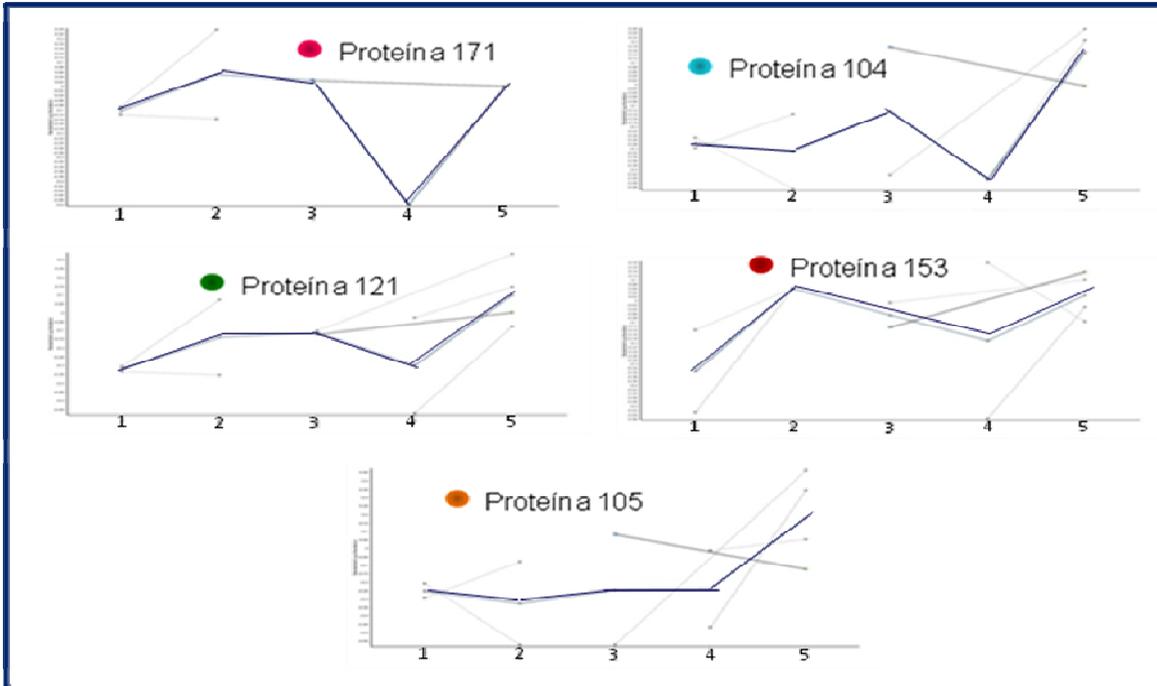


Figura 19. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en las muestras de DRM provenientes de las líneas de *Arabidopsis thaliana thaliana At Silvestre* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ*. Esta figura muestra las gráficas obtenidas del análisis estadístico entre las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana At Silvestre* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ*. Se grafica la intensidad de cada proteína (eje y) en cada línea/condición (eje x). En este caso se detectaron 5 proteínas, que presentan variabilidad biológica significativa; marcada con rojo la proteína 171, en azul claro la proteína 104, en verde la proteína 121, en naranja oscuro la proteína 153 y en naranja claro la proteína 105.

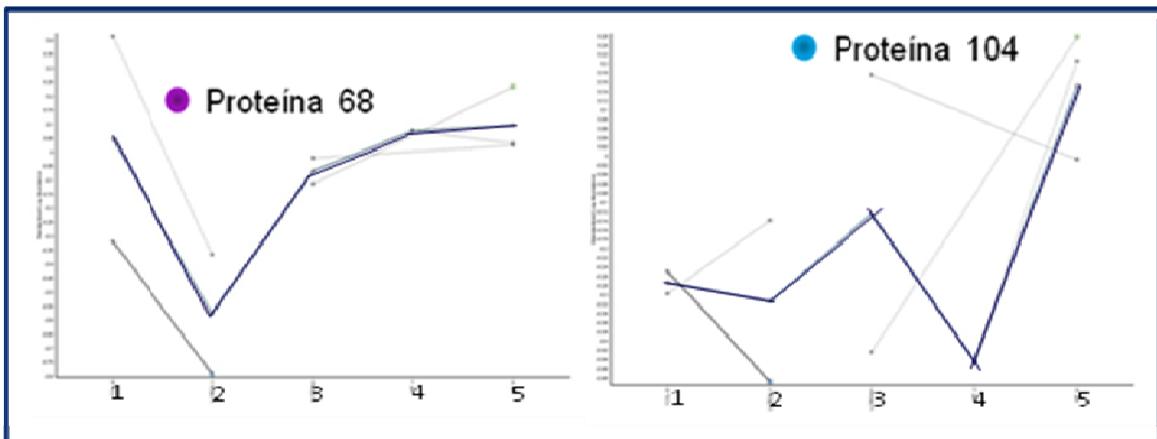


Figura 20. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en las muestras de DRM provenientes de las líneas de *Arabidopsis thaliana AtLcb2a-1 -MFZ* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ*. Esta figura muestra las gráficas obtenidas del análisis estadístico entre las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana AtLcb2a-1 -MFZ* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a +MFZ*. Se grafica la intensidad de cada proteína (eje y) en cada línea/condición (eje x). En este caso se detectaron 2 proteínas, que presentan variabilidad biológica significativa; marcada con morado la proteína 68 y en azul la proteína 104.

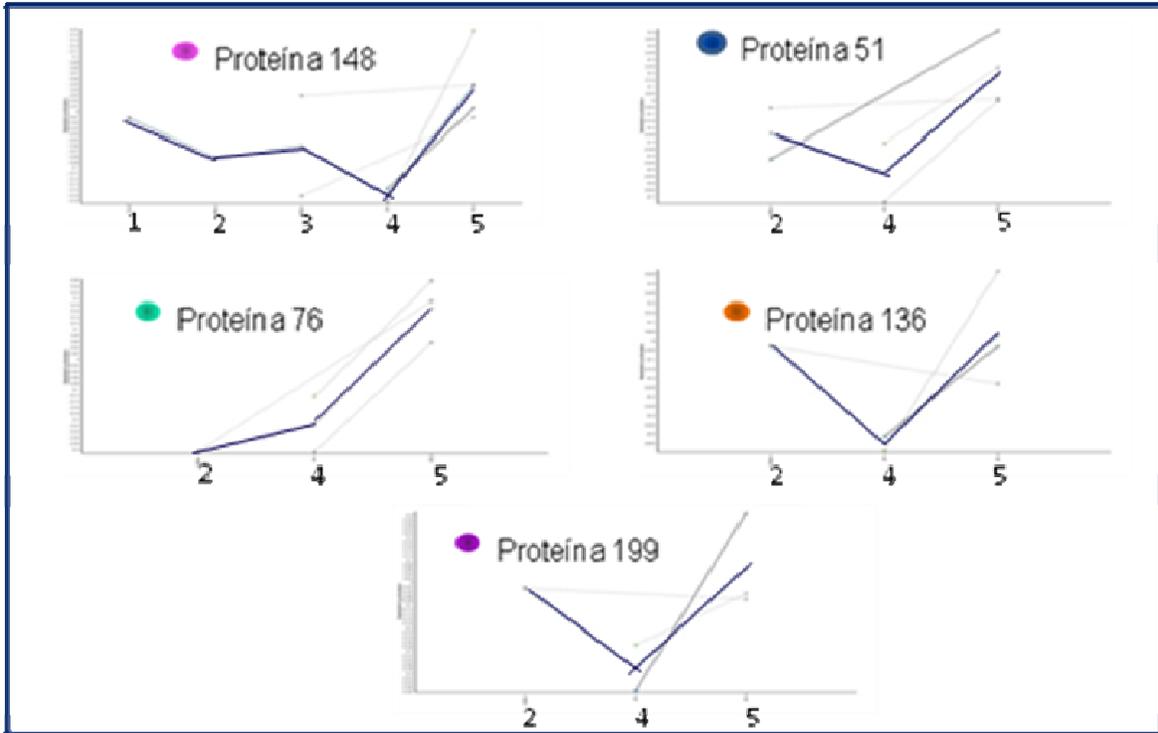


Figura 21. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en las muestras de DRM provenientes de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2b hp/AtLcb2a* -MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* +MFZ. Esta figura muestra las gráficas obtenidas del análisis estadístico entre las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtLcb2b hp/AtLcb2a* -MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* +MFZ. Se grafica la intensidad de cada proteína (eje y) en cada línea/condición (eje x). En este caso se detectaron 5 proteínas, que presentan variabilidad biológica significativa; marcada con rosa la proteína 148, en azul la proteína 51, en verde claro la proteína 76, en naranja oscuro la proteína 136 y en morado la proteína 199.

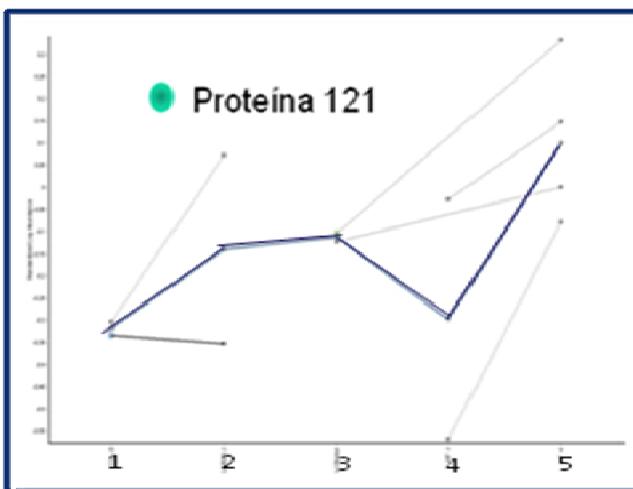


Figura 22. Proteínas con cambios significativos en su abundancia en las muestras de DRM provenientes de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtSilvestre* y *AtLcb2a-1* +MFZ. Esta figura muestra la gráfica obtenida del análisis estadístico entre las muestras de DRMs de las líneas de *Arabidopsis thaliana* *AtSilvestre* y *AtLcb2a-1* +MFZ. Se grafica la intensidad de cada proteína (eje y) en cada línea/condición (eje x). En este caso se detectó 1 proteína, que presenta variabilidad biológica significativa; marcada con verde claro la proteína 121.

RESULTADOS

Habiendo analizado las gráficas, se procedió a hacer la discriminación de las proteínas que se expresan más en la línea *Arabidopsis thaliana AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor MFZ, en comparación con las demás líneas (*At Silvestre*, *AtLcb2a-1* con y sin el inductor MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos el inductor); las proteínas seleccionadas resultaron ser 7 y se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Proteínas que se expresan más en la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor MFZ, en comparación a su expresión en las líneas *At Silvestre*, *AtLcb2a-1* con y sin inductor MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos inductor MFZ. Se seleccionaron sólo aquellas proteínas que mostraron un aumento significativo, según el procesamiento y el análisis estadístico con el programa DeCyder módulo BVA.

MANCHA NÚMERO	LÍNEAS COMPARADAS	RELACIÓN PROMEDIO	PRUEBA T-STUDENT
253	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> +MFZ > <i>AtLcb2a-1</i> +MFZ	1.49	0.0035
108	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> + MFZ > <i>AtLcb2a-1</i> +MFZ	1.39	0.050
104	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> + MFZ > <i>At silvestre</i> > <i>AtLcb2a-1</i> ± MFZ > <i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> - MFZ.	2.75	0.028
148	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> + MFZ > <i>At silvestre</i> > <i>AtLcb2a-1</i> ±MFZ > <i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> - MFZ.	1.59	0.021
51	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> + MFZ > <i>AtLcb2a-1</i> +MFZ > <i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> - MFZ	5.20	0.033
121	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> + MFZ > <i>At silvestre</i> > <i>AtLcb2a-1</i> ±MFZ > <i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> - MFZ.	1.61	0.0072
76	<i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> + MFZ > <i>AtLcb2a-1</i> +MFZ > <i>AtLcb2b-hp/AtLcb2a</i> - MFZ	2.41	0.033

Resultados de la identificación de las proteínas mayoritariamente representadas en las muestras de DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS).

Las siete proteínas de los DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción) que se habían expresado en mayor proporción con respecto a las otras líneas control fueron seleccionadas para hacer su identificación por Espectrometría de Masas MALDI-ToF (MALDI-ToF/MS). Estas proteínas fueron designadas como L1-L7. El procesamiento se llevó a cabo en condiciones regulares en todos los pasos. Desafortunadamente, en la última fase, en la que se estaban leyendo las muestras, ocurrió una interrupción en el suministro eléctrico. Sólo con el objeto de hacer un ejercicio de análisis de estos resultados se presentan éstos a continuación, si bien su validez no puede ser asegurada.

Se puede observar en la Tabla 18, que tras el análisis del espectrómetro de masas a cada una de las proteínas le fueron encontradas de 2 a 6 posibles identidades. A las proteínas L1 y L5 se le determinaron 6, a la L2, L3 y L7 se les asignaron 5 candidatos y a la L4, 2. En todos los casos, las posibles proteínas identificadas mostraron una cobertura o score bajos, excepto en el caso de la Rubisco activasa, en la que se obtuvo una cobertura del 49% (mancha L4) con el programa de búsqueda Protein Pilot (ProteinPilot™ 3.0 Software, <http://www.appliedbiosystems.com/>) y un score del 49% (mancha L5) con el programa de búsqueda Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). En el resto, de las proteínas ambos valores estuvieron más bajos que los valores para la Rubisco activasa. La gran mayoría de las identidades correspondió a proteínas con función enzimática, si bien también se encontraron tres proteínas de unión a DNA (dos factores de transcripción y la proteína FUS), así como un receptor (fitocromo). Con respecto a su localización subcelular, algunas de las proteínas son citosólicas (fructosa-1,6-bisfosfatasa, alcohol deshidrogenasa, fitocromo) otras son mitocondriales (rubisco activasa, subunidad alfa de la ATP sintetasa, proteína 4

de la NADPH quinona oxidoreductasa), otras son nucleares (los factores de transcripción y la proteína FUS) y otras de retículo endoplásmico (precursor de la miriosinasa). Algunas son solubles (fructosa-1,6-bisfosfatasa, alcohol deshidrogenasa, fotocromo, rubisco activasa) y otras son membranales (subunidad alfa de la ATP sintetasa, proteína 4 de la NADPH quinona oxidoreductasa, son proteínas de la membrana mitocondrial interna; proteína precursora no específica transportadora de lípidos, posiblemente retículo endoplásmico; lipooxigenasa, membrana plasmática).

Tabla 18. Identificación de proteínas de DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS).

No. Prot. (EMV)	Clave proteina (MALDI-TOF)	Identificación de la proteina por base de datos	Número de la proteina	Designación de la proteina (E.C.)	Número de secuencia	% Cobertura ó Score	Función de la proteina
106	L1	Protein Pilot	Lipid(oxidation)transferases	2.3.1 (181)	Q81F5F1 Q72QP1	9.7	Transferencia de lípidos a enzimas que lo usan como cofactor (piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, MIT, etc.)
			Lipidtransferases	2.1.1.43	Q81FNC7	10	Catálisis de la reacción: S-adenosil-L-metionina + histona L-lisina = S-adenosil-L-homocisteína + histona N(ε)-metil-L-lisina.
		MASCOT	Cadena α-dimin regular		Q39810	10	Generación de proteínas de cito y filamentos actinomas.
			RNA polimerasa (cadena β)	2.7.7.6	Q85FMB	10	Catálisis de la transcripción de DNA a RNA usando 4 ribonucleótidos trifosforados como sustratos.
		ATXR3	Proteína Histona-Lisina N-metiltransferasa	2.1.1.43	Q23372	10	—
			Lipidgenasa Lipoproteínasa Lipidasa	1.13.11.12	Q76122	10	Introducción de oxígeno molecular en la posición C-9 de lípidos y lípidos. Implicación en crecimiento y desarrollo, resistencia a los pliegues, senescencia y respuestas estrés.

Tabla 18 Continuación. Identificación de proteínas de DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS).

No. proteína (BVA)	Clave proteína (MALDI-TOF)	Identificación de la proteína por base de datos	Nombre de la proteína	Designación de la proteína (E.C.)	Número de accesión	% Cobertura ó Score	Función de la proteína
253	L2	MASCOT	Fructosa-1,6-bisfosfatasa	3.1.3.11	Q42649 P46276	10	Catalítisis de las reacción entre 1,6-bisfosfato + H ₂ O → D-fructosa 6-fosfato + fosfato
			Fructosa bisfosfatasa	1.6.5.-	Q8S8V0	9	Catalítisis de la reacción NAD(P)H + plastoquinona = NAD(P) ⁺ + plastoquinol
			NADPH quinona oxidoreductasa (cadena 5)	2.1.1.128	Q9LEL6	8	Catalítisis de la transferencia del grupo S-metil de L-metionina al grupo 6-hidroxi de norcoclaurina = coclaurina
148	L3	MASCOT	Alcohol deshidrogenasa	1.1.1.1	P25141	7	Conversión de alcoholes a aldehídos en plantas y es importante para el metabolismo durante la respiración anaeróbica.
			Probable Histona-Lisina N-metiltransferasa ATXR3	2.1.1.43	O23372	7	Catalítisis de la reacción: S-adenosil-L-metionina + histona L-lisina = S-adenosil-L-homocisteina + histona N(6)-metil-L-lisina
			Glicosiltransferasa 4 Putativa	2.4.-.-	Q9M9U0	9	—
			Precursor peroxidasa 73	1.11.1.7	Q43873	9	Eliminación de H ₂ O ₂ , la oxidación de sustancias tóxicas, respuesta a estrés, ataque de patógenos y el estrés oxidativo.

Tabla 18 Continuación. Identificación de proteínas de DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS).

No. proteína (BVA)	Clave proteína (MALDI-TOF)	Identificación de la proteína por base de datos	Nombre de la proteína	Designación de la proteína (E.C.)	Número de aceción	% Cobertura o Score	Función de la proteína
148	L3	MASCOT	Precursor de proteína A1g47420 mitocondrial	—	Q9SX77	7	—
			Precursor de miocinasa (tioglucósido glucohidrolasa) o miocinasa	3.2.1.147	Q00326	6	Degradación de glucosinolatos a glucosa, sulfato y algunos productos como: tiocianatos, isotiocianatos, nitrilos, epitiocitrilos y tiol 2-oxazodilina.
			DEAD-box ATP-dependiente de RNA helicasa 20 Hidrolasa	3.6.1.-	Q9C718	6	Implicado en la biogénesis
104	L4	Protein Pilot	Proteína FUS	—	Q28009 P56959 P35637	4.9	Mantenimiento de la integridad genómica
			Ribulosa bifenolcarboxilasa/oxigenasa/activasa Rubisco activasa	4.1.1.39	P10896	49	Activación de Rubisco, implicando la carboxilación dependiente de ATP del grupo amino-épsilon de la lisina a una estructura de carbamato.

Tabla 18 Continuación. Identificación de proteínas de DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS).

No. Prot. (BVA)	Clave proteína (MALDI-TOF)	Identificación de la proteína por base de datos	Nombre de la proteína	Designación de la proteína (E.C.)	Número de acceso	% Cobertura ó Score	Función de la proteína
76	L5	Protein Pilot	Ribulosa bifsostato carboxilasa/oxigenasa activasa	4.1.1.39	P10896	9.9	Activación de Rubisco implica la carboxilación dependiente de ATP del grupo amino-épsilon de la lisina a una estructura de carbanilato.
			Ribulosa bifsostato carboxilasa/oxigenasa activasa	4.1.1.39	P10896	49	Activación de Rubisco implica la carboxilación dependiente de ATP del grupo amino-épsilon de la lisina a una estructura de carbanilato.
		MASCOT	ATP sintasa subunidad α	3.6.3.14	Q0ZJ35	15	Producción de ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana.
			Probable factor de transcripción WRKY 32	—	P59583	9	Factor de transcripción. Interactúa específicamente con la secuencia (5'-TTTGAC[CT]-3').
			Proteína precursora no específica transportadora de lípidos	—	P10976	8	Proteínas de transferencia de lípidos no específicos y galactolípidos a través de las membranas en plantas.

Tabla 18 Continuación. Identificación de proteínas de DRM de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (bajo inducción), por Espectrometría de Masas (MALDI-ToF/MS).

No. Prot. (BVA)	Clave proteína (MALDI-TOF)	Identificación de la proteína por base de datos	Nombre de la proteína	Designación de la proteína (E.C.)	Número de accesoión	% Cobertura ó Score	Función de la proteína
76	L5	MASCOT	NADPH quinona oxidoreductasa (cadena 4)	1.6.5.-	Q6ENP7	7	Catálisis de NADPH +plastoquinona = NADP ⁺ + plastoquinol
51	L7	MASCOT	Fitocromo	—	Q40762	12	Fotoreceptor que existe en dos formas que son reversibles por la luz. PFR controla la expresión de una serie de genes nucleares incluidos los de la subunidad menor de la ribulosa-bifosfato carboxilasa, la proteína de unión, protobrofilina reductasa, rRNA.
			Diacilglicerol cinasa 1	2.7.1.107	Q39017	6	Catálisis de la reacción: ATP +1,2-diacilglicerol=ADP + 1,2-diacil-sn-glicerol 3-fosfato.
			Precursor aleno óxido ciclasa 4	5.3.99.6	Q93ZC5	5	Producción de ácido 12-oxo-fitoeniónico, precursor de ácido jasmónico.
			Factor de transcripción de respuesta a estrés por calor A-5 (ATHsIA5)	—	Q94BZ5	5	Activador transcripcional que se une específicamente a la secuencia del ADN 5'-AGAAnnTTCT-3. Promotor de los elementos de choque térmico (HSE).
			Probable precursor de formación de gránulos de almidón vinculado a sintasa 1	—	Q9MAQ0	5	Requerida para la síntesis de amilosa en el endospermo. NDP-glucosa + (1,4- α -D-glucosil)(n) = NDP + (1,4- α -D-glucosil)(n+1).

Empleo de plantas de *Arabidopsis thaliana*, de las líneas silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b-hp* / *AtLcb2a*. Inducción del silenciamiento del gene de la SPT.

Este trabajo de tesis fue realizado con la línea de *Arabidopsis thaliana AtLcb2b hp/AtLcb2a* la cual ha sido genéticamente manipulada para no generar la versión funcional de la proteína serina palmitoiltransferasa bajo las condiciones de inducción y así provocar un descenso en esfingolípidos complejos. De hecho, en esta línea, el 36 % de los esfingolípidos complejos, medidos como bases esfingoideas totales, disminuye después de 7 días del silenciamiento inducido por la exposición al insecticida Intrepid F2, (cuyo principio activo es el MFZ) (Dietrich *et al.*, 2008). El fenotipo que alcanzaron nuestras plantas al haberles agregado el insecticida corresponde al reportado en el trabajo de Dietrich *et al.* (2008), por lo cual podemos inferir que los niveles de esfingolípidos totales en nuestras plantas alcanzaron los niveles reportados en dicho trabajo. Si bien el contenido de bases esfingoideas fue determinado en el total de la planta, es razonable deducir que como la mayor parte de los esfingolípidos se encuentran en las membranas celulares, es factible que las fracciones membranales totales que nosotros aislamos tengan también disminuidos los niveles de esfingolípidos. Sin embargo, sería deseable llevar a cabo la determinación del contenido total y la composición de esfingolípidos membranales en esta línea. Desgraciadamente, esto no se ha reportado ni en esta línea ni en ninguna otra de *Arabidopsis thaliana* o de otra especie vegetal, dada la dificultad de obtener preparaciones de DRM puras y en suficiente cantidad, por una parte y por otra parte, por las dificultades técnicas e instrumentales que presenta el análisis de esfingolípidos (Markham *et al.*, 2006, Markham y Jaworski, 2007).

Una de las complicaciones en este trabajo fue la de disponer de los controles adecuados a la fuente de membranas de interés que fue la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* en presencia de inductor. Por eso es que de esta línea de *Arabidopsis thaliana* se tuvieron que usar tres líneas como condiciones control. Una de ellas fue la misma línea sin exposición al insecticida, para así hacer evidente cualquier cambio

generado sólo por el silenciamiento del gene *Lcb2b* de la SPT. El segundo control fue la línea *AtLcb2a-1* expuesta al inductor, ya que sobre esta línea se hizo la construcción de la horquilla de RNA inducible y que además contiene al gene de la subunidad *lcb2a* con una inserción que lo hace intrascriptible. Como la línea *AtLcb2a-1* que generó a la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* provenía a su vez del genotipo silvestre Col-0, entonces esta última también fue usada como un tercer control.

Obtención de homogenados, fracciones microsomales y membranas resistentes a detergentes (DRM) de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *AtLcb2a-1*, *AtLcb2b hp/AtLcb2a*.

Ya que el objetivo principal de este estudio era el de explorar si un ambiente esfingolipídico deficiente influenciaba la composición proteica de los DRM, se procedió a hacer el fraccionamiento subcelular de las diferentes líneas que ya se mencionaron. Para ello, se hizo un total de 17 preparaciones membranales de las diferentes líneas en presencia y ausencia de inductor, según el caso, contándose con 3 a 4 preparaciones por línea/condición, excepto para la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos inductor, de la que se obtuvieron sólo 2 preparaciones. El total de especímenes independientes de las que se partió para procesar las membranas totales fue de aproximadamente 700 plantas. Los rendimientos de proteína de homogenado en las diferentes líneas/condiciones estuvieron en un rango (10.5 -22.5 mg de proteína por gramo de tejido), tomando en cuenta las desviaciones estándar. Esto significa que en términos de proteína total, las líneas no presentaron cambios en su contenido de proteínas.

Lo mismo ocurrió con las proteínas membranales de las fracciones microsomales, si bien los rendimientos disminuyeron drásticamente en todos los casos, pues se obtuvieron rendimientos en el intervalo de 0.75 a 1.55 mg de proteína membranal por gramo de tejido al compararse la proteína total entre las fracciones de homogenado y microsomas. Lo anterior revela la gran limitación para obtener cantidades adecuadas que faciliten cualquier análisis membranal. Por ello fue particularmente ardua la labor de obtención de las fracciones de DRM, ya que en la

obtención de éstas los rendimientos fueron aún más bajos, de alrededor de 27 μg de proteína por gramo de tejido de hoja, si bien para la línea con sólo dos preparaciones el rendimiento fue casi 10 veces más bajo. Es posible que ésto se deba a que la cantidad total de material procesado fue menor, ya que esta línea, la *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos inductor no tendría que presentar características desfavorables a las de la misma con inductor. Sin embargo, la obtención de preparaciones adicionales resolvería esta duda.

Comparados con preparaciones análogas en la literatura, los rendimientos de preparaciones microsomales de la línea silvestre y de la línea *AtLcb2a-1* (0.75 ± 0.35 mg/g tejido fresco) y de las líneas *AtLcb2a-1* más inductor, *AtLcb2b hp/AtLcb2a* con y sin inductor (rendimientos de 1.55 ± 0.8 , 1.14 ± 0.8 y 1.21 ± 0.29 mg/g tejido fresco, respectivamente) fueron semejantes a los rendimientos de microsomas de la línea silvestre Col-0 (0.87 ± 0.042 mg/g tejido fresco) y de la mutante *Atsbh1-1* (1.178 ± 0.131 mg/g tejido fresco) reportados por Meza y Gavilanes (2009) y a los rendimientos obtenidos en hojas de tabaco (1.0 ± 0.3 mg/g tejido fresco) (Carmona *et al.*, 2007), así como los obtenidos en microsomas de hojas de frijol (1.3 ± 0.1 mg/g tejido fresco). Lo anterior indica que la metodología seguida es adecuada y además muestra que en términos de la cantidad de proteínas totales en las membranas celulares totales, las diferentes mutantes no presentan diferencias, lo cual a su vez dice que las variaciones en los niveles de esfingolípidos complejos producidas en las diferentes mutantes no tiene un efecto cuantitativo en los niveles de la proteínas membranales consideradas globalmente.

Al hacer comparaciones con otros datos que se han reportado (Tabla 19), se puede observar que también hay similitud en los rendimientos de fracción microsomal obtenidos de células en suspensión de *A. thaliana* (ecotipo Columbia) de 3.3 ± 0.6 y 2.1 ± 0.3 mg / g tejido (Laloi *et al.*, 2007), sin embargo los rendimientos reportados por Mas *et al.* (1994) en hojas de uvas de 4.57 ± 0.18 mg/g tejido y por Sánchez-Nieto *et al.* (1997) en embriones de maíz que es de 5.71 mg/ g tejido son ligeramente mayores, lo cual puede deberse al método de extracción del homogenado y a la cantidad de tejido disponible.

Tabla 19. Rendimientos obtenidos en fracciones microsomales y DRM aisladas de varias especies de plantas y de diferentes tejidos de estas. Se menciona la fracción subcelular (FM:fracción microsomal y/o DRM:membrana resistente a solubilización por detergente; tipo de muestra trabajada y autor (es) del trabajo.

Fracción subcelular	MUESTRA Y RENDIMIENTO (mg prot./g tejido ó % de recuperación de proteína en dicha fracción)
FM	Células en suspensión (<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia) 3.3±0.6 mg y 2.1 ±0.3 mg (Laloi <i>et al.</i> , 2007)
	Hojas de uva (<i>Vitis vinifera</i>) 4.57±0.18 mg (Mas <i>et al.</i> , 1994)
	Embriones de maíz (<i>Zea mays</i>) 8.75 ± 1.5 mg (Sánchez-Nieto <i>et al.</i> , 1997)
	Embriones de maíz (<i>Zea mays</i>) 2.4± 0.7 mg Hojas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) 1.3 ±0.1 mg Hojas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) 1.0 ± 0.3 mg (Carmona <i>et al.</i> , 2007)
	Hojas de Cebada 58 mg proteína Hojas de espinaca 49 mg de proteína (Briskin <i>et al.</i> , 1987)
DRM	Plantas de <i>Medicago truncatula</i> 95 ± 23 mg (Lafebvre <i>et al.</i> , 2007)
	Hojas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) 3.3 ± 1% (Mongrand <i>et al.</i> , 2004)
	Células en suspensión (<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia) 145 µg (Laloi <i>et al.</i> , 2007)
	Hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia 9.5±3% plantas no aclimatadas, 7.3±2%, 6.8±2.5% y 5.7±2.6% plantas aclimatadas al frío 2, 4 y 7 días respectivamente (Minami <i>et al.</i> , 2009)

En cuanto a los rendimientos de DRM obtenidos en las líneas de *A. thaliana* silvestre (0.0092±0.003 mg/g tejido fresco), *AtLcb2a-1* sin inductor (0.028 ±0.012 mg/g tejido fresco) o con inductor (0.027 ±0.021 mg/g tejido fresco) y *AtLcb2b hp /AtLcb2a* con inductor (0.028 ±0.015 mg/g tejido fresco), son comparables con los que obtuvo (Carmona *et al.*, 2007) en embriones de maíz (0.02 ±0.01 mg/g tejido fresco), a excepción de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos MFZ, de la cual se obtuvo un rendimiento mucho más bajo (0.004 ±0.012 mg/g tejido fresco) y que como ya se dijo, la obtención de sólo dos preparaciones hacen difícil una comparación confiable.

Al comparar los rendimientos anteriores con los rendimientos obtenidos por Lefebvre *et al.* (2007) en *M. truncatula* (95 ±23mg/g tejido) y con los de Laloi *et al.*

(2007) en *A. thaliana* (145 µg), se observa una variación en los rendimientos, si bien en el último caso no es posible determinar el rendimiento, pues sólo se describió la cantidad obtenida sin especificar la cantidad de la que se partió. Las diferencias en rendimiento con *M. truncatula* sugieren que una de las causas de esta variación es el método de obtención de DRM, así como la cantidad en términos absolutos de muestra inicial de la cual se extrajeron (lo cual no se menciona). Lo mismo sucede en el caso de los rendimientos reportados por Mongrand *et al.* (2004) ($3.3 \pm 1\%$) en hojas de tabaco y con Minami *et al.* (2009) en hojas de *A. thaliana* ($9.5 \pm 3\%$ en plantas no aclimatadas al frío, $7.3 \pm 2\%$, $6.8 \pm 2.5\%$ y $5.7 \pm 2.6\%$ en plantas aclimatadas al frío por 2, 4 y 7 días respectivamente), en los que sólo reportan porcentajes de recuperación de proteína en DRM y no mencionan la cantidad de tejido del cual partieron; aun así entre estos dos trabajos se puede observar que los porcentajes de los rendimientos obtenidos son comparables, no así en los rendimientos obtenidos en este trabajo los cuales se encuentran alrededor del 0.5%.

Análisis de Proteínas

Análisis de proteínas de homogenados y fracciones microsomales, separadas por geles en una dimensión (separación por peso molecular).

Al analizar los resultados obtenidos en la separación de proteínas de homogenados y fracciones microsomales en geles desnaturalizantes (Figura 11), se observaron muy pocas diferencias entre las muestras, siendo la más evidente la banda de aproximadamente 70 kDa, la cual en los homogenados se observó con mayor intensidad en los dos tipos de tinción que se utilizó y que disminuyó de intensidad en las fracciones microsomales de todas las muestras, indicando que ésta podría ser una proteína soluble. Sin embargo, la región de los geles correspondiente a proteínas de bajo peso molecular no presentó buena definición, por lo cual es difícil determinar si hubo diferencias entre los perfiles proteicos de cada línea en esta región. Con objeto de

mejorar la resolución de estos geles se podrían hacer dos tratamientos: uno, disminuir la cantidad de proteína de cada muestra y teñir sólo con nitrato de plata, o bien aumentar la cantidad de proteína, correr un gel más largo y hacer la tinción con azul de Coomassie. Posteriormente se podría hacer un análisis densitométrico para poder evaluar semicuantitativamente la intensidad de cada banda y sus diferencias entre cada muestra.

En otros trabajos, por ejemplo en el de Minami *et al.* (2009) se hizo el análisis de proteínas en DRM de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia), por medio de geles SDS-PAGE, utilizando 3 µg de proteína y tiñendo con plata (dada la escasa disponibilidad del material biológico). Ellos observaron 15 bandas en los DRM, de las cuales lograron identificar 80 proteínas con espectrometría de masas (MALDI TOF/MS), mientras que en la membrana plasmática observaron alrededor de 30 bandas que en este caso no fueron analizadas por espectrometría de masas. Al hacer el análisis de las muestras de DRM por medio de geles 2-D DIGE, lograron identificar 165 proteínas, de las cuales eligieron 36 proteínas para ser analizadas por espectrometría de masas (MALDI TOF/MS). Sus resultados muestran una dinámica de cambio en la composición de proteínas de DRM, con respecto a las proteínas de membrana plasmática, durante la aclimatación de las plantas al frío.

Separación de proteínas por enfoque isoeléctrico (primera dimensión) y por peso molecular (segunda dimensión).

Una manera de hacer un mejor análisis de proteínas era usar un sistema electroforético de separación bidimensional. Por ello primero se tuvieron que establecer las condiciones adecuadas de separación de las proteínas por enfoque isoeléctrico y por peso molecular. El análisis de proteínas membranales por enfoque isoeléctrico presenta muchos obstáculos, ya que estas proteínas son fuertemente hidrofóbicas, debido a sus secuencias apolares que atraviesan la bicapa lipídica (Cooper, 1997). Una complicación adicional es que las proteínas de DRM son extremadamente resistentes a

la solubilización con detergente, de ahí su nombre. Para poder solubilizarlas cabalmente, es necesario el uso de detergentes o agentes como la urea, desgraciadamente, estos compuestos pueden interferir con el proceso de electroforesis en un medio con anfotericinas. Debido a esto, se comenzó el procedimiento de separación cambiando a las proteínas de fracciones membranales a un medio compatible con las condiciones de separación electroforética por *pI*, por lo que las proteínas tuvieron que precipitarse y concentrarse en un medio adecuado (EtOH-Acetona, Carmona, 2003) para luego solubilizarse, por lo que también se logró establecer un medio de solubilización adecuado que incluye: N-Octilglucopiranosido al 2% que es un detergente no iónico, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS) al 1%, que es un detergente zwitteriónico y Tritón X-100 al 0.5%, que es un detergente no iónico; también se incluyó un agente reductor de puentes disulfuro, el DTT 50 mM, y agentes desnaturizantes como la Urea 7M y la Tiourea 2M; (Condición 4, Tabla 12) para así separar las proteínas por *pI*. Otro aspecto importante fue establecer que 5 y 10 µg de proteína separadas en un gradiente de pH de 4/7 en las tiras de gel preformado de BIO RAD eran condiciones adecuadas para su separación y desplegar una buena resolución y número de bandas; finalmente se encontró que la tinción con nitrato de plata por el Método de Vorum, Mortz *et al.* (2001) fue más sensible que la tinción con Azul de Coomassie, lo cual permitió denotar una mayor cantidad de manchas de proteínas. Todas estas condiciones se establecieron en múltiples geles, de los cuales se muestran 12 en las Figuras 12A y 12B usando muestras de solamente fracciones microsomales de *Arabidopsis thaliana* de la línea silvestre. Como puede apreciarse, fueron pocas o muy pocas las manchas de proteínas que se pudieron visualizar (22-43) según el gel analizado.

Trabajos como el de Borner *et al.* (2005) hecho con callos y hojas de *Arabidopsis thaliana* y de Munami *et al.* (2009) con hojas de *Arabidopsis thaliana* en los que llevaron a cabo el análisis de proteínas de DRM con una técnica mucho más sensible: 2-D DIGE, con la que reportaron la detección de 30 y 96 proteínas, respectivamente. Considerando que con el análisis bidimensional que estábamos realizando alcanzábamos a detectar en el mejor de los casos, 43 proteínas en la

fracción microsomal y que de esta fracción se obtenían las DRM, lo más probable era que en éstas encontráramos un número aún menor de proteínas, lo cual implicaba una subestimación muy importante de las especies proteicas en las muestras. Por ello fue que no se procedió a usar con las muestras de microsomas o de DRM de las otras líneas el mismo procedimiento de separación bidimensional que veníamos usando anteriormente con las fracciones microsomales. Sin embargo, las condiciones establecidas para las fracciones microsomales pueden ser utilizadas en un futuro para hacer el análisis correspondiente de muestras con características diferentes, siempre y cuando este análisis se complemente con algún otro método de identificación de proteínas.

Las anteriores consideraciones fueron la base para adoptar el análisis de proteínas de DRM por el método 2-D DIGE, en todas las muestras obtenidas.

Análisis de proteínas de DRM de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0, silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/Atlcb2a*) con y sin inductor, en geles 2D con fluorescencia diferencial (2D-DIGE).

Se eligió este método para el análisis de las proteínas de DRM de las líneas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0, silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/Atlcb2a*) con y sin inductor, debido a que por medio del marcaje con diferentes fluoróforos, este sistema permite la cuantificación precisa de diferencias en los perfiles de expresión de proteínas basado en el marcaje por fluorescencia, entre muestras separadas de forma simultánea en un mismo gel 2D, ya que las muestras pueden ser marcadas con 3 fluoróforos distintos (Cy2, Cy3 y Cy5) para luego ser separadas en un mismo gel 2D del cual se obtienen imágenes que son sujetas a un análisis automatizado con un software especial (DeCyder 2D Software, versión 6.5, Amersham). Otra de las características importantes de esta técnica es que en cada muestra se incluye un estándar interno, que funge como un control para estandarizar la cantidad de proteínas separadas de muestra a muestra y de corrimiento a corrimiento. Una ventaja adicional es que es posible cortar las manchas de los geles 2-D DIGE y prepararlas para su análisis por espectrometría

de masas, permitiendo la obtención de espectros de fragmentación (MS/MS ó TOF/TOF) para la identificación de proteínas, péptidos, la determinación de masa molecular, pureza, etc.

Los principios teóricos en los que se apoya esta técnica son los mismos que los del procedimiento que ya habíamos establecido y las condiciones de separación de las proteínas fueron semejantes también. Los geles para cada línea/condición fueron corridos por duplicado. Los resultados mostraron que las diferencias de gel a gel eran más bien cuantitativas que cualitativas en los patrones proteicos, ya que los patrones eran básicamente los mismos, pero en algunos casos las proteínas estaban mejor teñidas o mejor resueltas en un gel que en otro. En este punto resulta esencial la inclusión de la referencia o estándar interno, ya que ésta permite la estandarización de la posición de cada mancha y por ello la asignación de una identidad posicional de la proteína dentro de su patrón en geles independientes. Después de hacer el análisis correspondiente con el software DeCyder (módulo DIA) de cada gel realizado, se identificaron diferencias en la separación de proteínas de las diferentes líneas de *A. thaliana* y en condiciones o no de silenciamiento de la SPT.

En el caso de DRM de las líneas silvestre y *AtLcb2a-1* –MFZ, dos líneas usadas como control, se observó que la intensidad y distribución de manchas de proteínas expresadas entre ambas líneas fue muy similar, no encontrándose diferencias significativas entre ellas como era de esperarse, ya que la línea *AtLcb2a-1* debe tener niveles de esfingolípidos similares a la silvestre, pues la mutación en la subunidad *Lcb2a* no debe afectar la síntesis de esfingolípidos complejos, ya que en este caso, la SPT es funcional gracias a la subunidad *Lcb2b* cuyo gene está intacto (Chen *et al.*, 2005; Dietrich *et al.*, 2006).

Al comparar las muestras de DRM de las líneas *AtLcb2a-1* más MFZ usada como control y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más MFZ línea silenciada, se observó que en esta última había una mayor cantidad de proteínas que se expresaban, lo cual sugiere que el efecto del silenciamiento sobre esta línea y por tanto de una disminución en los esfingolípidos, conduce a una mayor variedad de proteínas asociadas a los DRM en la

línea silenciada en comparación con las de la línea *AtLcb2a-1*. Este comportamiento se observó en los geles duplicados de la misma línea en los que se encontró el mismo patrón de separación. Los resultados anteriores son muy interesantes, ya que se ha postulado, a partir de las proteínas identificadas en los proteomas de los DRM que los microdominios pueden ser sitios que señalizan procesos de fenómenos asociados a la defensa contra patógenos (Mongrand *et al.*, 2004). Este reporte es especialmente relevante en nuestro caso, pues las plantas de la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* en presencia del inductor resultaron mucho más sensibles a la infección por el patógeno bacteriano avirulento *Pseudomonas syringae* pv *tomato* presentando una muerte celular de defensa exacerbada (datos obtenidos en el laboratorio por Carmona Salazar Laura, 2008). Por ello es muy importante identificar las proteínas que ahora están aumentadas en los DRM de esta línea, pues quizás sean proteínas que puedan estar asociadas a fenómenos de muerte celular relacionada a defensa contra patógenos, lo cual sería consistente con un reporte reciente en el que encuentran a la proteína ligasa RING E3 en DRM, una proteína que está asociada a fenómenos de muerte celular Lin *et al.*, 2008).

Para el caso de los geles con las muestras de DRM de las líneas *AtLcb2b hp/AtLcb2a* menos MFZ (control) y la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más MFZ (silenciada), claramente se observó mayor cantidad e intensidad de proteínas expresadas en la línea silenciada, lo cual sugiere también que hay mayor cantidad de proteínas asociadas a los DRM de la línea silenciada en comparación con la línea control *AtLcb2b hp/AtLcb2a* –MFZ. Lo anterior se observó con mayor claridad en la primera réplica en comparación con la segunda replica, pero ambas mostraron un mismo patrón de distribución de proteínas.

Al realizar el análisis estadístico de los patrones electroforéticos de cada muestra con el Software DeCyder (Módulo BVA) y comparándolas según la Tabla 14, se logró evidenciar 22 proteínas que presentaron variabilidad biológica significativa $p < 0.05$ entre las condiciones comparadas. Después de analizar minuciosamente las gráficas de los valores de abundancia en cada línea/condición de esas proteínas, se

realizó la discriminación de proteínas considerando sólo aquellas que tuvieron mayor expresión en la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor que en las otras líneas/condiciones (Tabla 15). Estas fueron un total de 7 proteínas (designadas como 51, 76, 104, 108, 121, 148 y 253), las cuales fueron marcadas y cortadas de dos geles adicionales independientes cargados con una mayor cantidad de proteína (350 µg) con el fin de realizar la caracterización de dichas proteínas por MS/MS ó TOF/TOF a partir de los fragmentos provenientes de la tripsinización de las proteínas cortadas de los geles, y de la comparación de sus patrones de masas con los bancos de datos para así lograr la identificación de las 7 proteínas elegidas.

Los resultados anteriores mostraron que la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más inductor, y que está deficiente en esfingolípidos (40 % menos, determinado de acuerdo al contenido de bases de cadena larga totales, Dietrich *et al.*, 2008) mostró un mayor número de proteínas en comparación con las de las cuatro preparaciones de DRM que fueron consideradas como controles. Este resultado sugiere que la cantidad y posiblemente la composición de esfingolípidos en las membranas celulares, influyen en la asociación de proteínas a las balsas lipídicas.

Debido al problema técnico en el análisis de las proteínas de DRM por espectroscopía de masas, los resultados que nos fueron entregados no son confiables. Quizás esto está evidenciado en los bajos valores de cobertura o store que recibió cada muestra (Ver Tabla 18). Los valores aceptables de cobertura para una proteína identificada normalmente son $\geq 60\%$ (Programa Protein Pilot, Protein Pilot™ 3.0 Software, <http://www.appliedbiosystems.com/>) y los scores > 30 (Programa Mascot, http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Ambos programas realizan las búsquedas de las masas correspondientes a los fragmentos de las proteínas tripsinizadas en bases públicas de datos, en particular la de Swissprot (<http://www.expasy.ch/sprot/>). En nuestro caso, todos los valores de cobertura y score para las proteínas identificadas estuvieron muy por debajo de los valores con buena confiabilidad. El caso de excepción fue el de la rubisco activasa, proteína que dada su altísima abundancia en plantas, puede contaminar prácticamente cualquier preparación

subcelular, como se ha encontrado en otras preparaciones. Otras preparaciones de DRM han reportado la presencia de enzimas solubles o de otras organelas como los ribosomas (Morel *et al.*, 2006, Lefevbre *et al.* 2007).

Curiosamente, preparaciones de DRM de *Arabidopsis thaliana* de Borner *et al.*, (2004) y Morel *et al.*, (2006) han detectado la presencia de la subunidad alfa de la ATP sintetasa. Al igual que Lefevbre *et al.*, (2007) en *Medicago truncatula*, en este trabajo se encontró una lipooxigenasa de membrana plasmática. Sin embargo, es este último caso, las proteínas identificadas mostraron en el análisis, scores con valores entre 35 y 280, lo cual fortalece su identificación. No se pudo observar la presencia de proteínas típicas de microdominios de la membrana plasmática que son muy abundantes, como los casos de las isoformas de la ATPasa de H⁺ y las acuaporinas (Borner *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2006; Lefevbre *et al.*, 2007; Minami *et al.*, 2009).

Si bien la identificación de las proteínas mayormente expresadas en la línea mutante silenciada no pudo ser exitosa por causas ajenas a nuestra voluntad, sí se puede decir que el análisis cuantitativo mostró ser satisfactorio, ya que todas las preparaciones de DRM de las líneas que fungieron como controles mostraron una serie de proteínas que pueden ser consideradas como basales y parte del ruido de detección de la técnica, mientras que hubo 7 proteínas de los DRM de la línea con un menor contenido de esfingolípidos que estuvieron por arriba de esta basal y que pueden asociarse preferencialmente a los DRM en condiciones en las que hay una disminución de la síntesis de esfingolípidos complejos. Lo anterior sugiere que el metabolismo de esfingolípidos incide de manera fundamental en las velocidades de incorporación y degradación de los esfingolípidos membranales y de su reparto en las regiones de microdominios de las diferentes membranas plasmáticas, lo cual determina la asociación selectiva de proteínas.

CONCLUSIÓN GENERAL

LA MODIFICACIÓN EN LOS NIVELES CELULARES DE ESFINGOLÍPIDOS ALTERA EL PERFIL DE PROTEÍNAS EN LAS MEMBRANAS RESISTENTES A LA SOLUBILIZACIÓN POR DETERGENTES (DRM).

RESUMEN DE RESULTADOS

- ✓ Se logró el aislamiento de cinco preparaciones de DRM a partir de fracciones microsomales de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* correspondientes a las líneas silvestre, *AtLcb2a-1* y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* (esta última en condiciones control y de silenciamiento génico de la subunidad *Lcb2b* de la SPT).
- ✓ Los DRM obtenidos presentaron rendimientos comparables con las de preparaciones semejantes elaboradas en el laboratorio y a algunos reportes en la literatura.
- ✓ La existencia de diferencias en el perfil de proteínas entre homogenados y microsomas, al ser separadas por peso molecular (1-D), no pudo ser determinada.
- ✓ Se establecieron las mejores condiciones de separación por pI y por peso molecular de proteínas membranales, así como el mejor método de tipificación de manchas de proteínas usando la fracción microsomal control.

- ✓ Se estableció el perfil de proteínas asociadas a DRM de las líneas *Silvestre*, *AtLcb2a-1* con y sin el inductor MFZ y *AtLcb2b hp/AtLcb2a* con y sin el inductor MFZ; así como la identificación de algunas de las proteínas que presentaron mayor expresión y variabilidad biológica significativa en la línea silenciada utilizando la técnica 2-D DIGE.
- ✓ Se estableció de manera inicial el efecto del silenciamiento génico de la subunidad *Lcb2b* de la SPT, y por tanto de la inhibición del metabolismo de esfingolípidos, en el perfil de proteínas de los DRM obtenidos.
- ✓ Se identificaron 7 proteínas que presentaron variabilidad biológica significativa y mayor expresión en la línea *AtLcb2b hp/AtLcb2a* más MFZ, que es la que presenta niveles reducidos de esfingolípidos complejos, en comparación con las demás líneas trabajadas (*silvestre*, *AtLcb2a-1* con y sin inductor MFZ), las cuales fueron utilizadas como diferentes controles.

PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar más réplicas de muestras de DRM para ser analizadas por la técnica 2-D DIGE, y así tener resultados con valores estadísticos más robustos.
- ✓ Comprobar mediante inmunodetección la presencia en los DRM de algunas de las proteínas con variabilidad biológica significativa.
- ✓ Hacer la identificación completa de todas las proteínas de las muestras de DRM utilizadas en este trabajo

Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H., Jr. y Riley, R. T. (1994) Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipids metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 106:1085-1093.

Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2004) *Biología Molecular de la Célula*. Omega. Barcelona: 135-159.

Briskin, D. P., Leonard, R. T. y Hodges, T. K. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Method Enzymol.* 148:542-558.

Borner, G. H.H., Lilley, K. S., Stevens, T. J. y Dupree, P. (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132:568-577.

Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S. y Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137:104-116.

Brodersen, P., Petersen, M., Pike, Helen M., Olszak, B., Skov, S., Ødum, N., Jørgensen, Lise B., Brown Rhoderick E. y Mundy, J. (2002) Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Gene Dev.* 16:490-502.

Brown, D. y Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68. 533–544.

Carmona, S. L. (2003) Identificación de polipéptidos fosforilados diferencialmente en embriones de maíz expuestos a la Fumonisina B₁. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM.

Carmona, S. L. (2006) Aislamiento y Caracterización de Membranas Resistentes a Detergentes (DRM) en diferentes especies vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM.

Carmona, S. L., Plasencia, J. y Gavilanes, R. M. (2007) Perturbation of sphingolipid biosynthesis modifies detergent resistant membranes. XIV International Workshop Plant Membrane Biology. Valencia, España. June 26-30, pp.54.

Cooper G. M. (1997). *The Cell. A Molecular Approach*. ASM Press. Washington, D.C. USA. pp. 39-48, 72-80, 87, 273-300, 347-348.

Chen, M., Ham, G., Dietrich, C. R., Dunn, T. M. y Cahoon, E. B. (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* lcb1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell.* 18:3576-3593.

- Dietrich C. y Jacobson, K. (1999) Landing on lipid rafts. *Trends Cell Biol.* 9:212-213.
- Dietrich, R.C., Han, G., Chen, M., Berg, R.H., Dunn, T.M., y Cahoon, E. B. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* 54:284-298.
- Eddin, M. (2001) Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* 11:492-496.
- Gilchrist, D. G. (1997) Mycotoxins reveal connections between plants and animals in apoptosis and ceramide signaling. *Cell Death Differ.* 4:689-698.
- Gisou van der Goot, F. y Harder, T. (2001) Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrana phase to a site of pathogen attack. *Sem. Immunol.* 13:89-97.
- Gutiérrez N.N.A. (2005) Efecto de la Fumonisina B1 sobre diferentes componentes de la membrana plasmática de embriones de maíz en germinación. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Hannun, Y. A. y Obeid, L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* 9:139-150.
- Hartmann, M-A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 3: 70-174.
- Holthuis, J. C. M. y Levine, T. P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:209-220.
- Idkowiak-Baldys, J., Grilley, M. M. y Takemoto, J. Y. (2004) Sphingolipid C4 hydroxylation influences properties of yeast detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes. *FEBS Lett.* 569:272-276
- Kawaguchi, M., Imai, H., Naoe, M., Yasui, Y. y Ohnishi M. (2000) Cerebrosides in grapevine leaves: distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(6), 1271-1273.
- Koga, J., Yamaguchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M. y Ogasawara, N. (2002) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* 48:31985-31991.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laloi, M., Perret, A.M., Chatre L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultie, M. N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J.M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M.A. y 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.

Larsson, C., Sommarin, M., Pical, C., Kjelbom, P. y Widell, S. (2007) Plant Plasma Membrane. *Encyclopedia of Life Sciences.* 1:1-7.

Larsson, C., Sommarin, M. y Widell, S. (1994) Isolation of highly purified plant plasma membrane separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* 228:451-469.

Larsson, C., Widell, S. y Kjelbom P. () Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.* 148: 558-568.

Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.A., Michaelson, L. V., Carde, J-P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J. A., Cullimore, J., Bessoule, J.J. y 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.

Lin, S.S., Martin, R., Mongrand, S., Vandenabeele, S., Chen, K.C., Jang, I.C. y Chua, N. H. (2008) RING1 E3 ligase localizes to plasma membrane lipid rafts to trigger FB1-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03625.x

Lynch, D. V. y Dunn, T. M. (2003) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol.* 161:677-702.

Lynch, D. V. y Steponkus, P. L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 83:761-767

Luckey, M. (2008) *Membrane Structural Biology: whit Biochemical and Biophysical Foundations.* Cambridge University Press. New York. USA.

Mas, A., Navarro-Pedreño, J., Cooke, D.T. y James, C.S. (1994) Characterization and lipid composition of the plasma membrane in grape leaves. *Phytochemistry.* 35:1249-1253.

Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B. y Jaworski, J. G. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipids classes from leaves. *J. Biol. Chem.* 281:22684-22694.

Markham, J. E. y Jaworski, J. G. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography

coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21:1304-1314.

Mellgren, R. L. (2007) Detergent-resistant membrane subfractions containing proteins of plasma membrane, mitochondrial, and internal membrane origins. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70:1029-1036.

Meza, B. L. y Gavilanes, R.M. (2009) Evaluación de la hidroxilación de esfingolípidos en la actividad de proteínas membranales. 3er Coloquio Invernal de Investigación del Dpto. de Boquímica. Unidad de Seminarios "Ignacio Chávez". UNAM, Cd. Universitaria, D. F. Enero 22 y 23.

Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. y Uemura M. (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* 50:341-359.

Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J-P., Hartmann, M-A., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. y Bessoule, J-J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* 279:36277-36286.

Moreau, P., Hartmann, MA., Perret, AM., Sturbois-Balcerzak, B. y Cassagne, C. (1998) Transport of sterols to the plasma membrane of leek seedlings. *Plant Physiol.* 117:931-937.

Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J-J., Blein, J-P. y Simon-Plas, F. (2006) Proteomics of plant detergent resistant membranes. *Mol. Cell. Proteomics* 5:1396-1411.

Mortz, E., Krohg, T. N., Vorum, H. y Görg, A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics.* 1:1359-1363.

Paker, L., y Douce, R. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148:542-570.

Peskan, T., Westermman, M., y Oelmüller, R. (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267:6989-6995.

Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356.

Petrie R.J.; Schnetkamp P.P.M.; Patel K.D.; Awasthi-Kalia M. y Deans J.P. (2000) Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: Evidence toward a role in calcium regulation. *J. Immun.* 165: 1220-1227.

Sánchez, N.S., García, R.O., Pacheco, M. F., Carballo, A., Rodríguez, S.R., y Gavilanez, R. M. (1997) Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiol. Plant.* 101:157-164.

Schägger, H., y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 116:368-379.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorum, O. y Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver – stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.

Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y. A. y Zuo, J. (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 17:1030-1040.

Simons, K. e Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

Simons, K. y Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.

Simons, K. y Vaz, W. L. C. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:269-295.

Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972) Fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175 (23): 720-731.

Sperling, P. y Heinz, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1632:1-15.

Stryer, L. *Bioquímica*. 5a edición. Editorial Reverté S. A. España. 2003. Pp. 337-352.

Suzuki, M. y Muranaka, T. (2007) Molecular genetics of plant backbone synthesis. *ProQuest Medical Library.* 42:47-54.

Uemura, M., Joseph, R. A. y Steponkus, P. L. (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.* 109:15-30.

Umemura, K., Ogawa, N., Koga, J., Iwata, M. y Usami, H. (2002) Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* 43:778-784.

van Meer, G. y Lisman, Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* 277:25855-25858.

Vázquez V. C. (2007) Mecanismo de inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por FB1 disminución de ceramida. Tesis experimental de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Wessel, D. y Flügge U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. 138:141-143.

White, D. (1995): The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. Oxford University Press, Nueva York. Pp. 876-895

Whiteman, SA., Nühse, T.S., Ashford, D. A., Sanders, D. y Maathuis F. JM. (2008) A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oriza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. Plant J. 56:146-156.

Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. y London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). J. Biol. Chem. 276:33540 – 33546.

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/esfingolipido.html>

http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma01/sec01/c1_002.htm

<http://www.publications.nigms.nih.gov/.../chapter2.html>