



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INTERACCIÓN ESTRUCTURAL ESFINGOLIPIDOS-ATPasa DE H<sup>+</sup> Y SU  
RELEVANCIA FUNCIONAL EN ARABIDOPSIS.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
Q.F.B. FRANCISCO MORALES CEDILLO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARIETTA TUENA DE GÓMEZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MÉXICO, D. F.**

**Mayo, 2014**



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:** Dr. Heliodoro Celis Sandoval  
**VOCAL:** Dr. José de Jesús García Trejo  
**VOCAL:** Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva  
**VOCAL:** Dr. Oscar Flores Herrera  
**SECRETARIO:** Dra. Sobeida Sánchez Nieto

**Sitio en donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, UNAM**

**Asesor del Tema:**

**Dra. Marina Gavilanes Ruíz**

---

**Sustentante:**

**Q.F.B Francisco Morales Cedillo**

---

RECONOCIMIENTOS

A la Q.F.B. Ma. del Consuelo Enríquez Arredondo (Facultad de Química, UNAM) por la obtención de las vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

A la Dra. Rebecca E. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E.U.) por la realización de la esfingolipidómica de las vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E.U.) por proporcionarnos las semillas de todas la mutantes de *Arabidopsis thaliana* obtenidas en su laboratorio y usadas en este trabajo.

Al Dr. Diego González Halphen (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) por los modelos del modo de acción de los esfingolípidos sobre la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática presentados en este trabajo.

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) por su asesoría dentro del comité tutorial.

Al Dr. Alejandro Sosa Peinado (Facultad de Medicina, UNAM) por su asesoría dentro del comité tutorial.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra, por su ayuda en el crecimiento de las plantas y en el uso del equipo utilizado en este trabajo.

\*\*\*\*\*

El Q.F.B. Francisco Morales Cedillo realizó esta tesis de Maestría gracias a una beca de CONACYT (Registro No. 443765).

\*\*\*\*\*

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de la DGAPA (UNAM) proyecto PAPIIT IN210812, del CONACYT, proyecto 101521 y a la Facultad de Química, proyecto PAIP 429002.

\*\*\*\*\*

*En primer lugar quiero agradecer a Dios por permitirme dar un paso más en vida y dejarme lograrlo junto con toda mi familia.*

*A mis padres, Catalina Cedillo Cárdenas y Félix Morales Martínez, por su cariño y apoyo incondicional, pero en especial a mi mamá por sus consejos, sus desvelos, su confianza y por todo el esfuerzo que ha hecho para ayudarme llegar a ser lo que soy.*

*A mis sobrinos Rolando y “Cheque”, por toda la felicidad que me han dado. Los días que están con nosotros son muy divertidos.*

*A mis hermanas, hermanos, mi abuelito Daniel, mi tía Bertha, tíos, primos y primas por sus palabras, por creer siempre en mí y en lo que soy capaz de hacer.*

*A Ari, Claudía y Dora, por su valiosa amistad, por todos los momentos que pasamos juntos (con los del grupo de bioquímica, la ruta de los taquitos, centenario 107, etc.), por su apoyo incondicional, por sus ocurrencias y hacerme sonreír cada momento, pero sobre todo por estar conmigo en estos años, simplemente muchas gracias.*

*A mis AMIGOS: Rubén, Kuky, Dani, Cinthya Roció, Sofí, Titina y Atzin, gracias por su valiosa amistad, por formar parte de mi vida, por su apoyo y su confianza en mí. Cuando estamos todos juntos es un día muy especial.*

*También quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio 101: Anabel, Liz, Ara, Manu, Maru, José, Lalo y Pau (Lab 114), por su compañía, su amistad y por hacer entretenida la estancia en el laboratorio y fuera de éste.*

*A Chelo por su infinita paciencia, su confianza, su apoyo sincero a cada favor que le solicite, por sus consejos y enseñanza.*

*De manera muy especial agradezco a la Dra. Marina Gavilanes, por su amistad, su apoyo, sus consejos, la confianza que me ha brindado, por la formación académica que de ella he recibido hasta este punto de mi vida.*

*Por último agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de ella y de esta maravillosa Facultad de Química, gracias por todas las oportunidades brindadas.*

ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. Membrana Plasmática.....	2
1.1 Lípidos de la membrana plasmática de plantas.....	2
1.1.1 Glicerolípidos.....	3
1.1.2 Esfingolípidos.....	4
1.1.2.1 Biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos.....	6
1.1.3 Esteroles.....	8
2. ATPasa de H <sup>+</sup> de la Membrana Plasmática de Plantas.....	9
2.1 Estructura y Función.....	10
2.2 Procesos fisiológicos en los que participa.....	13
2.3 Regulación de la actividad de la ATPasa de H <sup>+</sup> .....	14
2.3.1 Expresión diferencial de las isoformas.....	14
2.3.2 Región auto-inhibitoria del carboxilo terminal.....	15
2.3.3 Interacción con la proteína 14-3-3.....	15
2.3.4 Regulación por lípidos membranales.....	16
3. Interacción de lípidos membranales con proteínas.....	18
3.1 Interacción con glicerolípidos.....	18
3.2 Interacción con esteroles.....	19
4. Interacción esfingolípidos-proteína.....	20
<b>ANTECEDENTES INMEDIATOS</b> .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
1. Material biológico.....	24
2. Germinación y crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
3. Crecimiento hasta plantas adultas.....	25
4. Preparación de homogeneizados para la obtención de fracción microsomal de plantas de la línea GC-A.....	26
5. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
6. Determinación de proteína por el método de Lowry.....	27

7. Determinación de hidrólisis de ATP.....	28
8. Determinación de fosfato inorgánico por el método de Chifflet modificado.....	29
9. Determinación del efecto de glicosidasas en la hidrólisis de ATP de la ATPasa de H <sup>+</sup> de vesículas de membrana plasmática de <i>Arabidopsis</i> .....	29
10. Extracción de esfingolípidos de membranas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	29
11. Reconstitución membranal de fracciones microsomales con lípidos exógenos.....	31
12. Análisis de esfingolípidos glicosilados por cromatografía en capa fina (TLC).....	32
13. Preparación de geles de poliacrilamida.....	33
14. Tinción de glicoproteínas con el estuche Pro-Q® Emerald 300 en geles de poliacrilamida.....	34
15. Tinción de geles con plata (Método de Vorum).....	35
16. Tinción con azul de Coomassie.....	36
17. Secado de geles.....	36
18. Inmunoréplica.....	36
19. Determinación de la composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	39
1. Efecto de la reducción de glucosilceramida endógena en la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H <sup>+</sup> en fracciones microsomales de hojas de plantas adultas de <i>A. thaliana</i> .....	39
2. Reconstitución membranal con glucosilceramida exógena en fracciones microsomales de la línea con menor contenido de glucosilceramida que la silvestre.....	40
3. Composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> , silvestre, <i>Atlcb2a-1</i> , <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> .....	43
4. Reconstitución membranal con un extracto enriquecido en esfingolípidos en las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (+).....	49
5. Efecto de la reconstitución membranal con inositol-fosfoesfingosina en la actividad de hidrólisis de ATP de la línea <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (+).....	51
6. Determinación del efecto de la reconstitución membranal con ceramida exógena en la actividad de hidrólisis de ATP de preparaciones membranales de plantas adultas de <i>Arabidopsis</i> .....	54

7. Establecimiento de las condiciones óptimas para medir el efecto de la remoción de carbohidratos de las vesículas de membrana plasmática por $\beta$ -glucosidasa en la actividad de la ATPasa de $H^+$ de membrana plasmática.....	58
8. Determinación del efecto de la remoción de carbohidratos de las vesículas de membrana plasmática por $\beta$ -glucosidasa en la actividad de la ATPasa de $H^+$ de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	60
9. Detección de proteínas glicosiladas en vesículas de membrana plasmática de <i>Arabidopsis thaliana</i> de las líneas silvestre, <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> .....	62
10. Determinación de esfingolípidos glicosilados en vesículas de membrana plasmática de <i>Arabidopsis thaliana</i> de plantas del genotipo silvestre.....	65
11. Validación de los experimentos de la remoción de carbohidratos de las vesículas de membrana plasmática por $\beta$ - glucosidasa.....	68
12. Niveles de la proteína 14-3-3 en las vesículas membranales de plantas silvestre y de las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> con o sin inducción.....	72
13. Niveles de la ATPasa fosforilada en las vesículas membranales de plantas silvestre y de las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> con o sin inducción.....	75
<b>DISCUSIÓN</b> .....	78
1. Especies de esfingolípidos que tienen un papel importante en la interacción con la ATPasa de $H^+$ .....	79
1.1 Papel de la glucosilceramida en el aumento de actividad de la ATPasa de $H^+$ de la membrana plasmática de plantas.....	83
1.2 Efecto de las glicosil-inositolfosforil-ceramidas (GIPCs) en la actividad de la ATPasa de $H^+$ de la membrana plasmática.....	87
2. Participación de la proteína 14-3-3 en el mecanismo de aumento de la actividad de la ATPasa de $H^+$ de la membrana plasmática mediada por cambios en el contenido de esfingolípidos en la membrana.....	91
3. Modelo de la interacción esfingolípido-ATPasa de $H^+$ de la membrana plasmática de <i>Arabidopsis</i> .....	94
<b>CONCLUSIONES</b> .....	100
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	101
<b>APÉNDICE</b> .....	102
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAL	Toxina producida por <i>Alternaria alternata</i>
AHA2	Isoforma 2 de la ATPasa de H <sup>+</sup> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BCL	Base de cadena larga
BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	Albúmina sérica bovina
BTP	Bis-Tris-Propano
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CDF	Citidindifosfato
CoA	Coenzima A
COPI	Por sus siglas en inglés coat complex protein I
d18:0	Dihidroesfingosina o esfinganina
d18:1	Esfinganina o esfingosina
DTT	Ditiotreitol
EE	Error estándar
ESI	Ionización por electrospray
FA	Ácido graso
FB1	Fumonisina B1
GIPC	Glicosil-inositolfosforil-ceramida
GLC	Galactosilceramida
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IPC	Inositolfosforilceramida
MES	Ácido Morfolino etanosulfónico
MS	Espectroscopía de masas
NADPH	Nicotinamina
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PIPES	Piperazina-N, N-bis (ácido 2-etanosulfónico)
PLB	Proteína integral de membrana fosfolambam
PMA2	Isoforma 2 de la ATPasa de H <sup>+</sup> de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Retículo Endoplásmico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
SPT	Serina palmitoiltransferasa
SBD	Dominio de unión a esfingolípidos
SDS	Dodesil sulfato de sodio
t18:0	4-hidroesfingosina o fitoesfingosina
t18:1	4-hidroesfingina o fitoesfingosina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TLC	Cromatografía de capa fina
VLCFA	Ácidos grasos de cadena muy larga

---

**RESUMEN**

La ATPasa de H<sup>+</sup> es una proteína transmembranal esencial para la célula vegetal, de la que dependen varios procesos celulares, por lo que está sujeta a varias formas de regulación. Existen reportes sobre la modulación de la enzima por glicerolípidos y esteroides membranales, pero no sobre el efecto de esfingolípidos, los cuales son muy abundantes en plantas.

Estudios previos de nuestro laboratorio se determinó que mutantes en genes de la vía de síntesis de esfingolípidos de *Arabidopsis thaliana*, presentaban una actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> casi del doble con respecto a las plantas silvestres. El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de esfingolípidos y sus regiones químicas responsables de ese efecto en la enzima. Para ello, se utilizaron plantas de *Arabidopsis*, tanto del genotipo silvestre, como de las líneas *Atlcb2b hp/Atlbc2a* y *GC-A* (con menor contenido de esfingolípidos totales y de glucosilceramida, respectivamente). En las preparaciones membranales de estas plantas, se determinó la composición y cuantificación de los esfingolípidos por HPLC-MS/MS, y se investigó la contribución de la parte polar e hidrofóbica de los esfingolípidos en la actividad de la ATPasa.

Los resultados de la esfingolipidómica revelaron que de las 160 especies de esfingolípidos membranales identificadas, solo la glucosilceramida con una base de cadena larga trihidroxilada (t18:1) y un ácido graso de 22 C, y unas glicosil-inositolfosforil-ceramidas (GIPCs) con ácidos grasos de cadena corta, resultaron estar asociadas al aumento de actividad de la enzima. La desglicosilación controlada indicó que en las membranas de las plantas de las líneas controles expuestas a la glucosidasa, la actividad de la ATPasa se incrementó alrededor de un 50%, mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), la actividad ya no fue estimulada. Al determinar la actividad de ATPasa de la línea *GC-A*, se observó un aumento de alrededor del 50% con respecto a la actividad de la línea silvestre. Esta actividad de la línea *GC-A* se restauró a niveles de la silvestre al realizar la reconstitución membranal con glucosilceramida exógena. La reconstitución membranal con un liso-derivado de una GIPC produjo un aumento en la actividad de ATPasa en la línea silvestre, mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, con un aumento de GIPCs membranales, no se presentó estimulación de su actividad. Lo anterior indica que la glucosilceramida regula negativamente la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, mientras que los GIPCs la regulan positivamente. Los resultados sugieren fuertemente que esta regulación es a través del contacto de la porción polar de los esfingolípidos con la región del carboxilo terminal de la enzima. Estos hallazgos son importantes porque describen por primera vez el perfil de esfingolípidos en la membrana plasmática, revelan una nueva función de estos lípidos en las plantas, que es la de regulación de la bomba primaria más importante de las células vegetales y dan luz sobre el mecanismo molecular de interacción entre un esfingolípido y una proteína membranal.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Membrana Plasmática.**

La membrana plasmática es una barrera continua con permeabilidad muy selectiva, creando un compartimiento cerrado que define el interior y exterior de una célula. La composición química de la membrana plasmática como cualquier otra membrana biológica es diversa y depende de la especie biológica y del tipo celular. Sin embargo, los componentes básicos son los lípidos, proteínas y carbohidratos (unidos a lípidos y proteínas). Los componentes lípidicos de la membrana constituyen la barrera de permeabilidad entre dos espacios acuosos, mientras que las proteínas funcionan como sistemas de transporte que actúan como conductos o bombas para proporcionarle a la membrana su capacidad de transporte selectivo, contribuyendo así a mantener el equilibrio entre el interior y el exterior de las células [Stryer y col., 2004; Holthuis y Levine, 2005; Luckey, 2008].

La estructura de la membrana plasmática se basa en dos monocapas de lípidos contrapuestas entre sí, formando una estructura laminar continua (bicapa lipídica). El centro de la bicapa es de naturaleza hidrofóbica y las superficies externas de sus dos caras son hidrofílicas. Las dos caras de la membrana son asimétricas entre sí, es decir, su composición es diferente cuantitativa y cualitativamente. La bicapa es estable, mantenida por las interacciones hidrofóbicas cooperativas entre los lípidos. Las proteínas membranales, tienen organización y orientación muy precisas en la bicapa [Callen, 2000; Stryer y col., 2004].

#### **1.1 Lípidos de la membrana plasmática de plantas.**

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua pero que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos. Los lípidos de las membranas son moléculas relativamente pequeñas que tienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica. Los principales lípidos de la membrana plasmática son glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides. Una de las propiedades más importantes de estos lípidos, desde el punto de vista biológico, es su hidrofobicidad. Esta propiedad es conferida por los ácidos grasos, las bases esfingoideas o los anillos heterocíclicos [Nelson y Cox, 2006].

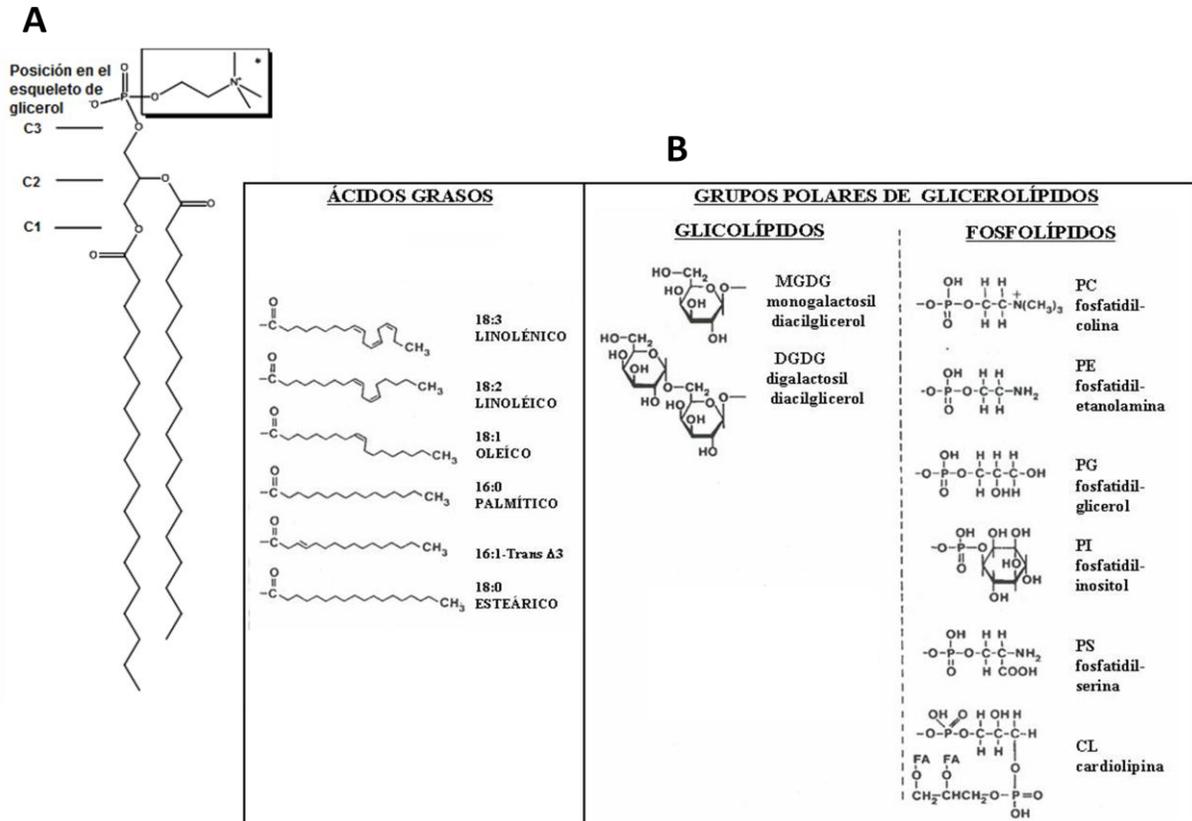
### 1.1.1 Glicerolípidos.

Los glicerolípidos están constituidos por un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y un grupo polar (alcohol fosforilado o carbohidrato). En muchas plantas el glicerol es directamente sintetizado a partir de la dihidroxiacetona fosfato por la acción de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa obteniendo glicerol-3P. Diferentes isoformas de esta enzima están presentes en *Arabidopsis thaliana* y fueron localizadas en la mitocondria y los cloroplastos. Otra ruta alternativa para la síntesis de glicerol es la conversión secuencial de la dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído-3-fosfato por la triosa fosfato isomerasa, seguida de una desfosforilación y una reducción para obtener glicerol, que puede ser fosforilado por la glicerol cinasa para producir glicerol-3-fosfato [Nelson y Cox, 2006].

El cloroplasto es el sitio en donde mayoritariamente se lleva a cabo la biosíntesis *de novo* de los ácidos grasos en plantas. El principal producto de los cloroplastos lo constituyen ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono; estos últimos con una insaturación. El grupo carboxilo de estos ácidos grasos esterifica los grupos hidroxilo de los átomos C1 y C2 del glicerol-3-fosfato (Figura 1A), produciéndose así el ácido fosfatídico o diacilglicerol 3-fostato, que es el glicerofosfolípido más simple y que en las membranas sólo se encuentra en pequeñas cantidades. Sin embargo, el ácido fosfatídico es un intermediario clave en la biosíntesis de otros glicerolípidos, siguiendo dos rutas diferentes, la ruta de diacilglicerol y la ruta del citidindifosfato-diacilglicerol (CDF-diacilglicerol). De estas dos vías se desprenden los dos grupos estructuralmente distintos de glicerolípidos predominantes en las membranas de plantas: los fosfoglicerolípidos (fosfolípidos) los cuales contienen un alcohol fosforilado como grupo polar, y los glicoglicerolípidos (glicolípidos) que contienen carbohidratos como grupo polar, [Ohlrogge y Browse, 1995; Vance y Vance, 2002] (Figura 1B).

En el caso de los fosfolípidos el grupo fosfato del fosfatidato se esterifica con el grupo hidroxilo de un alcohol, como puede ser la etanolamina, la colina, el glicerol o el inositol, dando lugar a la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina, el difosfatidilglicerol y el fosfatidilinositol, respectivamente [Stryer y col., 2004; Luckey, 2008].

En el caso de los glucolípidos se han encontrado dos galactolípidos principales identificados como monogalactosildiacilglicerol y el digalactosildiacilglicerol [Chen y col., 2008]. Las membranas vegetales también contienen sulfolípidos, en los que un residuo de glucosa sulfonado se une a un diacilglicerol por medio de un enlace glucosídico. En los sulfolípidos, el sulfonato de la cabeza polar es portador de una carga negativa, como es el caso del grupo fosfato de los fosfolípidos (Figura 1B) [Nelson y Cox, 2006].



**Figura 1. Estructura de los glicerolípidos.** A) Se muestran la posición de los sustituyentes en el esqueleto de glicerol (Modificado de Vance y Vance, 2002). B) Estructura de los principales ácidos grasos y grupos polares de glicerolípidos de las membranas celulares de plantas (Modificada de Ohlrogge y Browse, 1995).

### 1.1.2 Esfingolípidos.

El estudio más intenso de los esfingolípidos en plantas ha sido emprendido hasta fechas recientes. Estos estudios se han enfocado en determinar la estructura y la proporción de los esfingolípidos en los diferentes tejidos de la planta; en caracterizar los pasos enzimáticos involucrados en su producción y recambio y además, en identificar la variedad de funciones biológicas de estos lípidos [Lynch y Dunn, 2004; Markham y col., 2006; Markham y Jaworski, 2007].

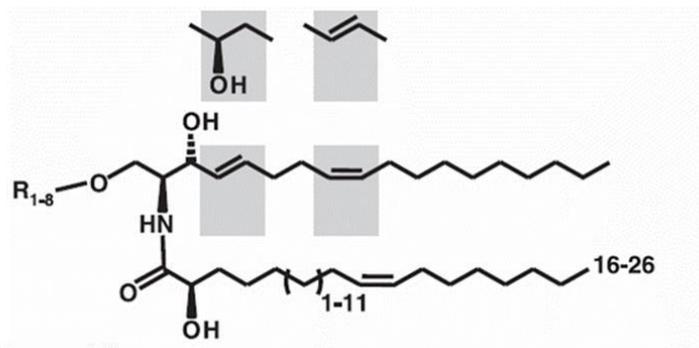
Los esfingolípidos tienen como esqueleto base a la esfingosina (4-esfinganina), un alcohol aminado de cadena larga o base de cadena larga (BCL) o base esfingoidea formado predominantemente por 18 átomos de carbono, la cual presenta un grupo amino en el C2 y un grupo hidroxilo en el C1 y/o C3. Las BCL pueden llegar a presentar dobles enlaces en los carbonos en posición 4 u 8. El grupo amino de la BCL es acilado con un ácido graso de entre 16 a 26 o más, átomos de carbono, formando así a la ceramida, un esfingolípidos intermedio

entre la BCL y esfingolípido complejo. Los esqueletos de ceramida en los esfingolípidos en plantas son altamente variables. Su base de cadena larga puede tener cuatro posibles modificaciones (Figura 2, mostrado con fondo gris), que son, cis(Z) o trans(E)- desaturaciones en el carbono 8, e hidroxilación o (E)-desaturación en el carbono 4, resultando en 7 bases de cadena larga más frecuentes. Estas bases de cadena larga están unidas a 10 diferentes grupos de ácidos grasos, que a su vez varían en su  $\alpha$ -hidroxilación, longitud de la cadena o grado de insaturación. En consecuencia, los esfingolípidos vegetales basan su complejidad y diversidad en numerosas combinaciones posibles de estos ácidos grasos, bases esfingoideas y además en el grupo polar (cabeza) [Sperling y Heinz, 2003; Lynch y Dunn, 2004; Markham y col., 2006; Pata y col., 2010].

Las bases de cadena larga más abundantes en los esfingolípidos complejos son los estereoisómeros (Z) y (E) de la 8-esfinganina, la 4,8-esfingadienina y la 4-hidroxi-8-esfinganina. Tanto la base como el ácido graso pueden estar mono, di, o trihidroxilados y pueden tener uno o varios sitios de insaturación. Al grupo hidroxilo terminal de la BCL se le une un grupo polar que puede estar formado por uno o varios residuos de carbohidrato (esfingolípidos neutros) o por grupos fosforilados (esfingolípidos aniónicos), o por ambos (Figura 2).

Reportes de la composición de esfingolípidos en plantas indican que, según el tipo de su cabeza polar, los presentes en mayor proporción son la glucosilceramida y los esfingolípidos derivados del inositolfosforilceramida (IPC) (Figura 3). Mediante la separación por cromatografía líquida y su posterior identificación por espectroscopía de masas, en extractos de hojas de tomate, soya y *A. thaliana* se han encontrado como esfingolípidos mayoritarios a la *N*-acetil-hexosamina-hexaurónico-inositolfosfoceramida (también referidos como fitoglicolípidos), monohexosilceramidas y ceramidas en un proporción de ~64, 34, y 2% de esfingolípidos totales, respectivamente [Lynch y Dunn, 2004; Markham y col., 2006].

En las hojas, la fracción de las glucosilceramidas está enriquecida en bases de cadena larga trihidroxiladas como isómeros cis (Z), mientras que esfingolípidos aniónicos como la glicosil-inositol-fosforil-ceramida (GIPC por sus siglas en inglés) están enriquecidos en BCL trihidroxiladas como isómeros trans (E) [Pata y col., 2010; Chen y col., 2012].



### Ceramidas

$R_1 = \text{H-}$

### Cerebrósidos

$R_2 = \beta\text{-D-Man-}$

$R_3 = \beta\text{-D-Glu-}$

$R_4 = [\beta\text{-D-Man}(1,4)]_{1-3}\text{-}\beta\text{-D-Glu-}$

$R_5 = \beta\text{-D-Glu}(1,4)\text{-}[\beta\text{-D-Man}(1,4)]_{1,2}\text{-}\beta\text{-D-Glu-}$

### GIPC (Fitoglicolípidos)

$R_6 = \alpha\text{-D-GluN}(1,4)\text{-}\alpha\text{-D-GluA-1,2-}m\text{-Ino}(1\text{-P})\text{-}$

$R_7 = \beta\text{-D-Gal}(1,4)\text{-}\alpha\text{-D-GluNac}(1,4)\text{-}\alpha\text{-D-GluA}(1,2)\text{-}m\text{-Ino}(1\text{-P})\text{-}$

$R_8 = [\alpha\text{-D-Man}(1,2)]\text{-}\alpha\text{-D-GluN}(1,4)\text{-}\alpha\text{-D-GluA}(1,6)\text{-}m\text{-Ino}(1\text{-P})\text{-}$

**Figura 2. Estructura de los esfingolípidos encontrados en las plantas.** Los cerebrósidos se forman por glicosilación del grupo hidroxilo en el carbono 1 en la ceramida ( $R_1$ ), dando paso a la  $\beta$ -D-glucosil y la  $\beta$ -D-manosilceramida ( $R_{2-3}$ ). Los derivados glicosilados pueden ser alargados por adiciones secuenciales de más de tres residuos  $\beta$ -1,4-glicosilo ( $R_{4-5}$ ). Las glicosil-inositol-fosforil-ceramidas (GIPC) aisladas de hojas de tabaco ( $R_{6-7}$ ) y granos de maíz ( $R_8$ ) contienen un residuo de 1-fosfo-mio-inositol unido al carbono 2. Derivados adicionales con residuos glicosilos con más galactosilos (Gal), manosilos (Man), ácido glucoronico (GluA), glucosamina (GluN) y N-acetilglucosamina (GluNac) han sido aislados de  $R_{7-8}$  (Tomada de Sperling y Heinz, 2003).

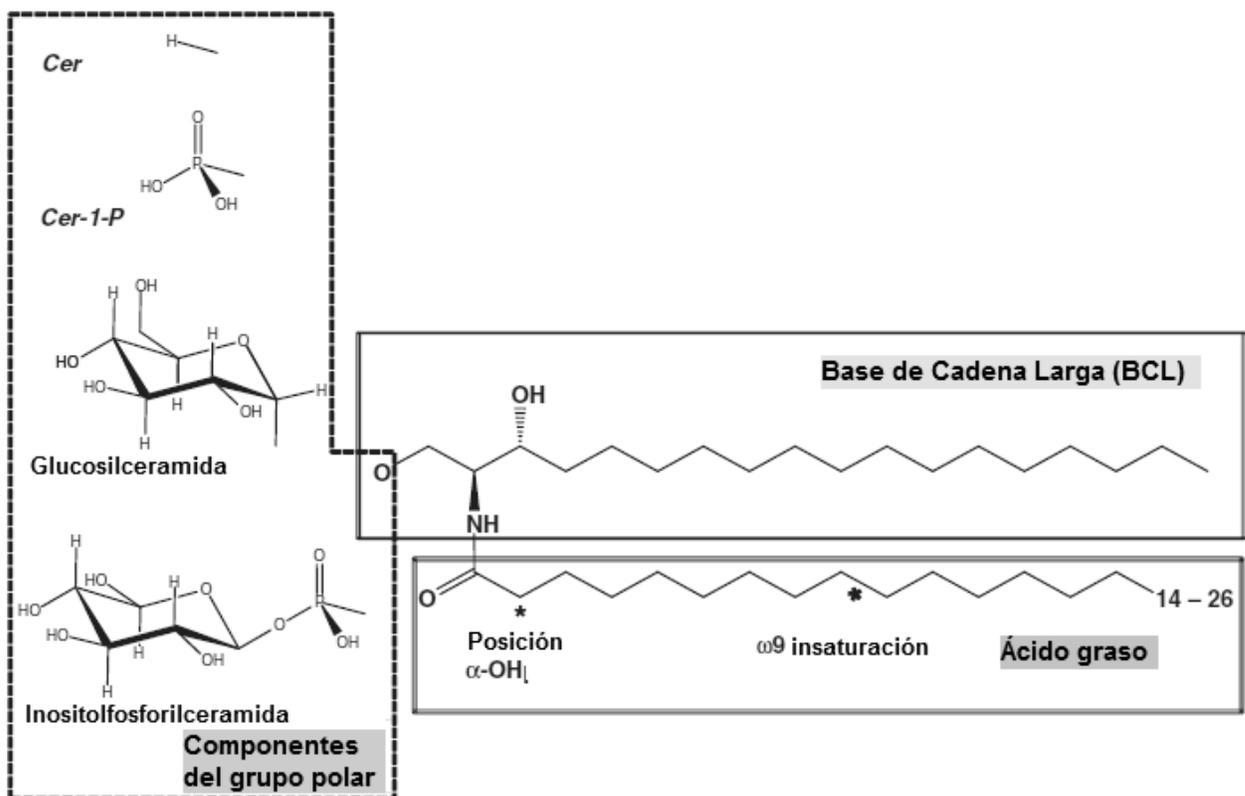
#### 1.1.2.1 Biosíntesis *de novo* de esfingolípidos.

La biosíntesis de los esfingolípidos inicia en el retículo endoplásmico (RE) con la condensación de la *L*-serina y la palmitoil-CoA para formar 3-cetoesfinganina. Esta reacción es catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT), heterodímero formado por las subunidades LCB1 y LCB2, localizado en el RE. En la segunda etapa de la síntesis, la 3-cetoesfinganina es reducida a la forma esfinganina, mediante la 3-cetoesfinganina reductasa utilizando NADPH. En una reacción subsecuente, la esfinganina puede ser fosforilada mediante la esfinganina cinasa para dar lugar a la formación de esfinganina-1-fosfato. Para la formación de la ceramida, el grupo amino de la esfinganina es acilado mediante un enlace amida, catalizado por la esfinganina *N*-aciltransferasa o también conocida como ceramida sintasa.

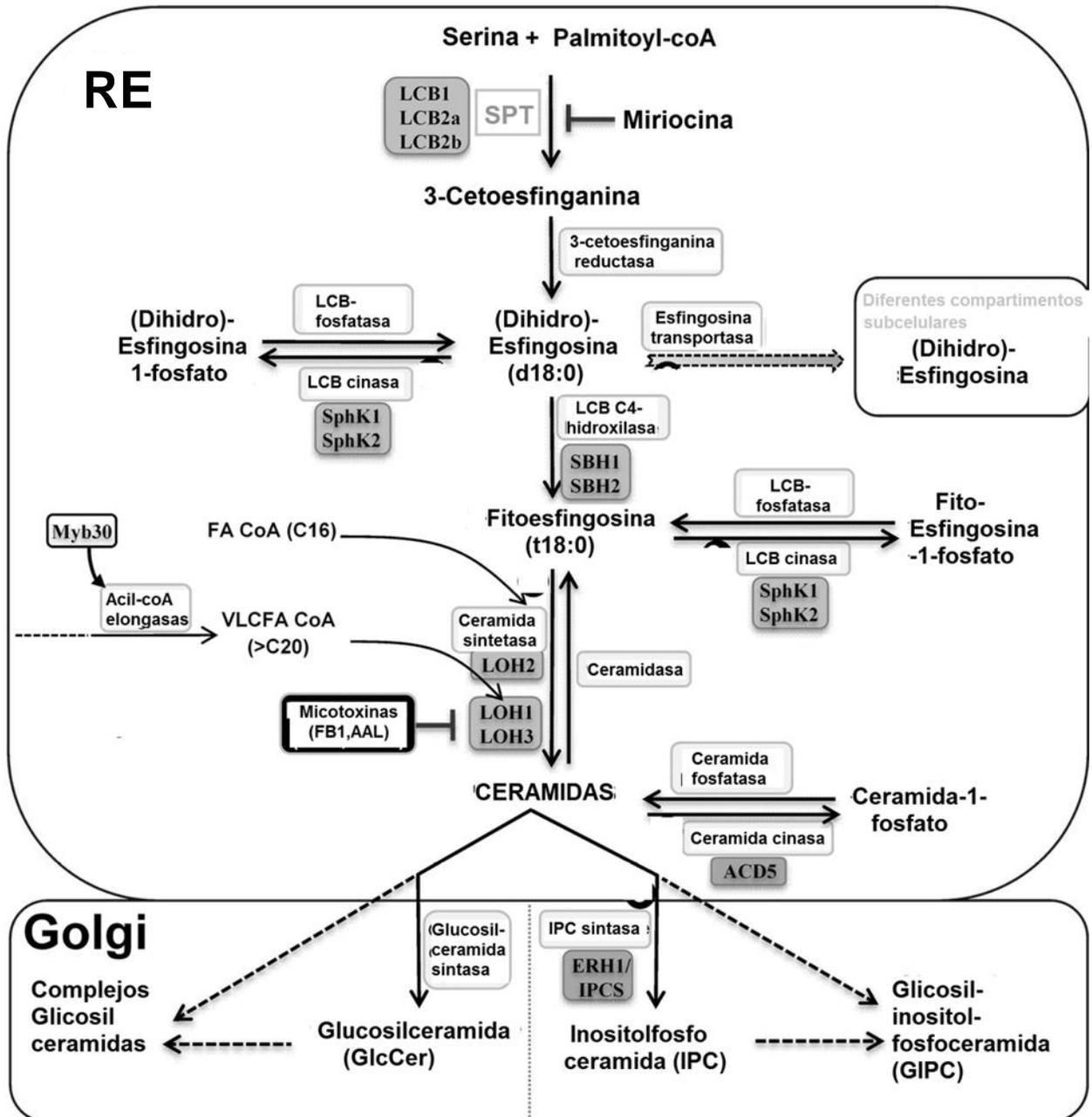
Una vez que el esqueleto de ceramida es sintetizado, tanto las bases de cadena larga como los residuos acil-aminados son modificados posteriormente por desaturaciones y/o

hidroxilaciones para formar las especies moleculares comúnmente encontradas en plantas. Posteriormente, a las ceramidas se le incorporan enzimáticamente diversos grupos polares para la formación de los esfingolípidos complejos, como son GIPCs y glucosilceramidas (Figura 4) [Chen y col., 2006].

Los esfingolípidos complejos son sintetizados en el lumen del aparato de Golgi y no tienen acceso a la cara citosólica, por lo que se ha sugerido que son selectivamente incluidos en membranas a través de un movimiento anterógrado o hacia adelante de acuerdo al modelo de maduración en cisterna, por tanto, el transporte neto anterógrado puede llevarse a cabo si se previene que los esfingolípidos dejen la cisterna en la cual son sintetizados [Holthuis y Levine, 2005].



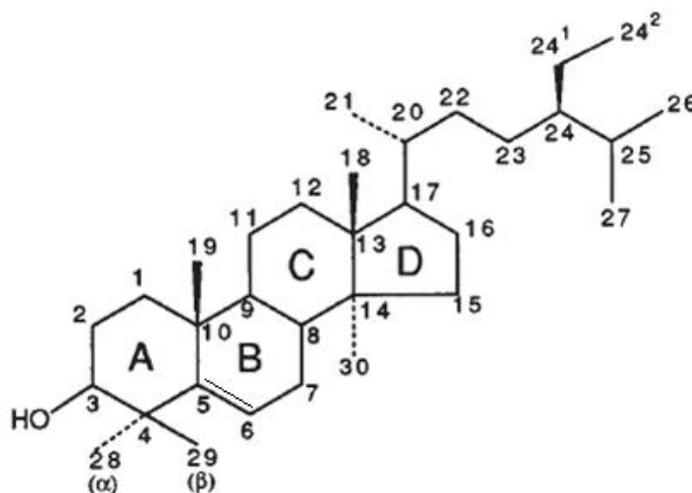
**Figura 3.** Estructura de los esfingolípidos complejos reportados en plantas (Modificada de Pata y col., 2010).



**Figura 4.** Esquema de la secuencia de reacciones de la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos en plantas. En las cajas blancas se muestran los nombres de las enzimas involucradas en la síntesis de esfingolípidos comensando con la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), en las cajas grises se encuentran los genes que codifican para las enzimas de la vía. También se indican los sitios de acción de inhibidores de la vía (Mirioxina, fumonisina B1 (FB1) y la toxina de *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* (AAL)) (Modificada de Berkey y col., 2012).

### 1.1.3 Esteroles.

Los esteroides son otra clase de lípidos que se pueden encontrar en la membrana, los cuales son compuestos que contienen un núcleo de cicloperihidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el C3 y un enlace doble en el carbono 5 (Figura 5). En plantas, la biosíntesis de esteroides comprende más de 30 reacciones catalizadas por enzimas que se encuentran en su mayor parte en RE. La ruta biosintética está caracterizada por varios pasos restringidos exclusivamente a plantas, como la ciclización del óxido de escualeno a cicloartenol; la apertura del anillo 9 $\beta$ ,19-ciclopropano del cicloeucalenol catalizada por la cicloeucalenol-obtusifol isomerasa. Todos los tejidos vegetales pueden formar sus propios esteroides. Las variaciones estructurales que resultan de diversas sustituciones en la cadena lateral, así como en el número y posición de nuevos enlaces en el sistema de anillos generan una mezcla de compuestos con propiedades diferentes en cuanto a su distribución celular. La membrana plasmática tiene una mayor proporción de esteroides mientras que en el RE, el tonoplasto y las membranas mitocondriales este contenido es menor [Hartmann, 1998].



**Figura 5.** Estructura básica de un esteroide con la numeración estándar de los carbonos de acuerdo a las recomendaciones de la convención IUPAC-IUB de 1989. Los anillos del policiclo se diferencian asignándoles las letras mayúsculas A, B, C y D, a partir del grupo OH del carbono 3. Las posiciones  $\alpha/\beta$  describen las configuraciones cis-trans de los sustituyentes. [Modificada de Moss, 1989].

En muchas plantas superiores, los esteroides con grupos hidroxilo libres en la posición 3 $\beta$ , también llamados esteroides libres, son los productos mayoritarios. De éstos, los más comunes de la membrana plasmática son el campesterol (C<sub>28</sub>), el sitoesterol (C<sub>29</sub>) y el

estigmasterol ( $C_{29}$ ). El sitoesterol es el más abundante, representando del 50% al 80% de los esteroides totales contenidos en algunas plantas [Buchanan y col., 2000]. Sin embargo, los esteroides también están presentes en conjugados con ácidos grasos conocidos como esteroides esteril ésteres o unidos en la posición  $\beta$  por un monosacárido, usualmente glucosa, para formar esteril glucósidos [Hartmann, 1998]. Los ésteres de esteroles, los glicósidos de esteroides acilados y no acilados son más abundantes en plantas que en animales.

## **2. ATPasa de $H^+$ de la Membrana Plasmática de Plantas.**

En todos los eucariotas el potencial de membrana y el transporte secundario es energizado por la actividad de las proteínas membranales tipo P como la ATPasa de  $H^+$  (bomba de protones) en plantas y hongos [Serrano y col., 1986; Morsome y col., 2000; Palmgren, 2001], y la ATPasa  $Na^+/K^+$  (la bomba de sodio-potasio) en animales [Skou y Esmann, 1992]. El nombre de tipo P de estas familia de ATPasas transductoras de energía deriva del hecho de que al obtener la energía del ATP, estas enzimas forman un intermediario fosforilado covalentemente en un residuo de ácido aspártico (Asp-329). La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática es una proteína transmembranal de 948 a 957 residuos de aminoácidos, según la isoforma y la especie de planta, lo que corresponde a un peso molecular aproximado de 100 kDa. La ATPasa de  $H^+$  en plantas, acopla la hidrólisis de ATP (reacción exergónica) al transporte de protones a través de la membrana plasmática (reacción endergónica, pues los protones se mueven en dirección contraria a su gradiente de concentración).

### **2.1 Estructura y Función.**

Se cuenta con la estructura cristalográfica de la ATPasa de  $H^+$  de plantas (isoforma 2 de la ATPasa de  $H^+$  de *Arabidopsis thaliana*) a una resolución de 3.6 Å (Figura 6) [Pedersen y col., 2007]. En ella se identifican cuatro dominios estructurales; un dominio lipídico de 10 cruces transmembranales nombrados de M1 a M10, que permite el paso de protones desde el citosol hacia el apoplasto, y tres dominios citosólicos nombrados de acuerdo a su contraparte en la ATPasa de  $Ca^{2+}$ :

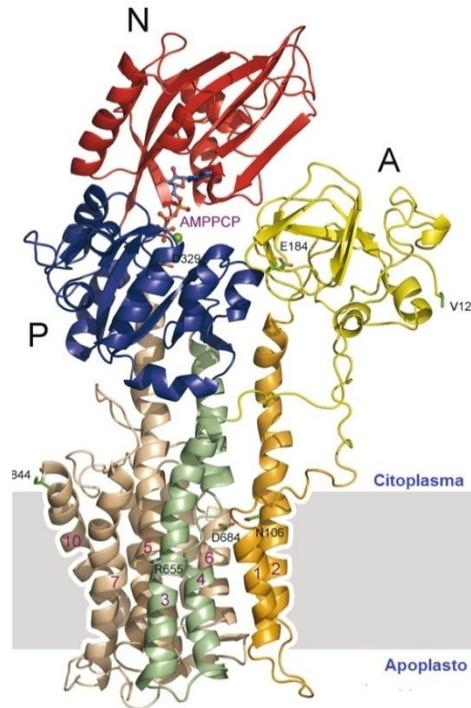
- El dominio P (dominio de fosforilación; residuos aminoácidos 308-337 y 489-625), que está unido a los cruces transmembranales denominados M4 y M5, en el se encuentra el aspártico 329 que se fosforila durante la catálisis.
- El dominio N (dominio de unión al nucleótido; residuos aminoácidos 338-488) que está unido directamente al dominio P y contiene el sitio de unión a ATP; la adenosina del ATP

se enlaza en el dominio N, mientras que el grupo trifosfato y el ión magnesio ( $Mg^{2+}$ ) se extiende hacia el dominio P. El ión  $Mg^{2+}$  es absolutamente requerido por la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática para llevar a cabo la hidrólisis de ATP, pues el sustrato de la reacción enzimática es  $Mg^{2+}$ -ATP. Se ha sugerido que el ión  $Mg^{2+}$  se coordina a dos residuos de aspártico que pudieran corresponder al Asp-588 y al Asp-592, proponiéndose esta interacción próxima al Asp-329 catalítico [Palmgren, 2001].

- El dominio A (dominio activador; residuos aminoacídicos del 12-57 y 129-233) que comprende la región amino terminal y la pequeña región citoplasmática entre los cruces transmembranales denominados M1 y M2; el Glu-184 del motivo conservado TGES, está implicado en la funcionalidad del dominio A como fosfatasa, estimulando la desfosforilación del Asp-329, lo cual indica que se requiere una rotación del dominio A hacia el dominio P para que ocurra la desfosforilación, y viceversa, el dominio A se aleja del dominio P, permitiendo el acercamiento del dominio N con el nucleótido unido para montar el sitio catalítico en el que el Asp-329 será fosforilado en cada ciclo de bombeo.

Cabe señalar que el dominio de regulación (R), que comprende a la región del carboxilo terminal, no se pudo resolver en la estructura cristalográfica, ya que la parte comprendida entre los residuos 858-948 no tiene una estructura definida en la forma activa de la proteína. Pero, cuando residuos específicos eran mutados por alanina, un patrón aparecía en el que el dominio de regulación mantenía una interacción con la enzima "enroscándose" alrededor del cuerpo de la ATPasa para interactuar con el dominio A en la parte superior de los segmentos M1 y M2. En esta posición, como se sugiere en la interpretación, se bloquea potencialmente la entrada de protones a los sitios transmembranales de unión y se restringe la libre rotación del dominio A que es esencial para la función de transición de desfosforilación-fosforilación en el ciclo de bombeo de la enzima, como se mencionó anteriormente [Pedersen y col., 2007].

En cuanto a la estructura cuaternaria de la proteína, se desconoce con certeza si la proteína puede formar algún tipo de arreglo oligomérico en la membrana. Se ha determinado que la ATPasa de  $H^+$  pasa de ser un dímero a un hexámero cuando se fosforila e interactúa con la proteína 14-3-3 [Kanczewska y col., 2005; Ottmann y col., 2007] y también se ha determinado que la biosíntesis de ceramida es necesaria para formar complejos oligoméricos de la ATPasa de  $H^+$  de levadura, cuando es sintetizada en el retículo endoplásmico [Lee y col., 2002].

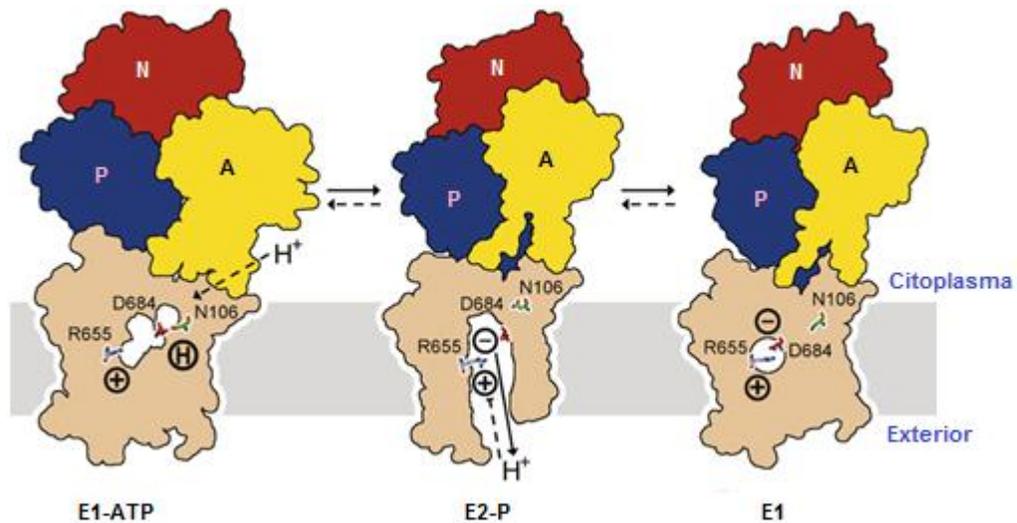


**Figura 6. Estructura cristalográfica de la isoforma AHA2 de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática.** La estructura presenta la forma activa de la bomba de protones (en presencia del AMPPCP que es un análogo de ATP no hidrolizable y sin el carboxilo terminal auto-inhibitorio de la ATPasa), se muestran los cuatro dominios reconocidos en la ATPasa de  $H^+$  (modificada de Pedersen y col., 2007). En color rojo se muestra el dominio de fosforilación (P), en color azul el dominio de unión al nucleótido (N), en color amarillo el dominio activador (A) y en color café el dominio lipídico.

Se ha sugerido que la ATPasa de  $H^+$  alterna entre al menos dos conformaciones principales,  $E_1$  y  $E_2$ . La forma  $E_1$  tiene gran afinidad por el ATP, así como por el ión  $H^+$  a ser transportado fuera del citoplasma. La forma  $E_2$  tiene baja afinidad por los ligandos, pero tiene una alta afinidad por el inhibidor vanadato. Ésta es la forma que une covalentemente al  $P_i$  durante la reacción en el Asp-329. El transporte del ión  $H^+$  de un lado de la membrana hacia el otro está asociado con el cambio conformacional entre  $E_1$  y  $E_2$  (Figura 7); esta característica sugiere un mecanismo de acoplamiento de la ATPasa de  $H^+$  entre la formación del sitio de fosforilación en los dominios citoplasmáticos y la oclusión de los sitios de unión a  $H^+$  [Palmgren, 2001; Pedersen y col., 2007].

Estudios en algunas mutantes demuestran que el Asp-684, mismo que está conservado en todas las ATPasa de  $H^+$  de membrana plasmática, es esencial para el transporte de protones durante las transiciones  $E_1$  y  $E_2$ , y es por tanto el mejor candidato para el sitio de unión de  $H^+$  en las ATPasa de  $H^+$  tipo P. El Asp-684 se aproxima al Asn-106 localizado en la  $\alpha$ -hélice transmembranal M2; siendo ambos factibles en la formación de enlaces de hidrógeno; el par protonado Asp-684: Asn-106 funge por tanto como el guardián de la puerta a lo largo de la vía

de transporte. La Arg-655 del M5 puede quedar expuesta en la vía de salida del protón. En esta posición, podría servir como un enchufe positivo que evita el reflujo de protones en el sitio de unión transmembranal [Pedersen y col., 2007].



**Figura 7. Estados de transición durante la catálisis de la ATPasa de H<sup>+</sup>.** Las formas E<sub>1</sub>-ATP, E<sub>2</sub>-P y E<sub>1</sub> son estados conformacionales que atraviesa la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática durante su ciclo catalítico. La fosforilación del residuo Asp329 constituye el intermediario fosforilado altamente energético denominado E<sub>1</sub>-ATP, subsecuentemente, una molécula de ADP es liberada junto con el Mg<sup>2+</sup>, entonces ocurre el cambio conformacional; llevando a la conformación E<sub>2</sub>-P; seguida de la liberación de un protón al exterior. Finalmente, el Pi es liberado por hidrólisis del enlace Asp329-P y la enzima regresa al estado E<sub>1</sub>. El signo (+) indica la carga de la arginina (R655) y el signo (-) indica la carga de ácido aspártico (D684). Las letras N, P y A son los dominios citosólicos descritos en la Figura 6 (modificada de Pedersen y col., 2007).

## 2.2 Procesos fisiológicos en los que participa.

La ATPasa de H<sup>+</sup> se encuentra en todos los tejidos celulares de las plantas, sólo que en diferente cantidad, debido a la función específica de cada grupo celular y a las características específicas de las diferentes isoformas de la enzima.

Esta enzima facilita energéticamente el transporte de solutos (iones, aminoácidos, azúcares, etc.) a través de acarreadores y canales, ya que la apertura de éstos últimos es sensible al potencial electroquímico de H<sup>+</sup> generado por la enzima, pues la ATPasa al bombear H<sup>+</sup> al exterior de la célula, genera un gradiente de concentración de H<sup>+</sup> ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) a ambos lados de la membrana plasmática. Este  $\Delta\mu_{H^+}$  tiene dos componentes: la diferencia de potencial eléctrico transmembranal ( $\Delta\psi$ ) y la diferencia de pH a ambos lados de la membrana ( $\Delta pH$ ), ambos constituyen la fuerza energética necesaria para llevar a cabo diferentes transportes a través de la membrana plasmática (transporte secundario). El movimiento de los carbohidratos y

aminoácidos a través de la membrana plasmática se realiza por sistemas de simporte carbohidrato/ $H^+$  o aminoácido/ $H^+$ , que requieren de esta diferencia de potencial eléctrico o un  $\Delta pH$  generado por la ATPasa [Chang Li y Bush, 1991; Bush, 1993; Gavilanes y col., 1995]. Se ha demostrado que las plantas expuestas a un estrés osmótico alto, responden activando a la ATPasa de  $H^+$  para mediar la salida de protones y tomar  $K^+$  del medio, lo que trae en consecuencia la adaptación osmótica [Sondergaard y col., 2004]. Gracias al bombeo de protones al exterior de la célula, la ATPasa de  $H^+$  ayuda al cierre y apertura de estomas, ya que al activar a la ATPasa aumenta el transporte de  $H^+$  hacia el exterior de la célula, lo que a su vez hiperpolariza la membrana plasmática, favoreciendo la entrada de  $K^+$  por canales membranales específicos. La acumulación interna de osmolitos, como el  $K^+$  y el malato, induce la entrada de agua a la célula para equilibrar las concentraciones internas y externas de soluto, provocando que las células se hinchen y generen cambios en la curvatura de la pared celular. Esto, finalmente, lleva a la apertura del poro estomático [Gavilanes y col., 1995; Kinoshita y Shimazaki, 1999; Liu y col., 2009].

Otra función de la ATPasa de  $H^+$  en la célula es la elongación celular, que es una función fisiológica básica para el crecimiento y desarrollo de las semillas. En este sentido, la ATPasa de  $H^+$  produce una acidificación del medio extracelular, provocando un incremento de la extensibilidad de la pared celular, permite la entrada de agua y el aumento del volumen celular [Antipova y col., 2003; Sánchez-Linares y col. 2012].

### **2.3 Regulación de la actividad de la ATPasa de $H^+$**

#### **2.3.1 Expresión diferencial de las isoformas.**

Una forma de regular el metabolismo consiste en promover la expresión diferencial de distintas isoformas de una enzima clave. En el caso de la ATPasa de  $H^+$  se han identificado varios genes que codifican, cada uno, para diferentes isoenzimas. Para el género *Arabidopsis* se sabe que existen 12 genes que codifican para la síntesis de variantes de la ATPasa de  $H^+$  que han sido denominadas como AHA1-AHA12 [Gavilanes y col., 1995; Palmgren, 2001]. Dos de estas isoformas, AHA1 y AHA2 se expresan en todos los tejidos y órganos, indicando que estas isoformas parecen funcionar en el mantenimiento continuo de la homeostasis celular de iones. Se ha encontrado que el principal transcrito en plántulas es el de AHA1, mientras que el de AHA2 predomina en raíces y especialmente en los pelos radiculares [Gaxiola y col., 2007]. Se ha reportado que mutantes que contienen interrupciones en los genes que codifican para las isoformas AHA1 y AHA2 resultan letales para la planta [Haruta y col., 2010]. Aunado a esto algunas de las rutas de biogénesis de las isoformas de la ATPasa de  $H^+$  de tabaco (Pma1) son

dependientes de lípidos de cadena larga [Gaigg y col., 2005]. Las propiedades funcionales de las isoformas individuales han sido determinadas expresando los genes de AHA en levadura. En general, las propiedades catalíticas son similares, pero varían en su afinidad por el ATP; por ejemplo las isoformas AHA1 y AHA2 tienen una afinidad diez veces mayor por el ATP ( $K_m = 0.15$  mM) que la isoforma AHA3 ( $K_m = 1.5$  mM) [Palmgren y Christensen, 1994].

### 2.3.2 Región auto-inhibitoria del carboxilo terminal.

El C-terminal está altamente conservado en la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática de plantas, contiene varios sitios de fosforilación y una región conservada que interactúa directamente con la proteína 14-3-3, que es una proteína reguladora. La actividad de la enzima se restablece o aumenta cuando el aminoácido Thr948 de la región del carboxilo terminal es fosforilado por una cinasa de treonina/serina [Olsson y col., 1998]. La fosforilación es la señal para que la proteína 14-3-3 se una al carboxilo terminal y éste se separe del sitio catalítico de la ATPasa de  $H^+$ , aumentando su actividad.

Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias específicas de aminoácidos de la proteína, y por experimentos de modificación química y de mutantes, se han obtenido evidencias de la presencia de un dominio auto-inhibitorio denominado R, el cual se ha postulado que está formado por 100 aminoácidos localizados en la región del C-terminal [Kasamo, 2003]. Se ha reportado que en la secuencia de aminoácidos de esta región del carboxilo terminal de *S. cerevisiae*, hay dos puntos de regulación en este dominio. El primero está definido por los aminoácidos Arg-909 y Thr-912, que son esenciales para el cambio de  $V_{max}$  producido por la activación ATPasa; mientras que el segundo sitio está definido por Ser-899 y Glu-901 y es necesario para el cambio de la  $K_m$  [Olsson y col., 1995; Portillo, 2000]. Por tanto, bajo condiciones basales, el carboxilo terminal interactúa con el sitio catalítico de la enzima inhibiendo la actividad de la enzima. La interacción inhibitoria entre este dominio y el sitio de unión al ATP y/o al  $H^+$  puede estar modulada por la unión de moléculas efectoras, fosforilación, proteólisis parcial o por ablación a nivel genético [Palmgren, 1991].

### 2.3.3 Interacción con la proteína 14-3-3.

Las proteínas 14-3-3 forman un grupo de proteínas altamente conservadas en organismos eucariontes y regulan muchos blancos celulares. Constituyen una familia grande de proteínas homólogas codificadas por genes separados. Las proteínas 14-3-3 existen en su mayoría como dímeros cuyos monómeros tienen un peso de 30 kDa [Fu y col., 2000]. Cada monómero

contiene dominios de unión a una  $\alpha$ -hélices de la proteína blanco. Un requerimiento para que las proteínas 14-3-3 se unan es la fosforilación de la proteína blanco [Morsomme y Boutry, 2000].

Debido a que las proteínas 14-3-3 están involucradas en interacciones proteína-proteína, se ha sugerido que participan en la respuesta al estrés en plantas a través de muchos mecanismos. Por tanto, ellas pueden regular la actividad de proteínas individuales que tengan funciones de señalización o de defensa. Alternativamente, pueden participar en la formación de complejos multiproteicos por su habilidad de actuar como adaptadores. También pueden regular la expresión de genes inducidos por el estrés, modificando la actividad y/o localización de factores de transcripción. Como las proteínas 14-3-3 requieren de una fosforilación previa en una secuencia específica de unión, las interacciones reguladoras están mediadas en muchos casos por la activación de rutas de señalización que resultan en una fosforilación de proteínas [Fu y col., 2000].

La proteína 14-3-3 activa a la ATPasa de  $H^+$  por medio de su interacción con el dominio carboxilo terminal en los motivos arginina-serina-x-Pserina-x-prolina (donde x puede ser cualquier otro aminoácido y Pserina es una serina fosforilada) y tirosina-treonina-valina de la ATPasa [Fuglsang y col., 2003]. Un ejemplo de este fenómeno es el de plantas sometidas a un estrés abiótico y en las que en condiciones de baja temperatura y alta osmolaridad, las proteínas 14-3-3 interactúan con el sitio auto-inhibitorio del carboxilo terminal de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, activando el bombeo de protones que es crucial en el sistema protector que las plantas han desarrollado contra las influencias adversas provenientes del exterior [Borch y col., 2002; Roberts y col., 2002].

Se ha visto también que el tratamiento de tejidos de plantas con la toxina fusicoccina producida por el hongo *Fusicoccum amygdali*, la cual produce una gran estimulación en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , trae concomitantemente un marcado incremento en la asociación de las proteínas 14-3-3 con la ATPasa de  $H^+$ . Se ha descrito que la fusicoccina estabiliza el complejo ATPasa de  $H^+$ /14-3-3 [Olsson y col., 1998; Morsomme y Boutry, 2000].

### **2.3.4 Regulación por lípidos membranales.**

La estructura y organización de los lípidos membranales desempeñan un papel importante en la conformación de la ATPasa de  $H^+$  y por tanto en la modulación de su actividad. Lo anterior se ha puesto en evidencia gracias a experimentos en los que se han probado los efectos de glicerolípidos, esteroides y detergentes en la actividad de la enzima.

La regulación de una enzima por los lípidos membranales que la rodean, se ha explicado por dos mecanismos: la teoría de los lípidos en conjunto y la teoría de los lípidos frontera (anulares) [Kasamo y Sakakibara, 1995].

La teoría de los lípidos de conjunto (bulk) establece que los cambios en la composición de la membrana alteran la fluidez de ésta, lo que provoca o impide un cambio conformacional en la enzima, y por lo tanto repercute en su actividad. Hay que mencionar que las membranas tienen una gran movilidad lateral de sus componentes, por ello, los lípidos de conjunto podrían estar afectando la conformación de la enzima.

La fluidez es un concepto dinámico relacionado con el orden estructural de las membranas y depende de la estequiometría esteroides-lípidos complejos presentes en la membrana, de la temperatura y de la composición de los lípidos (misma que involucra ya sea la longitud de las cadenas acílicas o la presencia de dobles ligaduras en ellas). La parte polar de los lípidos membranales también puede influir en la fluidez, dado que algunos lípidos tienen cabezas hidrofílicas muy voluminosas. Los grupos acilo de cadena larga en los lípidos incrementan la actividad de la ATPasa y afectan también la fluidez de la membrana; haciendo que ésta disminuya [Gutiérrez-Nájera y col., 2005].

La teoría de los lípidos frontera o anulares establece que algunas moléculas lipídicas de la membrana están unidas estrechamente a la proteína y se recambian poco con los lípidos de conjunto. Las interacciones entre estos lípidos anulares y las proteínas de la membrana pueden causar la modificación de la actividad de la proteína. Se ha propuesto que la composición de los fosfolípidos anulares alrededor de la proteína podría diferir de la composición del resto del conjunto de los fosfolípidos que integran la bicapa, lo que ofrece una explicación más lógica sobre la especificidad de las interacciones y uniones entre los lípidos y la proteínas de membrana [Kasamo, 2003].

Lo que se ignora es qué partes de la ATPasa de  $H^+$  se pueden unir al anillo de lípidos. Una posibilidad es que los lípidos anulares se combinen con el dominio autoinhibitorio, de esta manera, los lípidos anulares activarían a la ATPasa enmascarando o desplazando el dominio auto-inhibitorio. Otra alternativa es que el dominio auto-inhibitorio interactúe con el sitio activo de la ATPasa de  $H^+$  siendo éste accesible a tales lípidos anulares [Kasamo, 2003]. Otra posibilidad es que los lípidos anulares interaccionen con regiones del canal de  $H^+$  que estarían en contacto indirecto, pero efectivo sobre el sitio catalítico.

### **3. Interacción de lípidos membranales con proteínas.**

Las proteínas membranales dependen de lípidos específicos desde su formación en el retículo endoplásmico, su ensamblaje correcto y su envío posterior a su destino final, así como su función y desempeño óptimo en el ambiente membranal definitivo [Lee y col., 2002; Gaigg y col., 2005; Gaigg y col., 2006]. Se ha sugerido que los cambios locales o temporales en la composición lipídica son potentes reguladores de los procesos celulares. Por tanto, la composición lipídica de la membrana plasmática afecta la estructura y la función de sus proteínas [Dowhan y col., 2004]. Se ha sugerido que la interacción de las proteínas de membrana con los lípidos de la bicapa permite rearrreglos estructurales de la proteína que preserva la integridad estructural de la membrana. Esto es especialmente importante porque muchas proteínas de membrana experimentan cambios conformacionales en la región transmembranal, que son esenciales para su actividad. La movilidad y la flexibilidad de los lípidos permiten mantener la integridad funcional de la membrana, ya que los lípidos pueden adherirse a la superficie anfífilica de las proteínas integrales y su composición puede ajustarse a cambios ambientales [Reyes-Mateo y col., 2006].

#### **3.1 Interacción con glicerolípidos.**

Se han hecho experimentos para determinar los requerimientos lipídicos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, por ejemplo la deslipidación selectiva de la enzima para modificar su ambiente lipídico original. Para ello, primero se purifica la enzima y después se recostituye con componentes lipídicos de manera selectiva y se estudia su efecto en la actividad. Otra estrategia ha sido la de modificar el ambiente anfipático sometiendo a la enzima a la solubilización con varios detergentes que preserven su actividad [Brauer y Tu, 1989]. En la mayoría de los casos, se ha encontrado que los fosfolípidos como la asolectina, el fosfatidilinositol, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, la fosfatidilcolina, la lisofosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol, estimulan la actividad de la enzima [Serrano y col., 1988; Kasamo, 1990].

Los grupos polares de los glicerofosfolípidos, tales como el glicerol, el inositol y la serina, sólo activan poco o nada a la enzima; mientras que la etanolamina o la colina no tienen efecto [Kasamo y col., 1987]. Se ha observado que el grado de insaturación y la longitud de las cadenas de ácidos grasos están relacionados con la actividad de la enzima. La actividad disminuye cuando se incrementa el tamaño y el grado de insaturación de la cadena [Kasamo, 2003]. La lisofosfatidilcolina es un detergente natural producido por la fosfolipasa A<sub>2</sub> y se ha

visto que estimula a la ATPasa de  $H^+$  al unirse a sitios específicos provocando cambios conformacionales que llevan a estados de alta o baja afinidad por el ATP [Palmgren y col., 1988; Gomès y col., 1996]. La lisofosfatidilcolina y otros detergentes zwitteriónicos (zwittergent 3-8, zwittergent 3-10 y zwittergent 3-12) estimulan a la ATPasa de  $H^+$  de plantas, ocasionando un aumento de la  $V_{max}$ , disminución de la  $K_m$  aparente y el desplazamiento del pH óptimo [Palmgren y col., 1990]. Se ha visto que delecciones en la región del C-terminal o el tratamiento con fusicoccina generan una ATPasa de  $H^+$  que ya no es estimulada con estos detergentes, sugiriendo que la estimulación puede ser resultado de un posible desplazamiento del dominio auto-inhibitorio (el C-terminal) de su sitio de interacción con la enzima [Morsomme y col., 1998].

### **3.2 Interacción con esteroides.**

Los esteroides son esenciales para el crecimiento de muchos tipos celulares. El colesterol es el esteroide principal de animales, el ergosterol predomina en levaduras y hongos en general. En plantas, la composición es más compleja, los esteroides de mayor cantidad en la membrana plasmática corresponden al campesterol, stigmasterol y sitosterol [Palmgren, 1991]. Hay estudios que han mostrado que la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática puede estar regulada a través de la interacción con lípidos de membrana y este es el caso de los esteroides, pues su contenido en la membrana plasmática de las plantas influye en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ . Se ha visto que, alteraciones en la composición de esteroides de la membrana plasmática produce cambios en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , tanto en la hidrólisis de ATP como en el bombeo de protones; stigmasterol aumenta la actividad, mientras que el sitosterol y el campesterol la inhiben [Cooke y col., 1994]. Se han sugerido dos teorías para explicar la modulación de la actividad de la ATPasa por los esteroides [Grandmougin y col., 1997].

De acuerdo a la primera teoría, cambios en la composición lipídica pueden inducir una alteración de las propiedades físicas de la bicapa lipídica, específicamente en la fluidez. Por ello, indirectamente la enzima puede experimentar cambios conformacionales, y esto puede resultar en modificaciones en su actividad. Mientras que la segunda teoría se basa en una interacción directa de los esteroides con la enzima, la cual se basa en especificidades estructurales entre el esteroide y la enzima. Diferentes estudios sugieren que los cambios en la actividad de la enzima aparentemente son independientes de la fluidez, sugiriendo que la interacción directa lípido-proteína está involucrada; sin embargo, debido a la complejidad del metabolismo de los esteroides en la membrana, la regulación de la actividad de la ATPasa de la

membrana por esteroides no parece ser parte de una respuesta rápida de modulación de la enzima [Palmgren, 1991].

#### **4. Interacción esfingolípido-proteína.**

Los esfingolípidos son los componentes estructurales mayoritarios en las membranas celulares de plantas y pueden actuar como segundos mensajeros intracelulares que regulan procesos importantes como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular [Markham y col., 2006; Dietrich y col., 2008; Saucedo-García y col., 2011]. Sin embargo, no se tienen reportes que indiquen que la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática requiera de esfingolípidos para su función o de cómo éstos podrían afectar la catálisis. En general no se sabe mucho de la interacción de los esfingolípidos con las proteínas integrales de la membrana, y cómo éstos podrían afectar la función de tales proteínas. Recientemente se ha encontrado en células de mamíferos que hay una interacción directa y específica entre una especie de esfingomielina con el dominio transmembranal de la proteína p24, implicada en la biogénesis de vesículas COPI. Esta interacción depende tanto de la cabeza polar y la parte hidrofóbica de este esfingolípido, y el motivo VXXTLXXIY (donde X puede ser cualquier otro aminoácido) del dominio transmembranal. Además, la interacción de la esfingomielina con el dominio transmembranal de la proteína p24, sugiere que puede regular el equilibrio entre un monómero inactivo y el estado oligomérico activo de la proteína, que a su vez regula el transporte vesicular dependiente de COPI [Contreras y col., 2012].

**ANTECEDENTES INMEDIATOS**

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo estudios con plantas de líneas transgénicas mutantes con diferentes contenidos de esfingolípidos endógenos encaminados para determinar se repercusión en diferentes funciones membranales, incluyendo la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Se ha encontrado que la línea mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana*, que tiene un contenido 34% menor de esfingolípidos totales que las plantas silvestres, presenta una actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> que es casi 100% mayor que la actividad de la enzima de las plantas controles [González-Reyes, 2010; Mejía-Hernández, 2010; Cornejo-Granados, 2011; Morales-Cedillo, 2012].

La línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* fue generada por el grupo del Dr. Edgar B. Cahoon como estrategia para examinar el papel de los esfingolípidos en las células vegetales. La estrategia consistió en reducir la síntesis celular de esfingolípidos modificando la expresión de los genes de la primera enzima de la vía de su síntesis: la serina palmitoiltransferasa (SPT), la cual está formada por los heterodímeros LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b. Para ello, este grupo generó a la mutante de *Arabidopsis thaliana Atlcb2a-1*, que no expresa a la subunidad LCB2a, por lo cual la planta sólo puede sintetizar a la SPT con los monómeros LCB1 y LCB2b. En esta mutante se realizó la construcción de una horquilla de RNA que funciona como RNAi para silenciar el gene remanente *LCB2b*. La inducción del silenciamiento de este gene se lleva de manera controlada al aplicar el insecticida metoxifenoza (Intrepid®) [Dietrich y col., 2008].

Las caracterización cinética de la enzima en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* reveló que la  $V_{max}$  aumentó con respecto a la enzima control [González-Reyes, 2010], pero las vesículas membranales con mayor actividad no tienen un incremento en la cantidad de enzima. Adicionalmente, se encontró que la adición de glucosilceramida exógena a las membranas de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) produjo una disminución de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, hasta niveles de actividad de las líneas control [González-Reyes, 2010].

Existen reportes en la literatura que indican que la región del carboxilo terminal es una de las regiones de la estructura de la enzima que parece tener más importancia en la regulación de su actividad, ejerciendo un efecto auto-inhibitorio sobre la catálisis de la enzima [Palmgren y col., 1990a; Olsson y col., 1998; Axelsen y col., 1999]. Estudios con agentes que perturban a la región del carboxilo terminal como la lisofosfatidilcolina y la tripsina [Palmgren y col., 1990a; Piette y col., 2011] mostraron que hay un aumento del 50% en la actividad de la enzima con lisofosfatidilcolina o un 100% con digestión controlada con tripsina en las plantas control, mientras que la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), la actividad de ATPasa no se afecta por la lisofosfatidilcolina ni por la remoción de la región del

carboxilo terminal por tripsina, sugiriendo que la alta actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea de *Arabidopsis thaliana* con menor contenido de esfingolípidos totales en la planta se debe a cambios en la interacción de la región del carboxilo terminal con la enzima [Morales-Cedillo, 2012].

### HIPÓTESIS

Las interacciones esfingolípido-ATPasa involucradas en la regulación de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, se llevan a cabo mediante la interacción de la región del carboxilo terminal de la enzima y la parte polar de los esfingolípidos.

### OBJETIVO GENERAL

Obtener evidencias adicionales que confirmen la interacción esfingolípido-ATPasa, explorar las regiones químicas involucradas e identificar las especies de esfingolípidos que tienen un papel importante en la interacción con la ATPasa de H<sup>+</sup>

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Germinar y cultivar plantas de *Arabidopsis thaliana*, tanto del genotipo silvestre, como de diferentes líneas genéticamente modificadas en la calidad (líneas GC-A) o cantidad de esfingolípidos (líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp /Atlcb2a*).
- Obtener fracciones microsomales de plantas adultas de las líneas silvestre y GC-A.
- Obtener vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de la línea silvestre, *Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a* ± Metoxifenoza.
- Determinar la composición y cantidad de esfingolípidos en las vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de la línea silvestre, *Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a* ± Metoxifenoza.
- Determinar la actividad específica de hidrólisis de ATP de las fracciones microsomales de la línea silvestre, GC-A y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida.
- Determinar el efecto de la reconstitución membranal con glucosilceramida y diferentes ceramidas exógenas en la actividad de hidrólisis de ATP en fracciones microsomales de la línea silvestre, GC-A y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida.
- Determinar el efecto de las glicosidasas ( $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa) en la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la línea silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (con o sin inducción). En estas preparaciones:
  - A) Detectar proteínas glicosiladas por tinción de geles de acrilamida con Pro-Q® Emerald.
  - B) Detectar lípidos glicosilados separados por TLC
- Determinar el efecto de un derivado de la glicosil-inositolfosforilceramida (inositol-fosfoesfingosina) en la actividad de la ATPasa en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.
- Determinar los niveles de fosforilación de la enzima en las líneas estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico.

Se utilizaron plantas de edad adulta de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col 0), genotipo silvestre, de la línea mutante *Atlcb2a-1*, de la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a* y de la línea mutante *GCA*. Las características de estas líneas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas como material biológico.

Línea de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Fenotipo	Modificaciones genotípicas	Contenido esfingoideo	Contenido de Glucosilceramida
Silvestre		Sin modificación	100% de esfingolípidos complejos	100% de glucosilceramidas totales
<i>Atlcb2a-1</i> (Chen y col., 2006)		Interrupción del gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT por la inserción de un transposón.	100% de esfingolípidos complejos	No reportado
<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (Dietrich y col., 2008)		a) Interrupción del gen que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT por la inserción de un transposón.  b) Un vector binario conteniendo la construcción de una horquilla de ARN que funciona como ARNi para silenciar* el gen remanente que codifica para la subunidad LCB2b de la SPT.	Normal en ausencia de Metoxifenoza.  64% de esfingolípidos complejos totales tras la inducción por 5 días del silenciamiento con Metoxifenoza	No reportado
<i>GC-A</i> (Chen, no publicado)		Interrupción del gen que codifica para la enzima Glucosil ceramida sintasa por la inserción de un ARNi.	No reportado	Solo 2% de glucosilceramidas totales

\* Cuya inducción del silenciamiento se lleva a cabo mediante la aplicación de la metoxifenoza (insecticida Intrepid®). Las flechas indican la clorosis de las hojas después de la inducción.

### **2. Germinación y crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.**

Las semillas se siembran sobre la superficie de la tierra contenida en una maceta o macetero. La composición del sustrato es 1.5 partes de Mix 4 Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 0.5 partes de vermiculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.) y 0.5 partes de agrolita dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo. De México) humedecido con agua estéril. La colocación de las semillas en la maceta se hace depositando las semillas en la superficie del sustrato de manera que queden espaciadas entre ellas. Las charolas se mantienen en invernadero con un fotoperiodo natural o bien de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Se riegan con agua en un atomizador para mantenerlas húmedas. Si la luz natural es muy intensa, se cubren con domos blancos opacos. Una vez crecidas las plántulas (después de 3-4 semanas), se cosecha la parte aérea o se transfieren a suelo en macetas o maceteros, colocando una plántula por maceta.

### **3. Crecimiento hasta plantas adultas.**

Una vez crecidas las plántulas (después de 3-4 semanas), se transfieren (trasplantan) en macetas o maceteros, colocando una o dos plántula por maceta. Las macetas y maceteros, así como las charolas deben estar lavadas y remojadas con HClO<sub>4</sub> comercial al 30% (Cloralex). Después de haber sido bien enjuagados con agua de la llave ya se pueden usar. La composición del sustrato es la misma que se mencionó anteriormente. La mezcla de sustrato se hace en una tina grande y ahí mismo se humedece antes de vaciarse a las macetas o maceteros y con mucho cuidado se transfieren las plántulas, ayudándose de un abatelenguas o espátulas.

Al principio, las charolas con macetas o maceteros se cubren con domos transparentes para mantener la humedad y se riegan por la orilla de la superficie de cada maceta o bien con atomizador aproximadamente 2 veces a la semana. Las plantas se crecen en invernadero con un fotoperiodo natural y aire acondicionado o bien con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Si la luz natural es muy intensa, se cubren al principio con domos blancos opacos.

Al cabo de dos semanas aproximadamente, se remueven los domos para permitir una mejor exposición a la luz. Se siguen regando por la parte aérea 2-3 veces a la semana.

Cuando las plantas alcanzan la edad y tamaño deseado (al cabo de tres meses, aproximadamente), se procede a cosechar las hojas, cortando con tijeras toda el área foliar que

incluye tanto hojas jóvenes como adultas, pero no tallos ni raíces. Se pesan en porciones y se envuelven en papel aluminio, anotando el peso neto y así se congelan con N<sub>2</sub> líquido inmediatamente después de cortarlas. Se almacenan en bolsas a -70°C hasta su uso para la obtención de vesículas de membrana plasmática.

#### **4. Preparación de homogeneizados para la obtención de la fracción microsomal de plantas de la línea GC-A.**

##### ***Homogenización del tejido.***

- a) La parte aérea congelada se muele en mortero hasta conseguir un polvo fino, se agrega N<sub>2</sub> líquido periódicamente para evitar que se descongelen.
- b) El tejido pulverizado se pasa a un vaso de precipitado pequeño de 10 mL, se añaden 4 mL de amortiguador de homogeneización (ver APÉNDICE 2) por cada 0.84 g (peso húmedo) de muestra. Se homogeniza en dos periodos de 10 s con un intermedio de 20 s con un homogenizador eléctrico (Tissue-tearor) a una velocidad de 3.0, manteniendo tanto el amortiguador de homogeneización como el vaso de precipitado sumergidos en baño de hielo-agua.
- c) Se filtra el homogeneizado a través de 3 capas de gasa, recibiendo el filtrado en otro vaso pequeño de 10 mL, se exprime la gasa presionándola contra la pared del vaso de precipitado ayudándose de un espátula limpia, y se recupera el líquido. Se lava el residuo que quedó sobre la gasa con 1 mL más de buffer de homogeneización y se exprime nuevamente para recuperar la muestra.
- d) El filtrado final se coloca en tubos de centrifuga de policarbonato de 3.2 mL. Se centrifuga a 15 000 rpm (10 000 x g) por 15 min a 4°C en una ultra centrifuga refrigerada TL-100 (Beckman) usando el rotor TLA 100.4. La fracción nuclear que es la que forma el botón, se descarta.
- e) El sobrenadante se recupera, decantando en un tubo limpio de policarbonato y se centrifuga nuevamente, a 43 000 rpm (100 000 x g) por 120 min a 4 °C en una ultra centrifuga refrigerada TL-100 (Beckman) usando el rotor TLA 100.4. Finalizada la centrifugación, se decanta el sobrenadante y se descarta.

**Obtención de la fracción microsomal.**

El botón obtenido se resuspende en 50  $\mu$ L de amortiguador de ajuste de peso (ver APÉNDICE 2) con un pincel fino y limpio. Ya disuelto, el pincel se lava con 50  $\mu$ L de amortiguador de ajuste de peso añadiéndosele al final también este volumen a la muestra. Posteriormente se mide el volumen final obtenido, se distribuye en tubos de 0.6 mL y se congelan inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido, manteniéndose a -70 °C hasta su uso posterior.

**5. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*.****Obtención de la fracción microsomal**

Se siguió el protocolo descrito por Carmona-Salazar y col. (2011) haciendo un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

**Obtención de vesículas de membrana plasmática.**

Las vesículas de la membrana plasmática fueron aisladas a partir de las fracciones microsomales utilizando un sistema de distribución de las membranas subcelulares en un sistema de dos polímeros acuosos (polietilen glicol y dextran T-500) [Carmona-Salazar y col., 2011].

**6. Determinación de proteína por el método de Lowry.**

Para determinar la concentración de proteína de la muestra, se realiza un ensayo colorimétrico, haciendo uso de una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de 1 mg/mL. Para la elaboración de la curva estándar, se añaden cantidades distintas de BSA (de 0 a 70  $\mu$ g) y agua en tubos de ensayo en un volumen final de 900  $\mu$ L. En el caso de la muestra se tiene que añadir en una dilución adecuada para su determinación. Todos los tubos son tratados igualmente añadiendo sucesivamente, 100  $\mu$ L de desoxicolato de sodio 0.15% (m/v), 1 mL del reactivo A, que contiene partes iguales de CTC (carbonato de sodio 10% (m/v), tartrato sodio-potasio 0.2% (m/v) y sulfato de cobre 0.1% (m/v)), NaOH 0.8 N, SDS 10% (m/v) y H<sub>2</sub>O. Posteriormente se agregan 500  $\mu$ L del reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:5 (v:v) con agua desionizada). Los tubos se agitan y luego se incuban por

30 min a temperatura ambiente para desarrollar la coloración azul y posteriormente se determina la absorbancia a 750 nm.

### **7. Determinación de hidrólisis de ATP.**

Tanto los tubos a usar en el ensayo (previamente lavados con Extran y tratados con ácido sulfúrico), como el recipiente en el que está el medio de hidrólisis ya preparado, se mantienen a 4°C. Se procede a mezclar los componentes necesarios para el medio de hidrólisis a usar. El medio contiene los siguientes componentes a concentraciones finales: 250 mM de sacarosa/ 20 mM de PIPES ajustada a pH 6.5 con BTP (Bis-Tris-Propano), 10 mM ATP, 7 µM CCCP (Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona), 0.015% Brij 58 (v/v) y 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Se colocan 3 tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis total, hidrólisis química (T0) e hidrólisis con inhibidores. En su caso, se adiciona al medio inhibidores de diferentes enzimas que hidrolizan ATP y que pueden estar en la muestra membranal (si contiene Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> se usa a una concentración final de 200 µM; si se usa la mezcla de inhibidores NaN<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y KNO<sub>3</sub>, las concentraciones finales son de 2 mM, 2 mM y 50 mM, respectivamente). El volumen final de los tubos con o sin inhibidores es de 150 µL en todos los casos.

La reacción se inicia con la adición de los 4 µg de proteína al primer tubo con medio de hidrólisis, se agita breve y suavemente, y se coloca el tubo en un baño de agua a 29°C por 20 min. Se repite lo mismo para cada tubo que contiene sólo medio de hidrólisis o medio con inhibidores en intervalos de 30 s de diferencia. En el caso de la determinación de la hidrólisis química sólo se adicionan 150 µL del medio de hidrólisis en cada tubo y se coloca en una gradilla a las mismas condiciones que los tubos de hidrólisis total o con inhibidores.

Pasados los 20 min de incubación para cada tubo, se adicionan 150 µL de SDS 24% agregándose directamente en el interior del tubo cuando éste aún está en el baño de agua e inmediatamente se agita con ayuda de un vórtex y se transfiere a 4°C. Ya detenida la reacción en todos los tubos, se determina el Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP según el método de González- Romo y col. (1992). Paralelamente al ensayo de hidrólisis de ATP, se hace una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico.

### **8. Determinación de fosfato inorgánico por el método de Chifflet modificado.**

La determinación del Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP, se inicia añadiendo a todos los tubos 300 µL de solución B/C (molibdato de amonio 2% y ácido ascórbico 12% ambos en HCl 1 N) en relación 1:1, después de 3 a 7 min a temperatura ambiente se añaden

450  $\mu\text{L}$  de reactivo E (citrate de sodio 2%, metarsenito de sodio 2%, ácido acético 2% todo disuelto en agua bidestilada). Luego de 20 min, se determina su absorbancia a 850 nm. En el caso de los tubos de la curva patrón, primero se añaden de 1 a 60  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de fosfato 1 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , llevándolos a un volumen final de 150  $\mu\text{L}$  con agua bidestilada, posteriormente se añaden 150  $\mu\text{L}$  de SDS 24% (p/v).

### **9. Determinación del efecto de glucosidasas en la hidrólisis de ATP de la ATPasa de $\text{H}^+$ de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis*.**

En una gradilla colocada en un recipiente de unicel con hielo se colocan 3 tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis de ATP con mezcla de inhibidores, con o sin glucosidasa e hidrólisis química (T0). Se añaden a los tubos respectivos 16.5  $\mu\text{L}$  de glucosidasa (ver Apéndice 1) o 16.5  $\mu\text{L}$  del buffer 10 mM MES/10 mM NaCl a pH = 6.5. A continuación se añade el medio de hidrólisis de ATP con inhibidores a cada uno de los tubos anteriores y se inicia la reacción con la adición de 4  $\mu\text{g}$  de proteína membranal, se agita breve y suavemente, y se coloca el tubo en una gradilla en un baño de agua a 29°C por 20 min. La composición y concentración de cada uno de los componentes del medio de hidrólisis de ATP con la mezcla de inhibidores es la descrita en el punto 7.

Transcurridos 20 min de incubación, se adicionan 150  $\mu\text{L}$  de SDS 24% a cada tubo incubado en el baño de agua e inmediatamente se agita con ayuda de un vórtex y se transfiere a 4°C. Ya detenida la reacción en todos los tubos, se determina el Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP.

### **10. Extracción de esfingolípidos de membranas de *Arabidopsis thaliana*.**

Se extrae una fracción enriquecida de esfingolípidos a partir de preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hojas de plantas adultas de genotipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* usando el procedimiento descrito por Markham y Jaworsky (2007) para hojas de *Arabidopsis thaliana*.

#### **Preparación de la muestra:**

En una gradilla en hielo se coloca un tubo para cada condición a ensayar: hidrólisis de ATP con mezcla de inhibidores, con o sin  $\beta$ -glucosidasa. Se añaden 500  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -glucosidasa 75 mg/mL o 500  $\mu\text{L}$  de 10 mM MES/ 10 mM NaCl a pH = 6.5 al tubo respectivo. A continuación

se añade el medio de hidrólisis de ATP con inhibidores a cada uno de los tubos y se inicia la reacción con la adición de 1 mg de proteína membranal. Se agita brevemente y suavemente, y se coloca el tubo en una gradilla en un baño de agua a 29°C por 20 min. La composición y concentración final de cada uno de los componentes del medio de hidrólisis de ATP con la mezcla de inhibidores es la misma descrita en el punto 7.

Transcurrido los 20 min de incubación para cada tubo, se colocan en hielo y todo el volumen se pasa a una columna Amicon® Ultra-4 y se centrifuga a 7 000 rpm por 15 min a 4°C en una centrifuga Jouan MR 18-12 usando el rotor No cat 11174593. Posteriormente se retira la muestra concentrada de la unidad de filtrado con ayuda de una micropipeta mediante un movimiento de resuspensión de lado a lado para asegurar la recuperación total y se coloca en un tubo de vidrio con tapón de rosca con cubierta interna de teflón (tubo previamente tratado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y mantenido en hielo.

### **Extracción de esfingolípidos**

1. Se agrega un volumen de Fase E (Etanol:H<sub>2</sub>O:dietileter:piridina:amonio (15:15:5:1:0.08; v:v:v:v:v)) al tubo de vidrio que contiene el volumen de muestra membranal equivalente a 1 mg de proteína, en una proporción 1:3 (v:v) de suspensión de membranas a Fase E.
2. Colocar la tapa de rosca y agitar en vórtex vigorosamente durante 1 min a temperatura ambiente.
3. Incubar el tubo con la muestra a 60°C durante 15 min con agitación ocasional (4 veces en total)
4. Dejar que se atempere durante 1 min y centrifugar utilizando el rotor de ángulo variable GH-3.7 durante 20 min a 8°C a 3 000 rpm en una centrifuga Beckman GS-6R.
5. Recolectar el sobrenadante en un tubo frío con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio nueva.
6. Resuspender nuevamente el botón en la cantidad de Fase E que se usa al principio y repetir el procedimiento desde el paso 2 por dos veces más. En total se recolecta el sobrenadante de 3 extracciones.
7. Centrifugar el sobrenadante total a 3 000 rpm por 20 min en una centrifuga Beckman GS-6R usando el rotor de ángulo variable GH-3.7 y pasar el sobrenadante a un tubo frío previamente pesado.

8. Evaporar todo el sobrenadante recolectado con N<sub>2</sub> gaseoso comprimido, colocando el tubo a 40°C máximo para acelerar la evaporación.
9. Pesarse el tubo con el residuo seco y por diferencia de pesos determinar la cantidad de extracto de esfingolípidos obtenido. Se almacena a -70°C hasta su uso para la reconstitución o cromatografía de capa fina (TLC).

### **11. Reconstitución membranal de fracciones microsomales con lípidos exógenos.**

#### **Preparación del lípido reconstituyente**

El ensayo se realiza en tubos tratados previamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y que se mantienen en hielo durante su preparación para evitar la evaporación de la solución del lípido en disolvente orgánico, cuando este se haya añadido. A partir de la concentración del stock del lípido a usar (ver Apéndice 1), realizar el cálculo de la cantidad total necesaria para todos los tubos, considerando que cada concentración a ensayar se realiza por triplicado y tomando en cuenta un pequeño exceso. Colocar en un tubo de ensayo los  $\mu\text{L}$  equivalentes a la cantidad total de  $\mu\text{g}$  calculada, llevar a sequedad, evaporando con N<sub>2</sub> comprimido. Posteriormente, agregar la cantidad necesaria de solvente para tener una concentración final de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , que permite tener al lípido en un volumen que se puede pipetear con más precisión para ser añadido a las membranas. Para los ensayos, el solvente utilizado fue el mismo con el que está disuelto el lípido (ver Apéndice 1) y se agrega la cantidad necesaria de BHT al 1% para tenerlo una concentración final de 0.002%. Tapar el tubo con cinta de teflón para evitar la evaporación del solvente, disolver bien el lípido con vortex y añadir a los tubos respectivos los  $\mu\text{L}$  equivalentes a los  $\mu\text{g}$  de lípido a ensayar. Posteriormente, se evapora el solvente con ayuda de N<sub>2</sub> gaseoso comprimido. Se sella cada tubo seco con cinta de teflón tratando de dejar una atmósfera de N<sub>2</sub> dentro del tubo. Se realizó sobre este residuo el ensayo de reconstitución.

#### **Procedimiento de reconstitución de membranas con lípidos exógenos seguido por el ensayo de hidrólisis de ATP.**

La reconstitución incluye tanto un tiempo de preincubación como el tiempo de hidrólisis de ATP. Después de la evaporación total del solvente en el que estaba disuelto el lípido, se añaden 100  $\mu\text{L}$  del medio de hidrólisis de ATP con inhibidores y sin Mg<sup>2+</sup>/ATP a cada uno de los tubos y se inicia la preincubación con la adición de la proteína membranal, que en el caso de las fracciones microsomales son 10  $\mu\text{g}$  de proteína membranal para la línea silvestre y 6  $\mu\text{g}$  para

las líneas GC- A, o 4 µg de proteína membranal para preparaciones de vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres, de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a* (-), y 2 µg para la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/atlcb2a* (+). A continuación, se coloca el tubo en un baño de agua a 29°C durante 40 min. Transcurridos los 40 min (preincubación) para cada tubo, se inicia el ensayo de hidrólisis de ATP al agregar 50 µL de 30 mM Mg<sup>2+</sup>/ATP en concentración equimolar, manteniendo los tubos en baño de agua a 29°C durante 20 min más.

Transcurridos los 20 min del tiempo de hidrólisis para cada tubo, se adicionan 150 µL de SDS 24% agregándose en al fondo del tubo que aún está en el baño de agua e inmediatamente se agita con ayuda de un vórtex y se transfiere a una gradilla con hielo. Ya detenida la reacción en todos los tubos, se determina el Pi liberado durante la reacción de hidrólisis de ATP.

### **12. Análisis de esfingolípidos glicosilados por cromatografía en capa fina (TLC).**

#### **Aplicación de la muestra**

En una placa de aluminio de 17 cm de largo (silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck ) a 1.5 cm del borde de inicio de elución, se aplica los estándares (esfingomielina, ceramida hidroxilada, glucosilceramida y galactosilceramida ver APÉNDICE 1) o la muestra con la ayuda de una microjeringa de 10 µL (Microliter ® #701, Hamilton), formando una línea sobre cada carril, dejando una distancia de 1 cm entre cada muestra y haciendo varias aplicaciones para favorecer la evaporación del solvente cada vez, pero evitando que se ensanche la banda, para así mejorar la resolución y la medición de los valores de *r<sub>f</sub>* de los lípidos separados.

#### **Elución de la placa cromatográfica**

La elución de las placas se lleva a cabo en una cámara especial de vidrio de 17.5 x 16.0 x 8.2 cm de Aldrich. En su interior se coloca un papel filtro de 15 x 15 cm, adherido por capilaridad a una de las paredes internas de la cámara y se agregan 70 mL de la fase móvil (ver Apéndice 2), dejando saturar con los vapores de la fase móvil aproximadamente de 30 a 60 min, para facilitar la rapidez de la elución de las muestras. La placa de sílica se coloca dentro de la cámara en forma inclinada. Al introducir la placa se hace de manera uniforme para que las muestras eluyan al mismo tiempo y de manera homogénea.

### **Revelado de los lípidos en las placas**

Revelado con solución de cobre (ver composición en el Apéndice 2). Esta solución reveladora se usa de la siguiente manera: la placa ya eluída se seca por 1 ó 2 min. Se coloca en un recipiente de vidrio en la campana de extracción. Se rocía con la solución reveladora de cobre, se elimina el exceso y posteriormente se introduce en un horno a 150–180°C por 10 min aproximadamente. Transcurrido el tiempo se saca del horno y se deja enfriar.

### **13. Preparación de geles de poliacrilamida.**

**Las proteínas de las vesículas de membrana plasmática fueron separadas electroforéticamente de acuerdo a la técnica de Schagger y von Jagow (1987). El procedimiento utilizado es el siguiente:**

- a) Limpiar los vidrios de lado que va a estar en contacto con el gel con unas gotas de SDS 3%.
- b) Colocar el separador de 1 o 1.5 mm entre los dos vidrios y montarlos en el soporte cuidando que los cojines tengan vaselina para prevenir escurrimientos. Primero se colocan en la ranura y después se atorán en el soporte con los cojines.
- c) Preparación del gel separador. En un vaso de precipitado agregar los reactivos en el orden de la lista:
  1. 2315  $\mu\text{L}$  de Acrilamida-bis acrilamida (30%-0.938% respectivamente)
  2. 2315  $\mu\text{L}$  de amortiguador del gel (3M Tris-HCl pH= 8.9/ 0.3% SDS)
  3. 940  $\mu\text{L}$  de Glicerol
  4. 1405  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O desionizada
  5. 23.5  $\mu\text{L}$  de Persulfato de amonio 10%
  6. 2.4  $\mu\text{L}$  de TEMED (Tetrametiletilendiamina) y una vez puesto, mezclar e inmediatamente añadir entre los vidrios.
- d) Una vez lleno el espacio entre los vidrios, se deposita encima, cuidadosamente, un poco de SDS 0.3% sobre el gel para prevenir la formación de una superficie cóncava de menisco y se deja polimerizar 30 min a temperatura ambiente.
- e) Una vez polimerizado, se desecha el SDS y se seca el exceso con papel filtro.
- f) Se prepara el gel concentrador, colocando los reactivos en el orden de la lista:
  1. 330  $\mu\text{L}$  de Acrilamida-bis acrilamida (30%-0.938%)
  2. 620  $\mu\text{L}$  de Buffer del gel (3MTris-0.3% SDS, pH= 8.9 /HCl)
  3. 1530  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O desionizada
  4. 23.5  $\mu\text{L}$  de Persulfato de amonio 10%

5. 2.4  $\mu$ L de TEMED

- g) Se vacía un poco del gel concentrador entre los vidrios que contienen al gel separador y se coloca el peine de 10 o 15 pozos. Se deja polimerizar 1 h a temperatura ambiente
- h) Una vez polimerizado se remueve lentamente el peine del gel concentrador.
- i) Fijar el gel con las placas de vidrio en el soporte de la cámara de electroforesis.
- j) Se llena la cámara del soporte con el amortiguador del cátodo.
- k) Cargar las muestras con las puntas para electroforesis. Todas las muestras se cargan aproximadamente al mismo volumen, la diferencia se completa con amortiguador de ajuste de peso.
- l) Se coloca el amortiguador del ánodo en la cámara de electroforesis.
- m) Se deja correr el gel a 50 volts por 30 min (para que se apilen en una línea en el gel concentrador) y posteriormente se incrementa a 100 volts por 2 h.

**14. Tinción de glicoproteínas con el estuche Pro-Q® Emerald 300 en geles de poliacrilamida.**

Después de haber separado las proteínas electroforéticamente de acuerdo a la técnica de Schagger y von Jagow (1987), se realizan el siguiente procedimiento:

- Fijación: Se agregan 80 mL de una solución de metanol al 50% y ácido acético al 5%. Se deja el gel en esta solución durante 45 min con agitación constante suave a temperatura ambiente. Este paso se repite una vez más.

- Lavado 1: Se remueve el gel de la solución fijadora y se lava 2 veces en lavados de 15 min cada uno con 80 mL de una solución de ácido acético al 3%, con agitación suave a temperatura ambiente. Entre cada lavado hay que decantar con cuidado sin tocar el gel.

- Oxidación de carbohidratos: Incubar el gel en 25 mL de una solución de ácido peryódico al 1% y ácido acético al 3% durante 30 min con agitación constante suave a temperatura ambiente.

- Lavado 2: Se remueve el gel de la solución de oxidación de carbohidratos y se lava 3 veces en lavados de 15 min cada uno con 80 mL de una solución de ácido acético al 3%, con agitación suave a temperatura ambiente. Entre cada lavado hay que decantar con cuidado sin tocar el gel.

- Tinción del gel: Se incuba el gel en oscuridad en 25 mL de la solución Pro-Q® Emerald 300 (se prepara justo antes de usar: 500  $\mu$ L del stock Pro-Q® Emerald en 25 mL del buffer de tinción) durante 2 h con agitación constante suave a temperatura ambiente.

- Lavado 3: Se remueve la solución Pro-Q® Emerald 300 y se lava 2 veces en lavados de 15 min cada uno con 80 mL de una solución de ácido acético al 3%.
- Ver y fotografiar el gel: El gel teñido se visualiza con un transiluminador UV a 300 nm, siempre usando guantes en el manejo del gel.

Guardar en ácido acético al 1% para su posterior tinción de proteínas totales (Tinción con plata por el método de Vorum).

### **15. Tinción de geles con plata (Método de Vorum).**

- Fijación. Se prepara una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.05%. Se deja el gel en esta solución durante 2 h con agitación constante suave a temperatura ambiente.
- Lavado. Se remueven los geles de la solución fijadora y se lavan 3 veces en lavados de 20 min cada uno con una solución de etanol al 35%, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Sensibilización. Se mantiene el gel durante 5 min en una solución de tiosulfato de sodio 0.02%, en agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Lavado 2. Se hacen 3 lavados con agua bidestilada por 5 min cada uno, con agitación suave y constante a temperatura ambiente. Este lavado es crítico, pues de excederse el tiempo, el gel no se tiñe y se tiene que volver a empezar con la fijación.
- Adición de la solución de plata. Se coloca el gel en una solución de  $\text{AgNO}_3$  0.2%, formaldehído 0.076% (123  $\mu\text{L}$  de formaldehído para 30 mL de solución de  $\text{AgNO}_3$ ); durante 20 min, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Lavado 3. Se hacen 2 lavados con agua bidestilada por un 1 min cada uno, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Revelado. Después de enjuagar, se pone el gel en una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6%, formaldehído 0.05% y tiosulfato de sodio 0.0004%, con agitación suave y constante a temperatura ambiente, hasta que aparezcan las bandas.
- Terminación del revelado. Se añade la solución stop. Consiste en metanol 50% y ácido acético 12%, manteniendo por 5 min, con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- Almacenamiento del gel. Se prepara una solución de ácido acético al 1% en la que se guarda el gel a 4°C, protegido de la luz. Antes se puede escanear y posteriormente secar.

### **16. Tinción con azul de Coomassie.**

- Fijación: Colocar el gel recién sacado de la cámara de electroforesis en una solución de metanol 50% y 10 % de ácido acético durante 2 h con agitación constante suave a temperatura ambiente.
- Tinción: Decantar la solución fijadora y añadir la solución azul de Coomassie (Brillante Blue G 250). Mantener en agitación rotatoria constante durante toda la noche.
- Desteñido: Decantar la solución teñidora y añadir una solución de metanol 50% y ácido acético 10 %. Mantener en agitación rotatoria constante hasta que aparezcan las bandas.
- Revisar periódicamente el proceso de desteñido. Almacenar en una solución de glicerol 5%.

### **17. Secado de geles.**

Los geles revelados se escanean inmediatamente y posteriormente se secan para preservarlos.

Método de secado con calor y vacío.

- Colocar el gel teñido sobre una hoja de papel absorbente 3M, previamente humedecido y cubrir el gel con una hoja de papel celofán, alisar y eliminar burbujas.
- Recortar el celofán según el tamaño de cada gel.
- Colocar el gel preparado sobre la hoja de papel del equipo Gel Dryer (model 583 de Bio Rad) y taparlo con la hoja de plástico del mismo.
- Conectar y encender el vacío a 80°C durante 1.5 h.

### **18. Inmunoréplica.**

- Remover el gel de las placas de vidrio. Se transfiere el gel a un envase que contiene disolución amortiguadora de transferencia. Se pone en agitación rotatoria mínimo 15 min (máximo 30 min) a temperatura ambiente.
- Ensamblaje del cassette:
  - a) Se abren las rejillas del cassette. Sobre una de ellas se coloca una capa de esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia.
  - b) Sobre la esponja se coloca un cuadro de papel filtro empapado con disolución amortiguadora de transferencia.
  - c) Encima del papel filtro se coloca el gel o los carriles del gel que se transfirieron (una vez de incubado el gel en la disolución amortiguadora de transferencia).

- d) Sobre el gel se pone una hoja de PVDF previamente humectada con metanol y disolución amortiguadora de transferencia, de un tamaño correspondiente al del gel o a los carriles que se transfirieron.
  - e) Sobre la membrana de PVDF se coloca otro papel filtro también empapado con disolución amortiguadora de transferencia.
  - f) Se rueda un tubo de ensayo sobre toda la superficie del papel para suprimir las burbujas de aire que pudiera haber entre las capas del gel y el papel.
  - g) Se añade la segunda esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia y se cierra la rejilla del cassette.
- El cassette se pone en la cámara de electrotransferencia, orientado de manera que el gel esté de cara al cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo. La cámara debe tener suficiente disolución amortiguadora de transferencia y un agitador magnético colocado en el fondo (la disolución amortiguadora de transferencia puede ser reutilizada tres veces).
  - Se enciende la fuente de poder y se realiza la electrotransferencia en las siguientes condiciones: Para geles de 1 mm de grosor se utilizó 25 volts por 2h 15 min y para geles de 1.5 mm de grosor se utilizó 25 volts por 3 h.
  - Al término, se apaga la fuente de poder y se remueve el cassette. Se abre el cassette y cuidadosamente se separa la membrana de PVDF. Se pone la membrana en un recipiente que contiene disolución de PBS-Tween (ver composición en el APÉNDICE 3), cuidando que la cara que estuvo en contacto con el gel quede hacia arriba. Se realizan dos lavados con disolución de PBS-Tween durante 5 y 10 min respectivamente, en agitación suave y constante a temperatura ambiente.
  - Se remueve el PBS-Tween y se cambia por disolución bloqueadora (ver Apéndice 3) y se mantiene en agitación suave y constante por 1 h a temperatura ambiente.
  - Se remueve la disolución bloqueadora y se realizan nuevamente 2 lavados con PBS-Tween en agitación rotatoria por 5 y 10 min cada uno.
  - Se remueve el PBS-Tween y se añade la disolución con el primer anticuerpo (ver Apéndice 3).
  - Se remueve la solución del primer anticuerpo y se realizan nuevamente 2 lavados con PBS en agitación rotatoria por 5 y 10 min cada uno.
  - Se remueve el PBS-Tween y se añade la solución con el segundo anticuerpo (ver Apéndice 3).
  - Se remueve la solución con el segundo anticuerpo y se realizan 3 lavados con PBS-Tween en agitación rotatoria por 10 min cada uno y posteriormente con PBS igual por 10 min.
  - Se remueve el PBS y se añade la disolución para desarrollar color (ver Apéndice 3). De inmediato se coloca en agitación suave. La reacción se detiene con agua desionizada. La réplica se escanea o se fotografía de inmediato.

**19. Determinación de la composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de las líneas de *Arabidopsis thaliana*.**

Las vesículas de membrana plasmática de las plantas de *Arabidopsis* de genotipo silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción con metoxifenozida fueron procesadas por triplicado a partir de dos muestras diferentes cada una. La extracción, separación, identificación y cuantificación se realizó por cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS, de acuerdo a Marham y Jaworski (2007).

---

**RESULTADOS****1. Efecto de la reducción de glucosilceramida endógena en la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> en fracciones microsomales de hojas de plantas adultas de *A. thaliana*.**

Experimentos anteriores de medición de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en vesículas purificadas de membrana plasmática, demostraron que en la línea mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* (que tiene un contenido 36% menor de esfingolípidos totales al ser inducida con metoxifenozida), la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> estaba aumentada alrededor de un 100% con respecto a la actividad de la enzima de las plantas silvestres (Wt) y de las otras dos líneas controles *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir (-). Con el propósito de establecer qué clase de esfingolípidos son los involucrados en este aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, se abordó el estudio de uno de los esfingolípidos más abundantes de las plantas, la glucosilceramida. Debido a que contamos con una línea de plantas transformadas con un RNA de interferencia (RNAi) para el producto del gene de la enzima glucosil ceramida sintasa, misma que contiene solo el 2% de glucosilceramidas totales con respecto a las plantas silvestres [Chen y col., no publicado], se exploró si estas plantas tenían una ATPasa de H<sup>+</sup> con una alta actividad, a semejanza de las de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con metoxifenozida (+)).

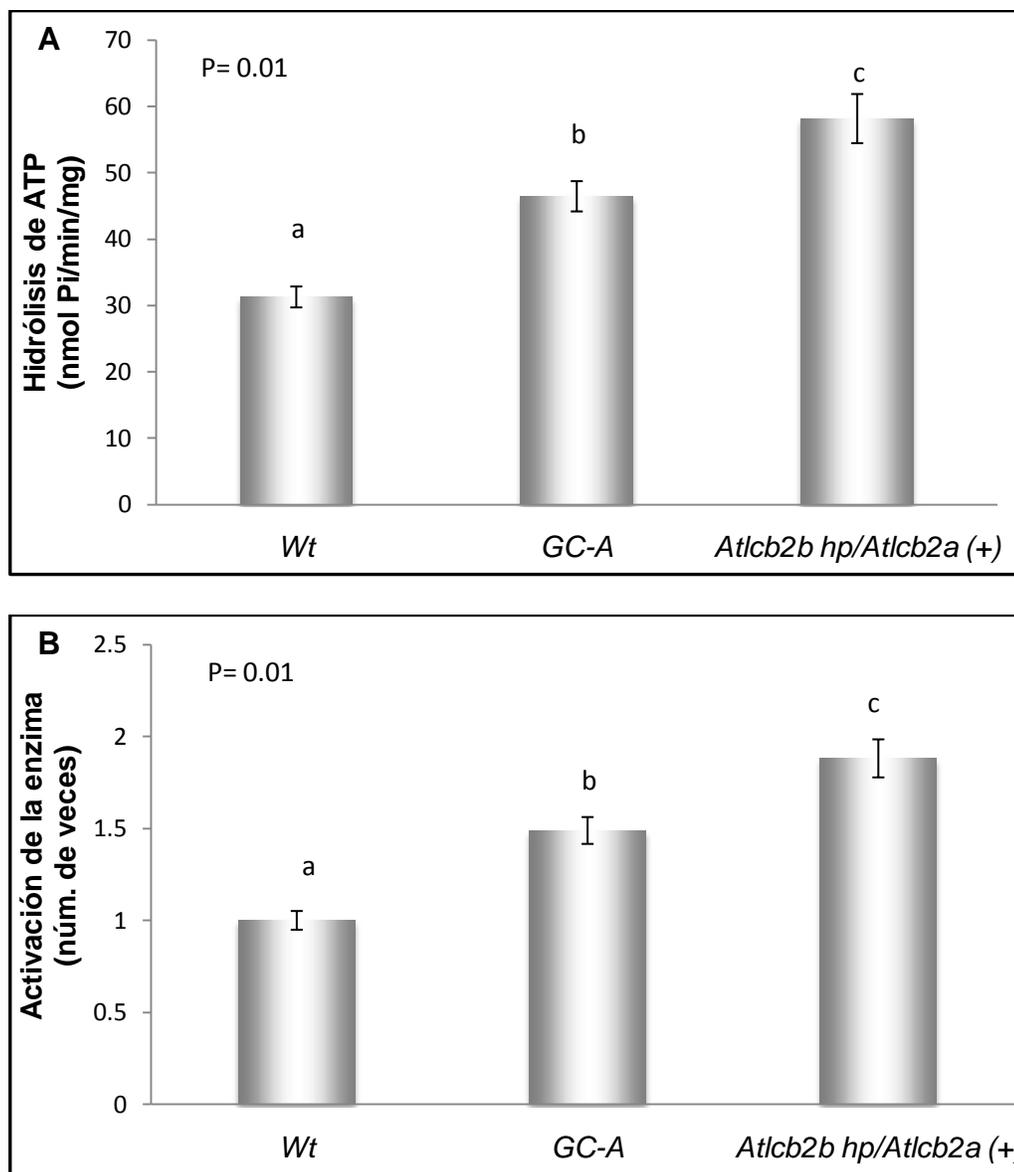
En la Figura 8A se muestra el comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP de fracciones microsomales de plantas adultas del genotipo silvestre y de las líneas *GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Se observó que en la línea silvestre la actividad fue de 32 nmol Pi/min/mg, mientras que en la línea *GC-A* que solo contiene 2% de glucosilceramida totales comparada con la línea silvestre, hubo un aumento en la actividad, llegando a valores de aproximadamente 48 nmol Pi/min/mg. En cambio, la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), presentó la actividad observada anteriormente en fracciones microsomales (58 nmol Pi/min/mg) [Mejía-Hernández, 2010; Cornejo-Granados, 2011], lo cual correspondió a una actividad mayor a la determinada en las plantas silvestres y en las plantas *GC-A*. Después de realizar el análisis estadístico de ANOVA y aplicando la prueba de comparación de medias de Bonferroni [Mendenhall y Sincich, 1997] para establecer si las magnitudes de actividad de ATPasa constituían diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas, se concluyó que las diferencias entre los valores de actividad de hidrólisis de ATP entre las línea silvestre, *GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) eran significativas.

En la Figura 8A, las comparaciones de la actividades de hidrólisis de ATP entre las dos líneas (*GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) con respecto a la silvestre, se hicieron tomando los

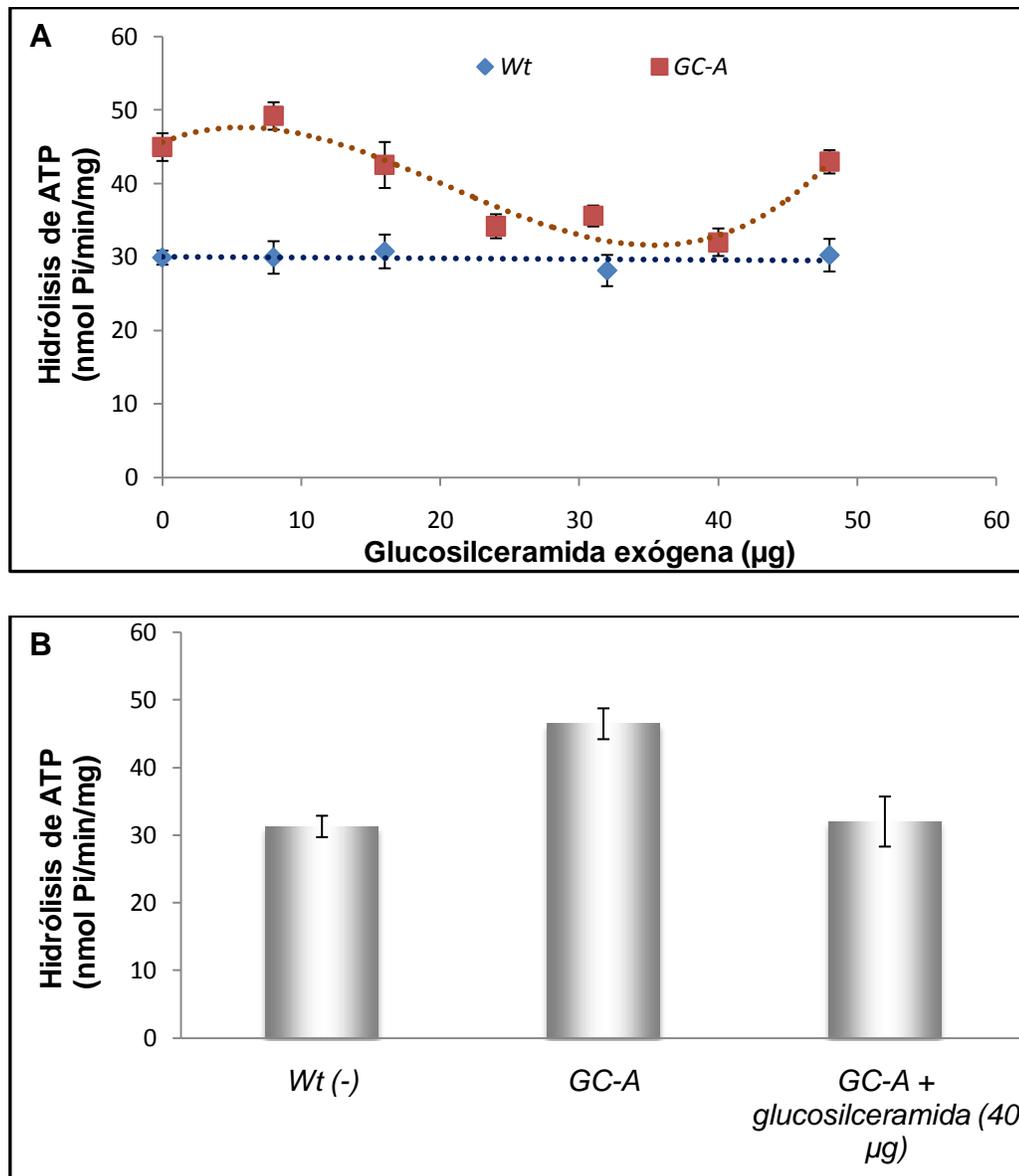
valores absolutos de las actividades. Para poder visualizar las mismas diferencias, pero en términos relativos, se expresó este aumento como la activación de la enzima de las líneas *GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* con respecto a la silvestre en número de veces (Figura 8B), indicando una activación de 1.5 veces de aumento de la *GC-A* con respecto a la silvestre. Este número fue menor comparado con la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* (menor contenido de esfingolípidos totales), en la que se obtuvo una activación de 1.9 veces comparada con la silvestre. Estos resultados sugerían que la falta de glucosilceramida estaba involucrada en el aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>.

## **2. Reconstitución membranal con glucosilceramida exógena en fracciones microsomales de la línea con menor contenido de glucosilceramida que la silvestre.**

Para corroborar los resultados anteriores que indicaban que la glucosilceramida estaba relacionada con cambios en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, un experimento pertinente era determinar la influencia de la glucosilceramida exógena en la actividad de hidrólisis de ATP de fracciones de la línea *GC-A* que tiene un menor contenido endógeno de glucosilceramida que la silvestre. Para ello, se probaron diferentes cantidades de la glucosilceramida exógena que tenía una BCL d18:1 y un ácido graso de 16C (ácido palmítico) y se incubaron con las fracciones microsomales del genotipo silvestre y de la línea *GC-A*. A continuación, se determinó la hidrólisis de ATP de cada una de ellas. Los resultados de estos experimentos se encuentran en la Figura 9. Se pudo observar que en los tubos en donde se incubó a las membranas de ambas líneas sin glucosilceramida exógena, los valores de las actividades fueron similares a las encontradas en los experimentos anteriores, siendo mayor la actividad de la línea *GC-A* que la de la silvestre (ver Figura 8). El aumento gradual de la cantidad de glucosilceramida exógena a las membranas microsomales provenientes de la línea silvestre, no afectó la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Sin embargo, en la línea *GC-A*, que solo tiene 2% de glucosilceramida total, la actividad fue disminuyendo en función de la cantidad de glucosilceramida exógena añadida, observándose que al reconstituir con 40 µg de glucosilceramida exógena, se obtuvieron valores muy similares a los de actividad de la línea silvestre (Figura 9B). Los resultados obtenidos indicaron que la disminución de glucosilceramida en la línea *GC-A* estaba asociada al aumento en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> y que por tanto el contenido normal de glucosilceramida en las plantas silvestres estaba asociado a una menor actividad de la enzima.



**Figura 8. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, GC-A y *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*.** Se obtuvo la fracción microsomal de las hojas de plantas adultas y se les determinó la hidrólisis de ATP. Se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína membranal para las plantas de genotipo silvestre, 6  $\mu\text{g}$  de proteína membranal para las líneas GC-A y *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*. A) la gráfica muestra los valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática, expresados como nmol Pi/min/mg  $\pm$ EE. Se realizaron como mínimo 4 repeticiones con tres réplicas cada una para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. B) Los valores de la gráfica anterior fueron usados para expresar las diferencias relativas de actividad de ATPasa entre las tres líneas. La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima de cada línea en número de veces  $\pm$  EE con respecto a la línea silvestre. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5*, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni. Las letras a, b y c indican que los valores promedio de actividad de hidrólisis de ATP o activación de la enzima son significativamente diferentes ( $P = 0.01$ ).



**Figura 9. Efecto de la adición de glucosilceramida exógena sobre la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la línea GC-A.** Las fracciones microsomales obtenidas de las hojas de estas plantas se reconstituyó con las cantidades de glucosilceramida indicadas, preincubando durante un tiempo de 40 min a 29°C. Al finalizar el tiempo de preincubación se prosiguió a la determinación de hidrólisis de ATP añadiendo el sustrato de la reacción a la mezcla. Se utilizaron 10 µg de proteína membranal para plantas de genotipo silvestre y 6 µg para la línea GC-A. A) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP medida con las cantidades de glucosilceramida comercial indicadas. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada condición ensayada usando por lo menos 2 preparaciones independientes. B) Los valores de la gráfica de la Figura 9A fueron usados para expresar la restauración de la actividad de hidrólisis de ATP de la línea GC-A a niveles de la silvestre por adición de 40 µg glucosilceramida exógena. La gráfica muestra los valores promedio de la actividad específica de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> ± EE. Las primeras dos barras muestran la actividad en ausencia de glucosilceramida exógena.

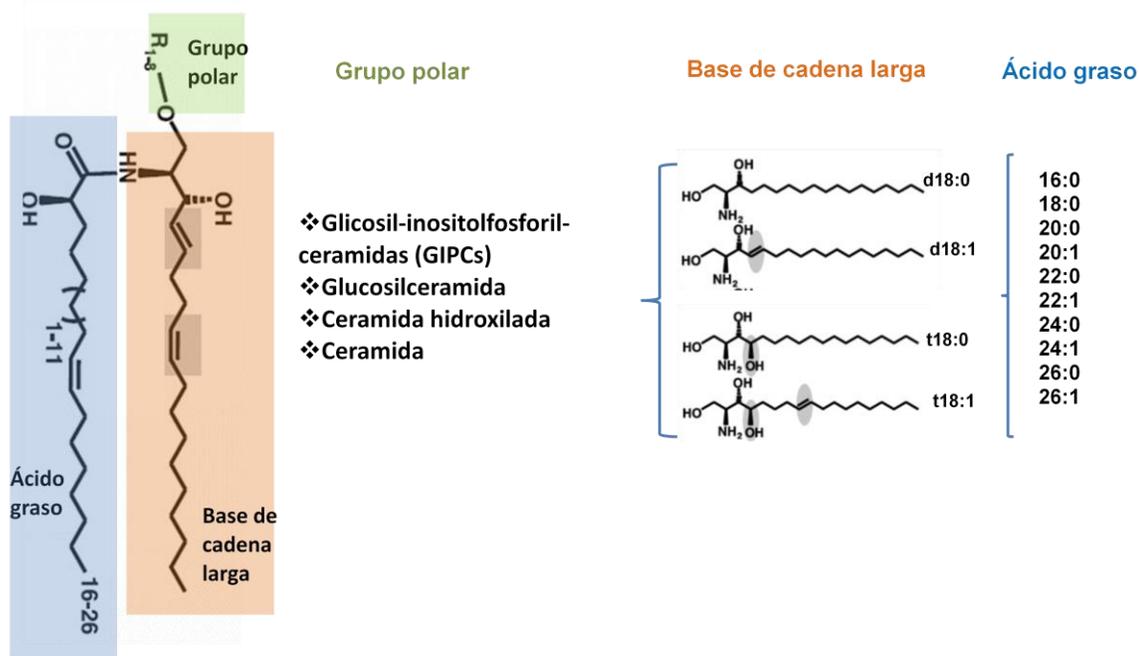
### 3. Composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de las líneas de *Arabidopsis thaliana*, silvestre, *Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la mutante GC-A, que solo tiene el 2% de la glucosilceramida total con respecto a la silvestre, y que indicaban que la glucosilceramida contribuía parcialmente al mantenimiento de una baja actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en las plantas silvestres, se podía pensar que hay una o varias especies de esfingolípidos adicionales involucrados en esta baja actividad de ATPasa, efecto que se evidencia en el aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) en la que disminuyen los esfingolípidos totales. Una manera de identificar las especies de esfingolípidos que tienen un papel importante en la actividad de la ATPasa, fue mediante la determinación de la composición y cuantificación de los esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de las líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas en este trabajo, usando un protocolo que incluía la extracción selectiva de esfingolípidos y su separación e identificación por HPLC en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS.

Los esfingolípidos vegetales basan su complejidad y diversidad en numerosas combinaciones posibles entre ácidos grasos y BCL y su unión al grupo polar (cabeza) cuya composición también varía. Por lo tanto, se hizo un análisis de los cuatro principales grupos de esfingolípidos de acuerdo a su grupo polar (fracciones de glucosilceramidas, glicosilinositolfosforil-ceramidas o GIPCs, ceramidas e hidroxiceramidas), y a su vez se hizo un análisis de cada uno de ellos de acuerdo a su BCL y ácido graso. Analizando las 4 BCL más abundantes unidas a 10 diferentes grupos de ácidos grasos posibles, se configuró un análisis de 160 especies de esfingolípidos de plantas (Figura 10).

Como se muestra en la Figura 11, se encontró que las vesículas de membrana plasmática de las líneas mutantes tanto de las dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducción (-)) como de la línea que tiene una mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), el contenido de esfingolípidos totales fue mayor comparado con las del genotipo silvestre (Wt), llegando a valores arriba de 30 000 nmol/mg de proteína en las tres líneas mutantes, mientras que en la silvestre el contenido de esfingolípidos fue menor a 17 000 nmol/mg de proteína. Como se muestra en la Figura 12, de los esfingolípidos cuantificados, los más abundantes fueron los GIPCs y los menos fueron las ceramidas hidroxiladas, similar a lo reportado por Markham y col. (2006), observándose un aumento de casi el doble de contenido de GIPCs en las tres líneas mutantes, llegando a valores superiores a 25 000 nmol/mg de proteína, mientras que en la silvestre fue de 13 000 nmol/mg de proteína. Con respecto a las

otras especies, se encontró que tanto las plantas silvestres, como las mutantes presentaron un contenido total de glucosilceramidas, ceramidas e hidroxiceramidas en niveles muy similares, indicando que el aumento del contenido total de esfingolípidos en la membrana plasmática observado en la Figura 11 se debió principalmente a las especies de GIPCs.



**Figura 10. Esquema de las numerosas combinaciones posibles entre ácidos grasos, bases de cadena larga y grupo polar (cabeza) de los esfingolípidos complejos.** Se muestran los 4 principales grupos de esfingolípidos complejos de acuerdo a su grupo polar, las 4 tipos de BCL y los 10 tipos de ácidos grasos analizados en este trabajo, obteniéndose como resultado la identificación y cuantificación de 160 especies de esfingolípidos de las membranas plasmáticas de *Arabidopsis thaliana*.

De acuerdo a lo observado en la Figura 12 que indicaba que había un cambio en el contenido de GIPCs en las líneas mutantes con respecto a las plantas silvestres, se podía esperar que había especies específicas de GIPCs que podrían estar involucradas en el aumento observado de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Por ello, se hizo el análisis exhaustivo de las 40 especies de GIPCs cuantificadas, para poder visualizar que especie de GIPCs disminuía o aumentaba en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa con respecto a las tres líneas control (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-)), los datos fueron procesados entre las diferentes especies cuantificadas de GIPCs de acuerdo al tipo de BCL y los genotipos, como se muestra en la Figura 13.

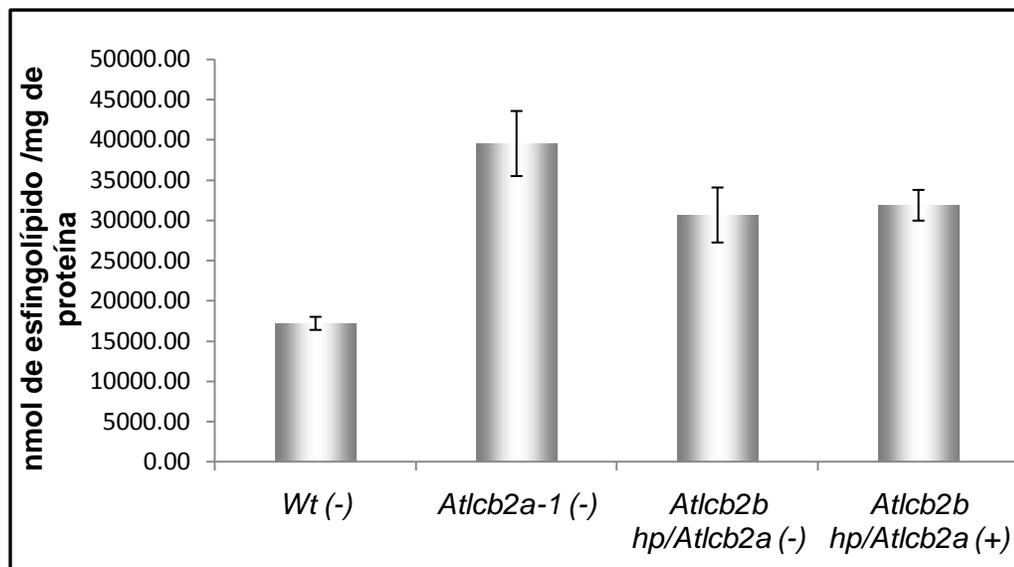


Figura 11. Determinación de la cantidad total esfingolípidos complejos en las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*. El contenido de esfingolípidos totales de la membrana plasmática de plantas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin metoxifenozida se determinó después de la extracción, separación e identificación por HPLC-ESI-MS/MS. Los valores indican la suma de todas las especies de esfingolípidos de las diferentes fracciones principales (GIPCs, Glucosilceramidas, Ceramidas e OH-Ceramidas) obtenidas de 6 determinaciones independientes  $\pm$  EE de dos muestras diferentes de cada línea.

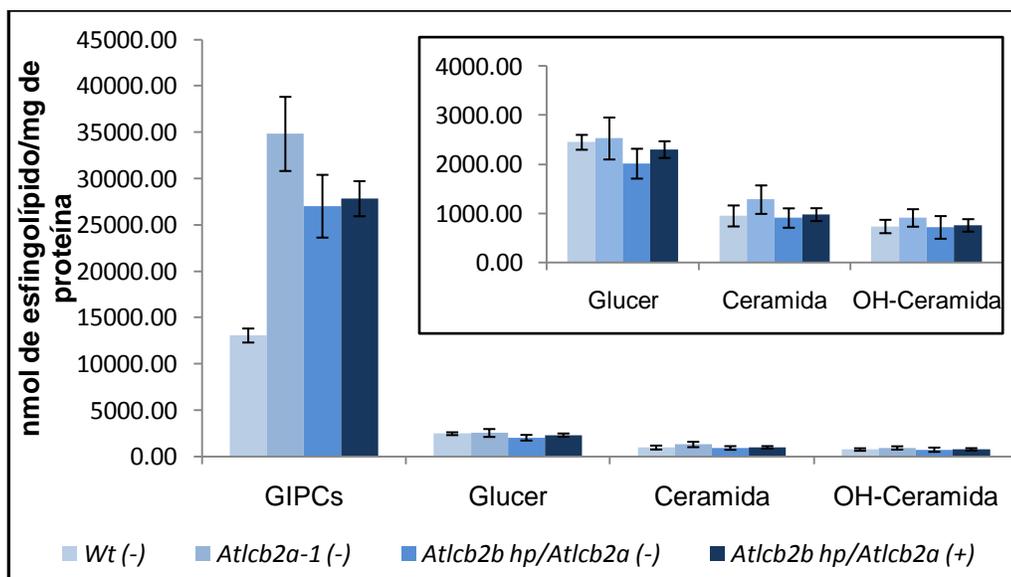
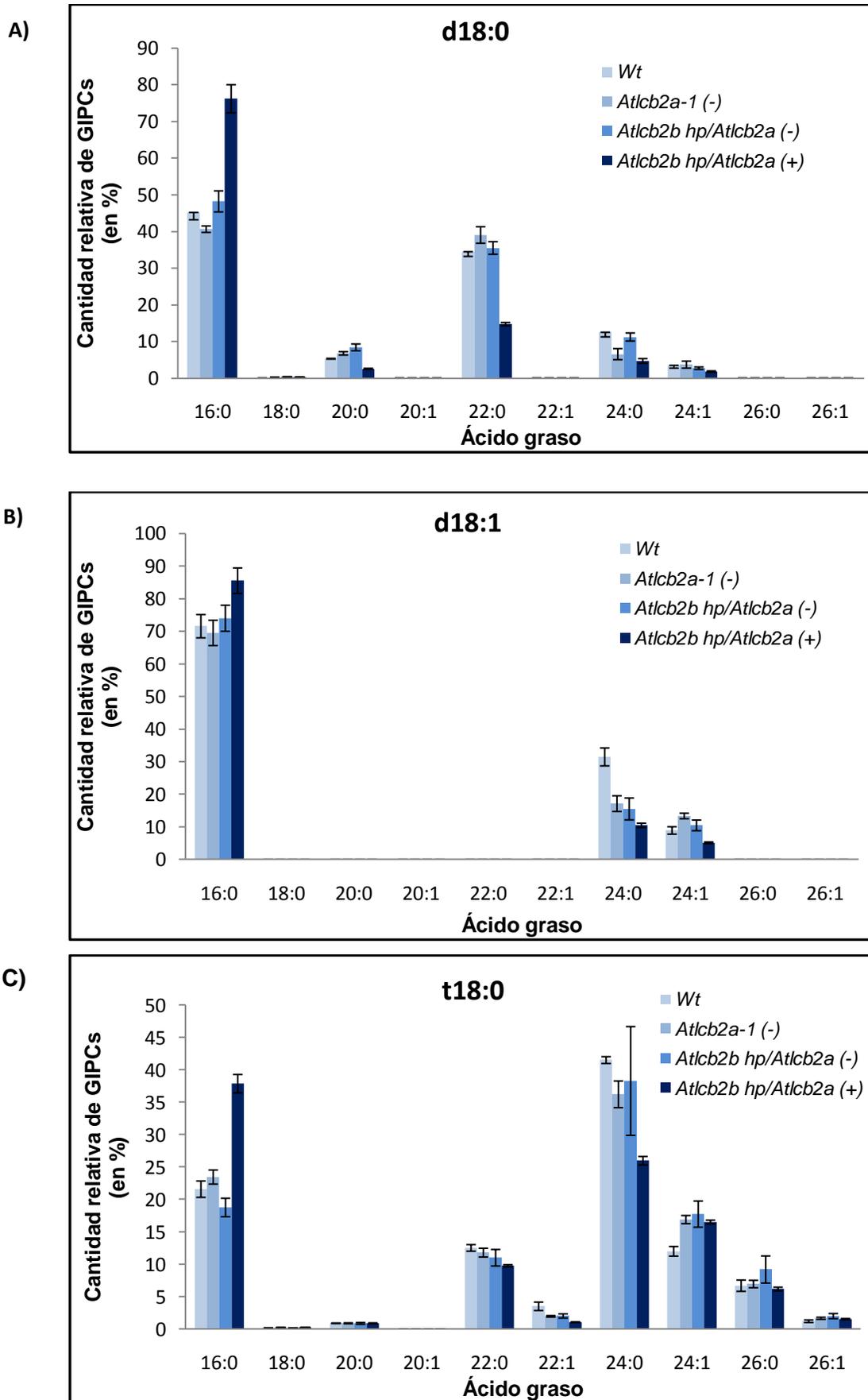
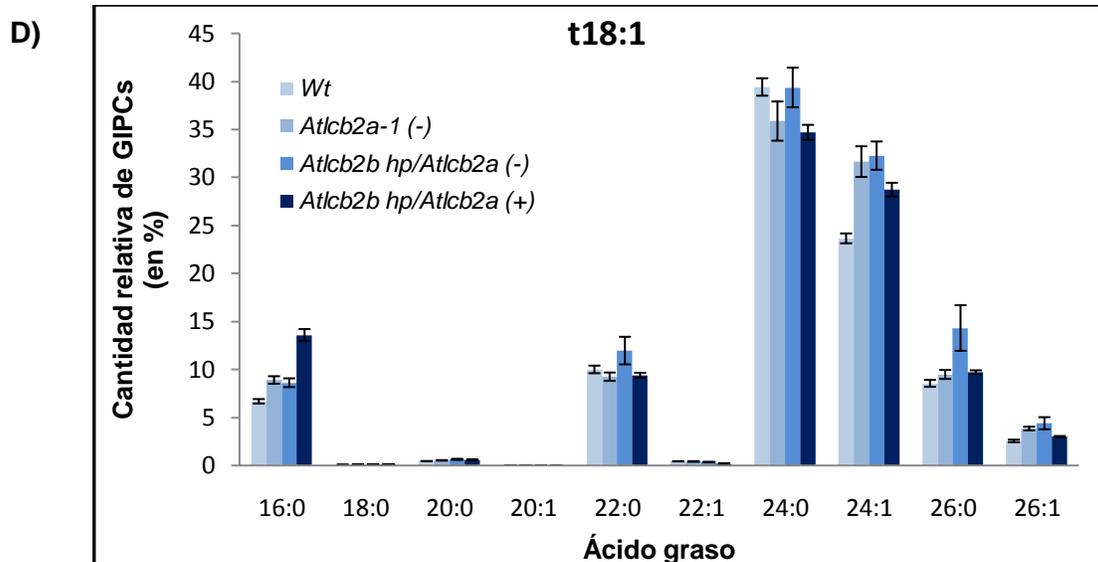


Figura 12. Cuantificación de los principales esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*. El análisis de especies totales de Glicosil inositolfosforil-ceramidas (GIPCs), Glucosilceramidas (Glucer), Ceramidas e OH-Ceramidas de las vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin metoxifenozida, se determinó después de la extracción, separación e identificación por HPLC-ESI-MS/MS. Los valores indican el promedio de la suma de todas las especies de esfingolípidos de acuerdo al tipo de cabeza polar (GIPCs, Glucosilceramidas, Ceramidas e OH-Ceramidas) obtenidas de 6 determinaciones independientes  $\pm$  EE de dos muestras diferentes de cada línea. El recuadro muestra la sección ampliada de las fracciones de Glucosilceramidas, Ceramidas e OH-Ceramidas de la gráfica.

En la Figura 13A, se muestra la cantidad relativa de 10 especies cuantificadas de GIPCs que tenían como BCL a la esfinganina (d18:0) y que solo variaban por el tipo de ácido graso unido a la BCL, encontrándose que en las tres líneas control: silvestre, *At1cb2a-1* y *At1cb2b hp/At1cb2a* (-) el contenido relativo de GIPCs que tenían un ácido graso de 16 carbonos fue de aproximadamente 45% con respecto al contenido total de GIPCs de BCL d18:0 de cada línea respectiva, mientras que en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa (*At1cb2b hp/At1cb2a* (+)), hubo un aumento de esta especie, llegando a valores de 76% con respecto a su contenido total de GIPCs con BCL d18:0. Además hubo una disminución de las especies que tenían un ácido graso de 20, 22 o 24 carbonos, en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa (*At1cb2b hp/At1cb2a* (+)), llegando a valores de 2.6, 14.7 y 4.7 % respectivamente, con respecto a su contenido total de GIPCs de BCL d18:0 mientras que en las líneas control (silvestre, *At1cb2a-1* y *At1cb2b hp/At1cb2a* (-)) los valores estaban arriba de 5.4, 34.5 y 6.6% respectivamente con relación al contenido total de GIPCs de BCL d18:0 de cada línea. Este mismo comportamiento se observó en GIPCs compuestas por una BCL tri-hidroxilada de 18 carbonos con o sin insaturación (t18:0 y t18:1) y un ácido graso de 16 carbonos (Figuras 13C y D, respectivamente), encontrándose un aumento de estas especies en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa. Con respecto a las especies cuantificadas de GIPCs que tenían una BCL di-hidroxilada de 18 carbonos con una insaturación (d18:1) como se muestra en la Figura 13B, se observó que solo hubo tres especies de GIPCs con BCL d18:1 fueron diferentes, GIPCs con un ácido graso de C16:0, C24:0 o C24:1, y de estos se observó que los últimos dos, se encontraban en menor proporción en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa, obteniendo valores de 10.5 y 5.1% con respecto a su contenido total de GIPCs con BCL d18:1, mientras que las tres líneas control que tienen una actividad basal, fueron arriba de 15.5 y 10.5% respectivamente con respecto al contenido total de GIPCs con BCL d18:1 de cada línea respectiva. Esta disminución de GIPCs con ácidos grasos de cadena muy larga también se observó en GIPCs con una BCL t18:0, que fue la especie que tenía un ácido graso C24:0 (Figura 13C). Estos resultados indicaron que las posibles especies de GIPCs que podrían estar involucradas en este aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* (+), son especies que tiene en su región hidrofóbica una BCL di- o tri-hidroxilada (d18:0 o t18:0) y un ácido graso de 16, 20, 22 o 24 carbonos.





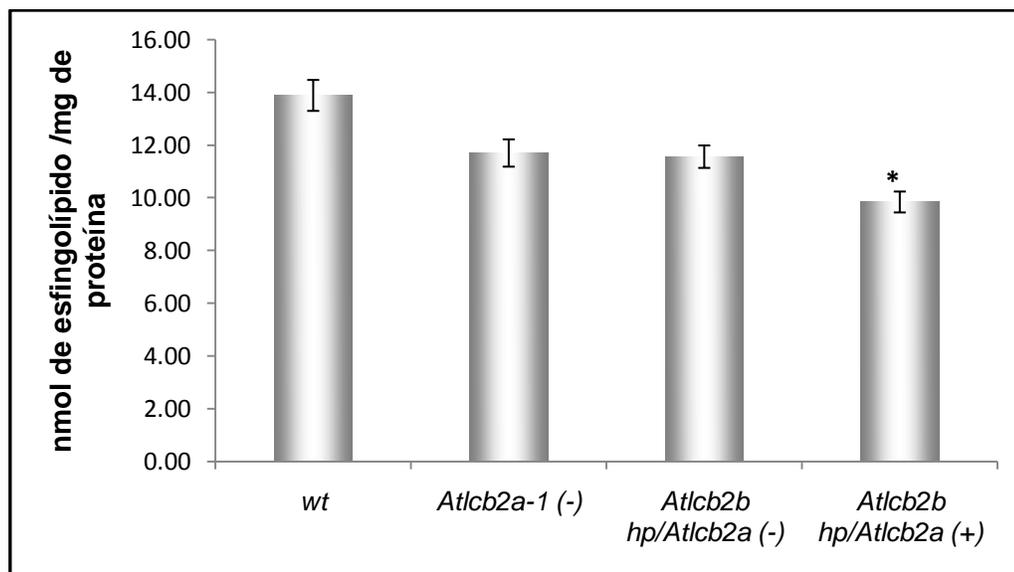
**Figura 13. Análisis de glicosil inositolfosforil-cerámidas (GIPCs) en las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*.** El contenido de GIPCs de la membrana plasmática de plantas silvestres, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin metoxifenozida se determinó después de la extracción, separación e identificación por HPLC-ESI-MS/MS.

- A) Cantidad relativa de las especies de GIPCs que contienen una BCL d18:0, obtenidas para cada línea con respecto a su total de GIPCs con una BCL d18:0.
- B) Cantidad relativa de las especies de GIPCs que contienen una BCL d18:1, obtenidas para cada línea con respecto a su total de GIPCs con una BCL d18:1.
- C) Cantidad relativa de las especies de GIPCs que contienen una BCL t18:0, obtenidas para cada línea con respecto a su total de GIPCs con una BCL t18:0.
- D) Cantidad relativa de las especies de GIPCs que contienen una BCL t18:1, obtenidas para cada línea con respecto a su total de GIPCs con una BCL t18:1.

Los valores expresados indican el promedio de 6 determinaciones independientes  $\pm$  EE de dos muestras diferentes de cada línea respectiva.

De acuerdo a estudios de nuestro laboratorio en vesículas membranales la adición de glucosilceramida exógena (con una BCL d18:1 y un ácido graso de 16 carbonos) a las membranas de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), producía una disminución de la actividad de la ATPasa, hasta los niveles originales de la actividad de las líneas control [González Reyes, 2010]. Por ello, se podía esperar que la disminución de glucosilceramida en las vesículas membranales era responsable de la mayor actividad de ATPasa y por lo tanto, se podía proponer que especies específicas de glucosilceramidas podrían estar en menor proporción en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), aún cuando en la Figura 12 se observaba que no había diferencias en el contenido de glucosilceramidas totales en las diferentes líneas estudiadas. Por ello, se hizo el análisis exhaustivo de las 40 especies de glucosilceramidas cuantificadas (ver Apéndice 5), encontrándose que sólo una especie resultó diferente en la línea con mayor actividad de ATPasa. Como se muestra en la Figura 14, hubo una disminución de glucosilceramidas con una

BCL tri-hidroxilada de 18 carbonos con una insaturación (t18:1) y un ácido graso de 22 carbonos, en la línea que tiene una mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), comparada con las tres líneas control (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/ Atlcb2a* sin inducción), indicando que esta especie de glucosilceramida con estas características puede estar involucrada en el aumento de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+).

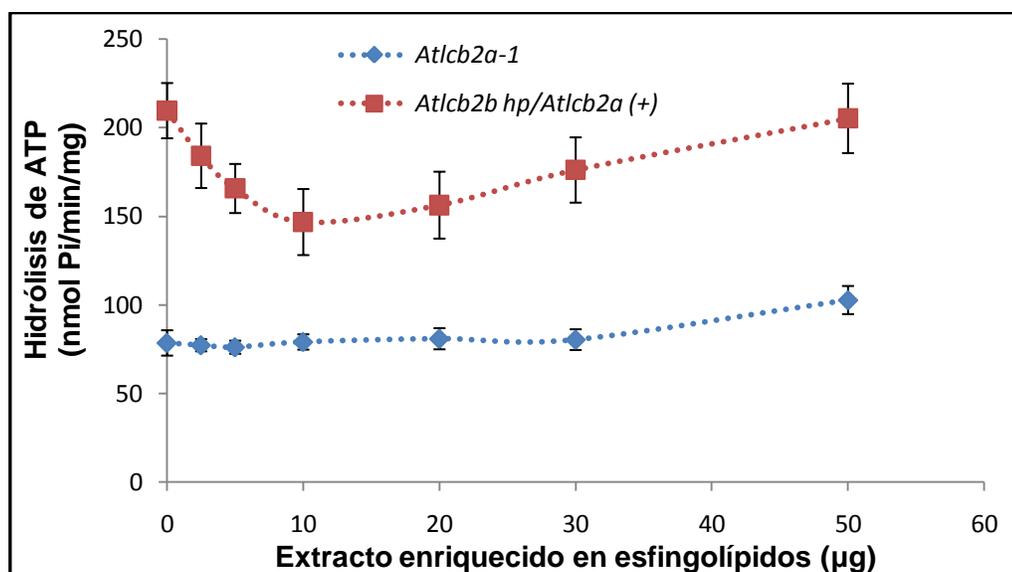


**Figura 14. Niveles de la única especie de glucosilceramida que está en menor contenido en la línea con mayor actividad de ATPasa.** Se analizaron 40 especies de glucosilceramidas (no se muestran) en las vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin metoxifenozida por HPLC ESI-MS/MS. De estas se seleccionaron las especies en las que hubo un cambio significativo en la línea con mayor actividad de ATPasa con respecto a las líneas control, resultando solo la glucosilceramida que contiene una base de cadena larga t18:1 y un ácido graso de C20:0 y que es la especie cuyos niveles están graficados. Los valores son el promedio de 6 determinaciones independientes  $\pm$  EE de dos muestras diferentes de cada línea. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5*, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

#### 4. Reconstitución membranal con un extracto enriquecido en esfingolípidos en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+).

Con base en los resultados del análisis de esfingolípidos de las preparaciones membranales usadas en este trabajo, mismos que indicaban que los cambios en los niveles de especies individuales de glucosilceramidas y GIPCs en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) podrían estar involucradas en el aumento de la actividad de ATPasa (ver Figuras 13 y 14), se planteó un experimento adecuado para corroborar que esta deficiencia de esfingolípidos complejos específicos era lo que estaba aumentando la actividad de hidrólisis de ATP en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Este experimento era el de determinar la influencia de esfingolípidos exógenos

extraídos de vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres y suplementarlos a las vesículas de membrana plasmática de las plantas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) con mayor actividad de ATPasa de H<sup>+</sup>. Para ello, se tomaron diferentes cantidades de un extracto enriquecido en esfingolípidos y se incubaron con las vesículas de membrana plasmática de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) por 40 min a 29°C. A continuación, se llevaron a cabo experimentos de hidrólisis de ATP. Los resultados de estos experimentos se encuentran en la Figura 15. En esta figura se puede observar que en los tubos en donde se incubó a las membranas sin el extracto de esfingolípidos, los valores de las actividades fueron similares a las encontradas en experimentos anteriores para ambas líneas, la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) sigue teniendo una mayor actividad que la línea *Atlcb2a-1*, obteniéndose valores alrededor de 200 y 80 nmol Pi/min/mg de cada línea, respectivamente. Al ir aumentando gradualmente la cantidad de extracto enriquecido en esfingolípidos, no se afectó la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática presente en las vesículas provenientes de la línea control *Atlcb2a-1*, este efecto se mantuvo usando cantidades menores a 30 µg de extracto. Sin embargo, a cantidades mayores de extracto se observó un ligero aumento en la actividad en estas membranas de las plantas control *Atlcb2a-1*. En el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), como se esperaba, la actividad disminuyó de manera proporcional a la cantidad de esfingolípidos exógenos añadidos, obteniéndose una reducción de la actividad de 200 nmol Pi/min/mg a valores de actividad de 150 nmol Pi/min/mg con 15 µg de extracto, pero a cantidades mayores de 20 µg de extracto, la actividad fue incrementado de manera proporcional a la cantidad de esfingolípidos exógenos añadido alcanzando valores de actividad muy similares a los obtenidos en ausencia de esfingolípidos exógenos. Los resultados obtenidos indicaron que la disminución de glucosilceramida y GIPCs específicos en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) estaban asociados al aumento en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> y esta restauración parcial de la actividad de ATPasa a los valores de una planta silvestre, sugiere que además de la disminución de estos esfingolípidos específicos, el aumento de GIPCs como se observó en el análisis lipídico (ver Figura 13) está involucrado en el aumento de actividad de la ATPasa.



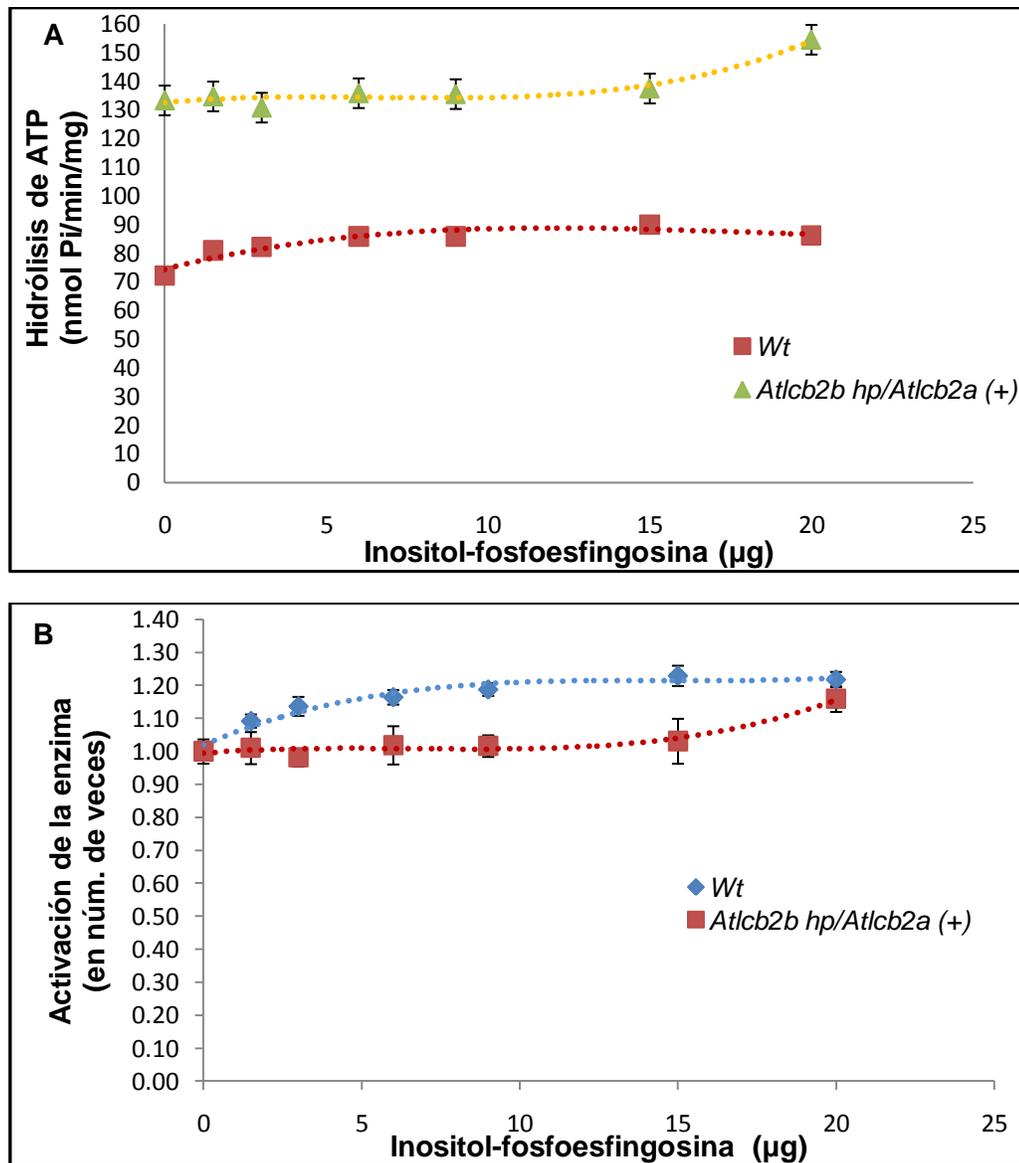
**Figura 15. Reconstitución membranal de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)* con un extracto enriquecido en esfingolípidos extraído de vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres.** Se realizó la reconstitución membranal de las vesículas de membrana plasmática provenientes de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la línea *At1cb2a-1* como control y de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)* con diferentes cantidades de un extracto enriquecido en esfingolípidos, preincubando durante un tiempo de 40 min a 29°C. Al finalizar el tiempo de preincubación, se prosiguió a la determinación de hidrólisis de ATP añadiendo el sustrato de la reacción a la mezcla. Se utilizaron 4 µg de proteína membranal para plantas control *At1cb2a-1* y 2 µg para la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)*. La gráfica muestra los valores promedio  $\pm$  EE de la actividad de hidrólisis de ATP medida con las cantidades indicadas de extracto enriquecido en esfingolípidos. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada condición ensayada usando por lo menos 2 preparaciones membranales independientes.

##### 5. Efecto de la reconstitución membranal con inositol-fosfoesfingosina en la actividad de hidrólisis de ATP de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)*.

Los resultados del análisis de esfingolípidos de las preparaciones membranales usadas en este trabajo, indicaban que el aumento de GIPCs en la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)* (Ver Figura 12) podría estar involucrado en el aumento de la actividad de ATPasa. Por ello y debido a la indisponibilidad de una GIPC comercial con estas características, se realizaron estudios del efecto de la reconstitución membranal con inositol-fosfoesfingosina (un liso-derivado de GIPC, al cual le falta la cadena de ácido graso en la porción hidrofóbica) en la actividad de la ATPasa de preparaciones de plantas silvestres y *At1cb2b hp/At1cb2a (+)*. Como ya se mencionó en los experimentos de reconstitución membranal con un lípido exógeno, se usaron diferentes cantidades de lípido que en este caso fue inositol-fosfoesfingosina y se preincubaron por un tiempo de 40 min a 29°C con las vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas silvestres y de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)*. Posteriormente, se determinó la hidrólisis de ATP

de cada una de ellas. Los resultados de estos experimentos se encuentran en la Figura 16A. Como se puede observar en la gráfica, los valores de las actividades de las preparaciones membranales determinadas en ausencia de inositol-fosfoesfingosina, fueron similares a los encontrados en los experimentos anteriores en el laboratorio [González-Reyes, 2010; Morales-Cedillo, 2012], es decir, fue mayor la actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* comparada con la de plantas silvestres. Al ir aumentando gradualmente la cantidad de inositol-fosfoesfingosina a las membranas provenientes de plantas silvestres, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> fue incrementado proporcionalmente, alcanzado una actividad máxima de 90 nmol Pi/min/mg con 10 µg de inositol-fosfoesfingosina y este efecto se mantuvo aún a cantidades mayores (15 y 20 µg). Sin embargo, en la línea que tiene mayor cantidad de GIPCs en la membrana plasmática (*Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*) comparada con la línea silvestre (ver Figura 13), se observó que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> no fue afectada por la adición de inositol-fosfoesfingosina.

Para poder visualizar mejor el efecto de las diferentes cantidades de fosfoinositol esfingosina en la actividad de hidrólisis de ATP en las líneas silvestres y *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*, se comparó la actividad a las diferentes cantidades de fosfoinositol esfingosina con respecto a la actividad de plantas silvestres medida en ausencia de fosfoinositol esfingosina, como se muestra en la Figura 16B. Como podemos observar en la Figura 16B, la actividad de plantas silvestres medida en presencia de fosfoinositol esfingosina tuvo una activación máxima de 1.22 veces con respecto a la actividad medida en ausencia de este compuesto. Mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* no hubo una activación de la enzima por la adición de fosfoinositol esfingosina con cantidades menores a 20 µg. Los resultados de la lipidómica y de la reconstitución membranal con el derivado de GIPC, indican que la GIPC tiene un efecto positivo en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en las plantas con el genotipo silvestre.

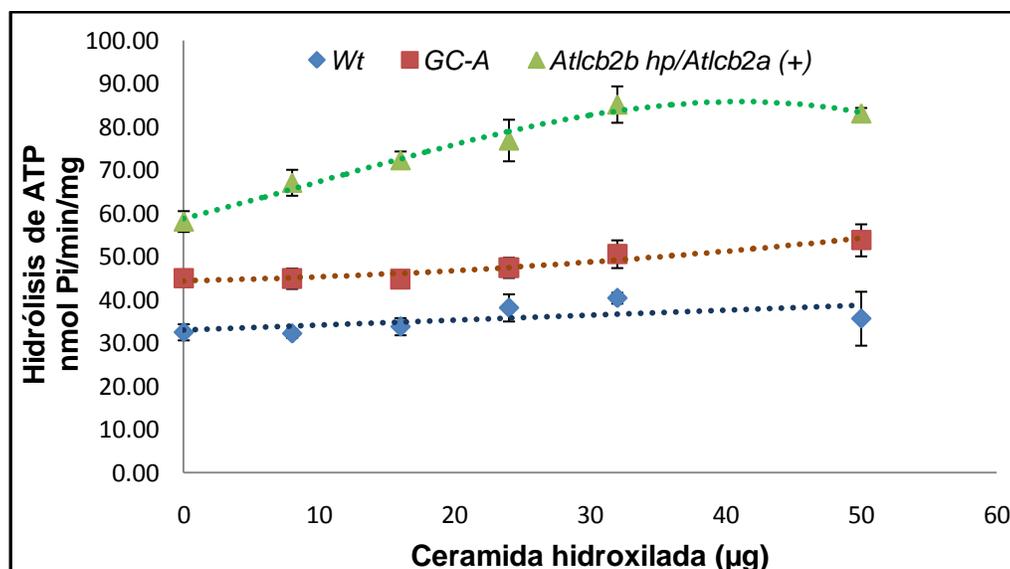


**Figura 16. Efecto de la adición de una preparación comercial de un liso-derivado de GIPC sobre la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de plantas del genotipo silvestres y de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)*. Se realizó la reconstitución membranal de las vesículas de membrana plasmática provenientes de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)* con diferentes cantidades de inositol-fosfoesfingosina, preincubando durante 40 min a 29°C. Al finalizar el tiempo de preincubación se prosiguió con la determinación de hidrólisis de ATP añadiendo el sustrato de la reacción a la mezcla. Se utilizaron 4 µg de proteína membranal para plantas de genotipo silvestre y 2 µg para la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)*. A) Valores promedio ± EE de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> medida con las cantidades de inositol-fosfoesfingosina indicadas. B) Los valores de la gráfica anterior fueron usados para expresar el aumento de la actividad por inositol-fosfoesfingosina. La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces ± EE con respecto a la actividad de la silvestre medida en ausencia de inositol-fosfoesfingosina. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada condición ensayada usando por lo menos 2 preparaciones membranales independientes.**

## 6. Determinación del efecto de la reconstitución membranal con ceramida exógena en la actividad de hidrólisis de ATP de preparaciones membranales de plantas adultas de Arabidopsis.

A continuación se investigó qué parte de los esfingolípidos complejos era importante para mantener la actividad de la ATPasa de  $H^+$  en bajos (glucosilceramida) o altos (GIPC) niveles en la línea silvestre. Para explorar qué porción de la glucosilceramida o GIPC era la responsable del efecto sobre la actividad de la ATPasa de  $H^+$  se determinó el efecto de la parte hidrofóbica de estos esfingolípidos complejos, mediante estudios del efecto de la reconstitución membranal de las preparaciones membranales con ceramida exógena en la actividad de la ATPasa. Se ha descrito que la parte hidrofóbica de la especie más abundante de glucosilceramida en Arabidopsis está formada por una base de cadena larga d18:1 y como ácido graso, mayoritariamente el ácido palmítico hidroxilado en la posición 2 [Sullards y col., 2000; Markham and Jaworski, 2007]. Por ello, para determinar el efecto de la parte hidrofóbica de la glucosilceramida, en los experimentos de reconstitución membranal se usaron diferentes cantidades de una ceramida hidroxilada comercial con una BCL d18:1 y un ácido graso C18 hidroxilado en la posición 2 y se preincubaron por un tiempo de 40 min a 29°C con las fracciones microsomales obtenidas de las plantas silvestres y de las líneas *GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Posteriormente, se determinó la hidrólisis de ATP. Los resultados de estos experimentos se encuentran en la Figura 17. Como se puede observar en la gráfica, los valores de las actividades en los tubos en donde se incubó a las fracciones microsomales sin ceramida hidroxilada exógena, fueron similares a los encontrados en los experimentos anteriores, es decir, fue mayor la actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) comparada con la de las plantas silvestres y de la línea *GC-A*, pero la actividad de la línea *GC-A* es mayor comparada con la de plantas silvestres (ver Figura 8). Al ir aumentando gradualmente la cantidad de ceramida hidroxilada exógena a las membranas microsomales provenientes de plantas silvestres, no se afectó la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , y este efecto se mantuvo a cantidades menores a 30  $\mu$ g de ceramida hidroxilada. Sin embargo, a cantidades mayores de ceramida hidroxilada exógena se observó un ligero aumento en la actividad en estas membranas microsomales de plantas silvestres. Este mismo comportamiento se observó en las membranas microsomales provenientes de la línea *GC-A*, la actividad de la ATPasa de  $H^+$  no fue afectada por la adición de ceramida hidroxilada exógena a cantidades menores a 30  $\mu$ g, pero a cantidades mayores de ceramida hidroxilada exógena también hubo un ligero aumento en la actividad de la ATPasa. Mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlc2a* (+) que tiene mayor actividad de ATPasa y que de acuerdo a la lipidómica tiene mayor contenido de GIPCs en la membrana plasmática

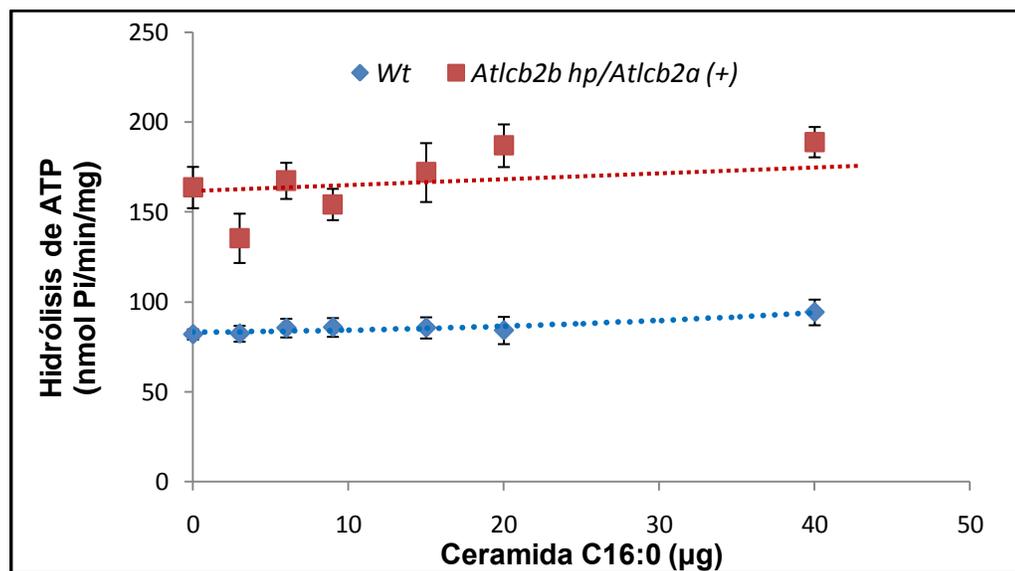
comparada con la silvestre (ver Figura 12), se observó que al ir aumentando gradualmente la cantidad de ceramida exógena aumentó la actividad de ATPasa de manera proporcional, alcanzando un valor máximo de 80 nmol Pi/min/mg después de adicionar 30  $\mu$ g de ceramida exógena. Estos resultados indicaron que la parte hidrofóbica de la glucosilceramida utilizada en la reconstitución de la línea *GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* no estaba asociada al aumento en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ .



**Figura 17. Efecto de la adición de una preparación comercial de ceramida hidroxilada sobre la actividad de ATPasa de  $H^+$  de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la línea *GC-A*.** Se realizó la reconstitución membranal de las fracciones microsomales provenientes de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la líneas *GC-A* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* con diferentes cantidades de ceramida hidroxilada comercial que contiene una base de cadena larga d18:1 y un ácido graso C18 hidroxilado en la posición 2, preincubando durante 40 min a 29°C. Al finalizar este tiempo se prosiguió a la determinación de hidrólisis de ATP añadiendo el sustrato de la reacción a la mezcla. Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína membranal para plantas de genotipo silvestre y 6  $\mu$ g para la línea *GC-A*. La gráfica muestra los valores promedio  $\pm$  EE de la actividad de hidrólisis de ATP medida con las cantidades de ceramida hidroxilada indicadas. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada condición ensayada usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

Con respecto a la parte hidrofóbica de las GIPCs se estudió el efecto de la reconstitución membranal de las vesículas con ceramida exógena en la actividad de la ATPasa, usando dos tipos de ceramidas: una ceramida que contiene una BCL d18:1 y un ácido graso de 16 carbonos, que es una de las formas de la parte hidrofóbica de GIPCs que se incrementó en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* de acuerdo a la lipidómica (ver Figura 13) y la segunda ceramida contiene una BCL d18:1 y un ácido de 24 carbonos, ya que de acuerdo a la literatura los GIPCs están enriquecidos por ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA de acuerdo a sus siglas en inglés) [Markham y col., 2006]. Como se puede observar en la Figura 18, al ir aumentando

gradualmente la cantidad de ceramida exógena que tienen ácidos grasos de 16 carbonos a las vesículas de membrana plasmática provenientes de plantas silvestres que de acuerdo a la lipidómica tienen un menor contenido de GIPCs comparada con la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*, no se afectó la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Este mismo comportamiento se observó en las membranas provenientes de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> no fue afectada por la adición de ceramida exógena a cantidades menores a 30 µg, pero a cantidades mayores de ceramida exógena hubo un ligero aumento en la actividad de la ATPasa.

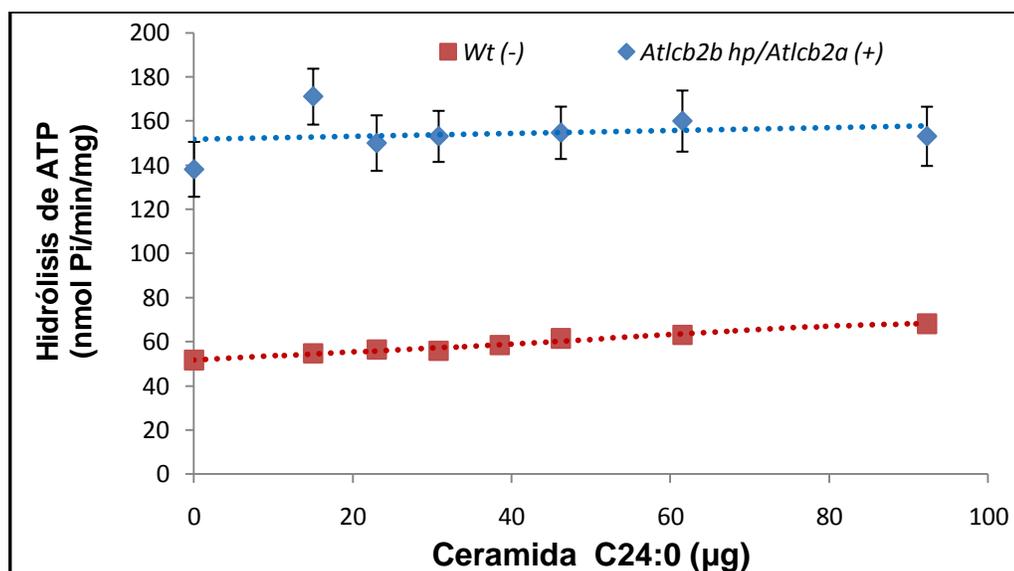


**Figura 18. Efecto de la adición de una preparación comercial de ceramida con ácido graso C16:0 sobre la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*.** Se realizó la reconstitución membranal de las vesículas de membrana plasmática provenientes de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)* con diferentes cantidades de ceramida comercial que contiene una base de cadena larga d18:1 y un ácido graso de C16, preincubando durante un tiempo de 40 min a 29°C. Al finalizar el tiempo de preincubación se prosiguió a la determinación de hidrólisis de ATP por adición del sustrato de la enzima. Se utilizaron 4 µg de proteína membranal para plantas de genotipo silvestre y 2 µg para la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*. La gráfica muestra los valores promedio ± EE de la actividad de hidrólisis de ATP medida con las cantidades de ceramida indicadas. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada condición ensayada usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

Con respecto a la otra ceramida, como se ilustra la Figura 19, al ir aumentando gradualmente la cantidad de ceramida C24:0 en las membranas provenientes de plantas silvestres, la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> fue incrementado proporcionalmente, en la que se obtuvo un aumento de la actividad de 50 nmol Pi/min/mg a valores de 68 nmol Pi/min/mg con 60 µg de ceramida C24:0, es decir un aumento arriba del 30%. Sin embargo, en la línea que tiene mayor cantidad de GIPCs en la membrana plasmática (*Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*) comparada con

la línea silvestre (ver Figura 13), se observó que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> no fue afectada por la adición de ceramida de ácidos grasos de cadena muy larga (C24:0).

Los resultados obtenidos indicaron que la parte hidrofóbica de la glucosilceramida formada por un BCL d18:0 unida a un ácido graso de cadena corta no estaba asociada al efecto en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, mientras que la ceramidas que tienen ácidos grasos de cadena muy larga que pueden formar parte de los GIPCs podrían estar asociadas al efecto en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>.



**Figura 19. Efecto de la adición de una preparación comercial de ceramida con ácido graso C24:0 sobre la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestre y de la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a (+)*.** Se realizó la reconstitución membranal de las vesículas de membrana plasmática provenientes de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestres y de la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a (+)* con diferentes cantidades de ceramida comercial que contiene una base de cadena larga d18:1 y un ácido graso de C24, preincubando durante un tiempo de 40 min a 29°C. Al finalizar el tiempo de preincubación se prosiguió a la determinación de hidrólisis de ATP por adición del sustrato de la enzima. Se utilizaron 4 µg de proteína membranal para plantas de genotipo silvestre y 2 µg para la línea *AtIcb2b hp/AtIcb2a (+)*. La gráfica muestra los valores promedio ± EE de la actividad de hidrólisis de ATP medida con las cantidades de ceramida indicadas. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada condición ensayada usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

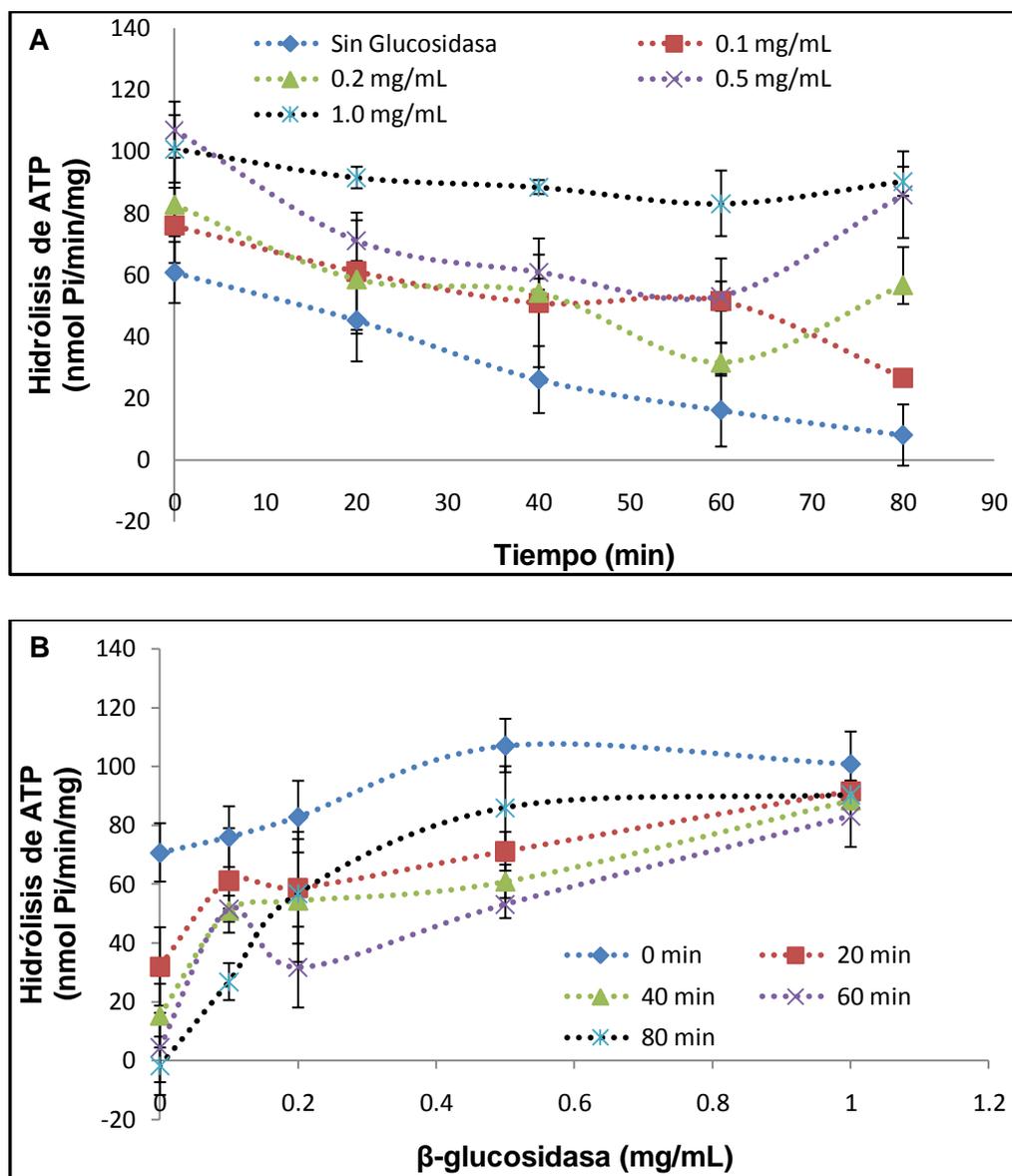
## 7. Condiciones óptimas para medir el efecto de la remoción de carbohidratos de las vesículas de membrana plasmática por $\beta$ -glucosidasa en la actividad la ATPasa de $H^+$ de membrana plasmática.

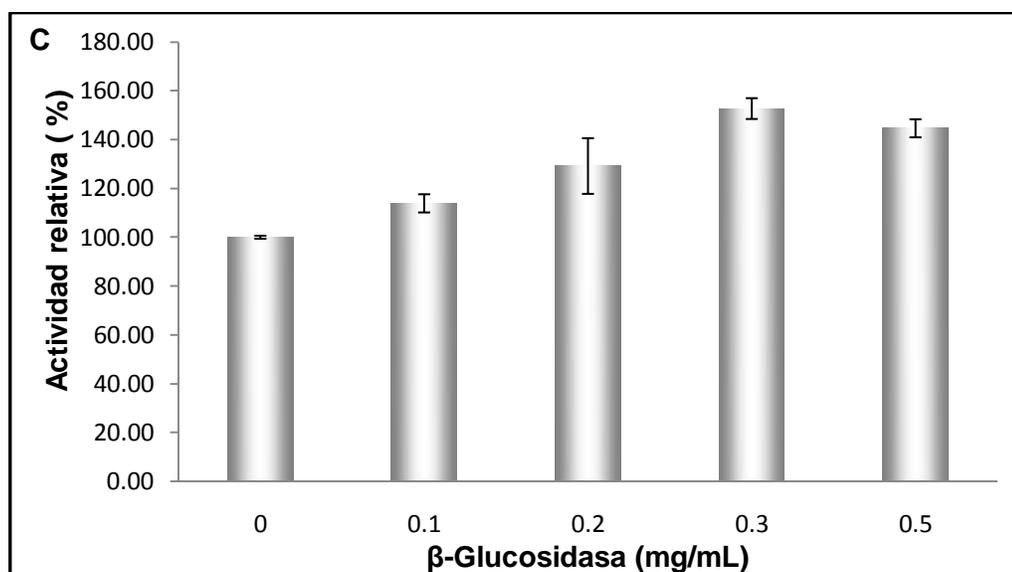
De acuerdo a los resultados anteriores que indicaban que la parte hidrofóbica (ceramida) de los esfingolípidos no estaba relacionada con cambios en la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, quedaba la posibilidad de que la parte polar fuera la involucrada en el efecto de mantener la actividad de la ATPasa de  $H^+$  en bajos niveles en la línea silvestre. Una forma de explorar que la parte polar de los esfingolípidos y en particular de la glucosilceramida era la responsable del efecto sobre la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , fue determinar el efecto de la modificación de la región polar de los esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática. Para ello se removieron los carbohidratos por tratamiento con  $\beta$ -glucosidasa, ya que se ha descrito que los carbohidratos presentes en los esfingolípidos se encuentran unidos a la ceramida mediante un enlace tipo  $\beta$  [Markham y col., 2006]. Para ello, primero se establecieron las condiciones experimentales para determinar el efecto de la remoción de carbohidratos por  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ .

El establecimiento de las condiciones experimentales incluyó la determinación de la concentración de  $\beta$ -glucosidasa que afectaba la actividad de ATPasa y el tiempo de preincubación en presencia de  $\beta$ -glucosidasa. Los valores determinados están representados en la Figura 20. En la Figura 20A y B se estableció el comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP con las diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucosidasa variando el tiempo de preincubación. Se observó que en los tubos sin preincubación (tiempo 0), los valores de las actividades de hidrólisis de ATP fueron incrementando a mayor concentración de  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, se observó que la actividad de hidrólisis de ATP fue disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de preincubación tanto en la condición sin  $\beta$ -glucosidasa como en la de las diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucosidasa evaluadas (Figura 20A). Lo anterior sugería la inactivación de la ATPasa de  $H^+$ , pero era menor conforme aumentaba la concentración de  $\beta$ -glucosidasa, indicando que sí había un efecto positivo de la  $\beta$ -glucosidasa sobre la actividad de la ATPasa de  $H^+$  pero que quizás se estaba enmascarando por la inactivación de la enzima por la preincubación. Como se observa en la Figura 20B, la actividad máxima de la ATPasa de  $H^+$  observada fue a una concentración de 0.5 mg/mL de  $\beta$ -glucosidasa en las condiciones sin preincubación o 80 min de preincubación, obteniéndose valores entre 85-100 nmol  $P_i$ /min/mg y se mantuvo aún a concentraciones mayores (1.0 mg/mL).

Por el resultado anterior, se hizo el mismo experimento exponiendo a las vesículas de membrana plasmática del tipo silvestre a varias concentraciones de  $\beta$ -glucosidasa  $\leq$  a 0.5

mg/mL, pero ahora sin una fase de preincubación. En este experimento, la exposición de las membranas a la enzima se hizo simultáneamente a la actividad de hidrólisis de ATP (20 min a 29°C). En la Figura 20C, se observó que la actividad de ATPasa aumentó de manera proporcional a la concentración de  $\beta$ -glucosidasa hasta los 0.3 mg/mL, concentración a la cual se alcanzó la actividad máxima y que se mantuvo aún a concentraciones mayores (0.5 mg/mL), indicando que al usar 0.3 mg/mL de  $\beta$ -glucosidasa se obtenía el efecto máximo. Por lo tanto, las condiciones óptimas para ensayar los efectos de  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP en la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducir fueron una concentración 0.3 mg/mL de  $\beta$ -glucosidasa sin preincubación.





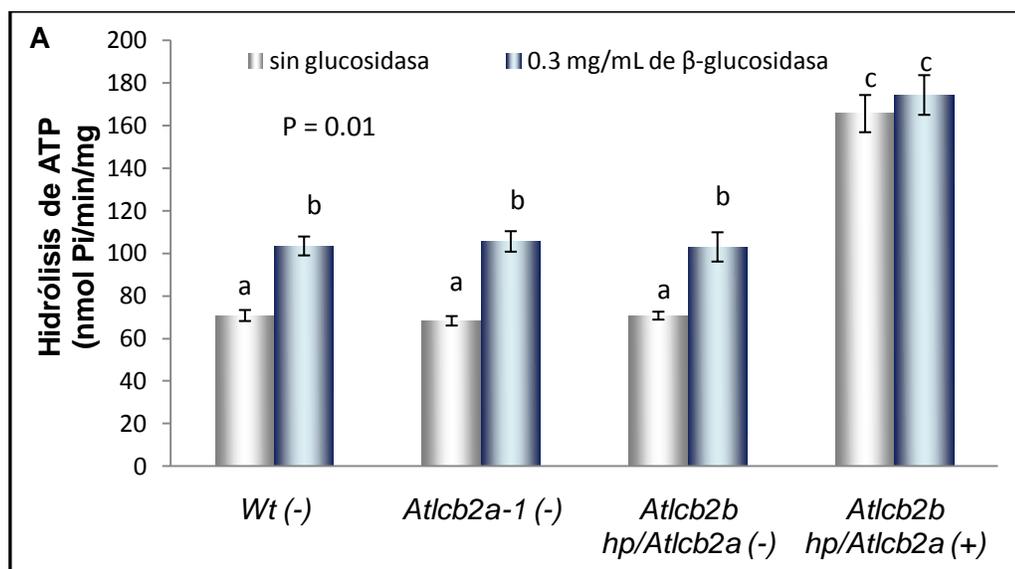
**Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas para medir el efecto de  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $H^+$  en vesículas de membrana plasmática de hojas de *Arabidopsis thaliana* en líneas silvestre.** En vesículas de membrana plasmática provenientes de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de la silvestre se determinó la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de  $\beta$ -glucosidasa a diferentes concentraciones con o sin preincubación. Se utilizaron 4  $\mu$ g de proteína membranal para cada condición. A y B) Las gráficas muestran los valores promedio de la actividad medida a diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucosidasa (mg/mL) a diferentes tiempos de preincubación, expresados como nmol Pi/min/mg  $\pm$  EE. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones, usando por lo menos 2 preparaciones independientes. C) La gráfica muestra los valores promedio de la actividad medida a diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucosidasa (mg/mL) sin preincubación, expresados como actividad relativa en %  $\pm$  EE obtenida con respecto a la actividad medida en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa.

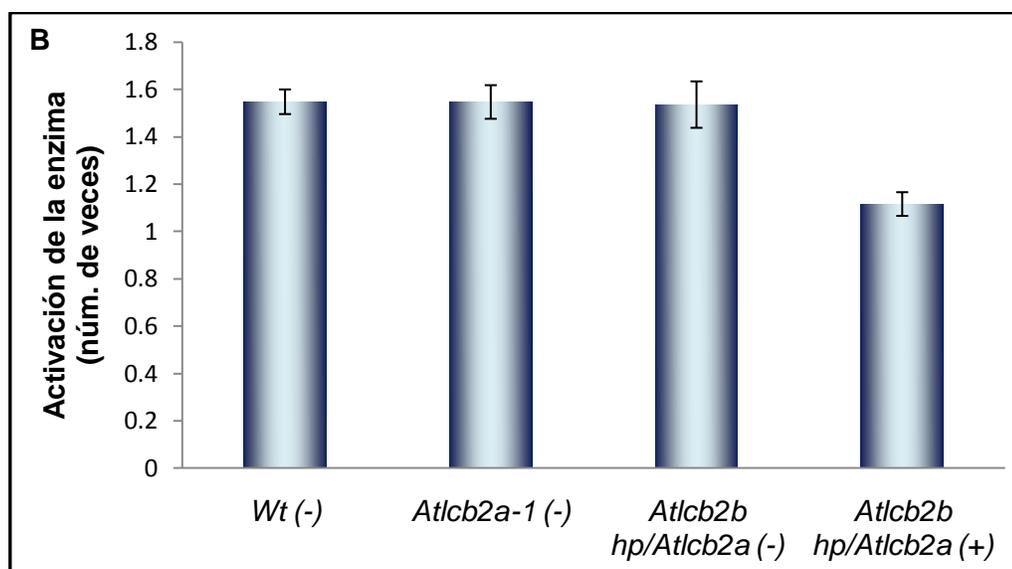
#### 8. Determinación del efecto de la remoción de carbohidratos de las vesículas de membrana plasmática por $\beta$ -glucosidasa en la actividad de la ATPasa de $H^+$ de *Arabidopsis thaliana*.

Ya establecidas las condiciones óptimas para ensayar los efectos de  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP, en las que se observó que en la vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres, la actividad de la ATPasa aumenta en presencia de  $\beta$ -glucosidasa (0.3 mg/mL, sin preincubación), se determinó el efecto de la glucosidasa en la línea *Atlcb2a-1* y en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción. Los valores determinados se muestran en la Figura 21A, observándose que tanto en las plantas silvestres como en las otras dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-)), la actividad de ATPasa, medida en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa fue de 70 nmol Pi/min/mg, mientras que en presencia de  $\beta$ -glucosidasa hubo un incremento de la actividad con respecto a la actividad medida en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa en cada línea, alcanzándose valores de alrededor de 100 nmol Pi/min/mg. En contraste, la actividad de ATPasa no cambió, con o sin  $\beta$ -glucosidasa en la línea *Atlcb2b*

*hp/Atlcb2a* (+). Sin embargo, la actividad de ATPasa en esta línea siguió siendo mayor que la de las plantas silvestres y la de las otras dos líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-), llegando a valores de 160 nmol Pi/min/mg (con o sin  $\beta$ -glucosidasa). Para comprobar si las diferencias determinadas eran significativas, se realizó el análisis estadístico de las actividades medidas con o sin  $\beta$ -glucosidasa en cada línea (ANOVA y la aplicación de la prueba de comparación de medias de Bonferroni), se encontró que las diferencias en los valores de hidrólisis de ATP determinados eran estadísticamente significativas.

Para poder visualizar comparativamente el efecto de la  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP en las líneas estudiadas, se expresó este aumento como la activación de la enzima por  $\beta$ -glucosidasa con respecto a la actividad determinada en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa en número de veces, como se muestra en la Figura 21B. Como podemos observar, el aumento de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de  $\beta$ -glucosidasa en la silvestre y en las otras dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-)) fue de 1.58 veces con respecto a su control respectivo (actividad de ATPasa de cada línea sin exposición a la  $\beta$ -glucosidasa), mientras que en la línea con menor contenido de esfingolípidos (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) no hubo una activación de la enzima en presencia de  $\beta$ -glucosidasa.



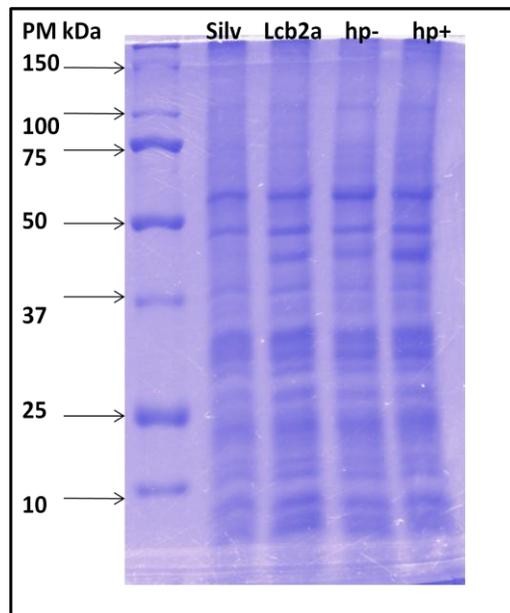


**Figura 21. Efecto de la  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.** Se realizó la exposición de las membranas a la  $\beta$ -glucosidasa simultáneamente a la actividad de hidrólisis de ATP (20 min a 29°C). Se utilizaron 4  $\mu$ g de proteína membranal para las plantas de genotipo silvestre y las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a* (-), y 2  $\mu$ g para la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/atlcb2a* (+). Se denota con un (-) a las plantas que no se asperjaron con el inductor metoxifenoizida y con un (+) a las que sí se asperjaron. A) Valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $H^+$   $\pm$  EE. Se realizaron como mínimo 3 repeticiones con tres réplicas cada una para cada línea usando por lo menos 3 preparaciones independientes. B) Los valores de la gráfica anterior fueron usados para expresar el aumento de la actividad por  $\beta$ -glucosidasa. La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces  $\pm$ EE con respecto a la actividad medida en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa de cada línea correspondiente. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5* aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni. Los valores promedio con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P = 0.01$ ).

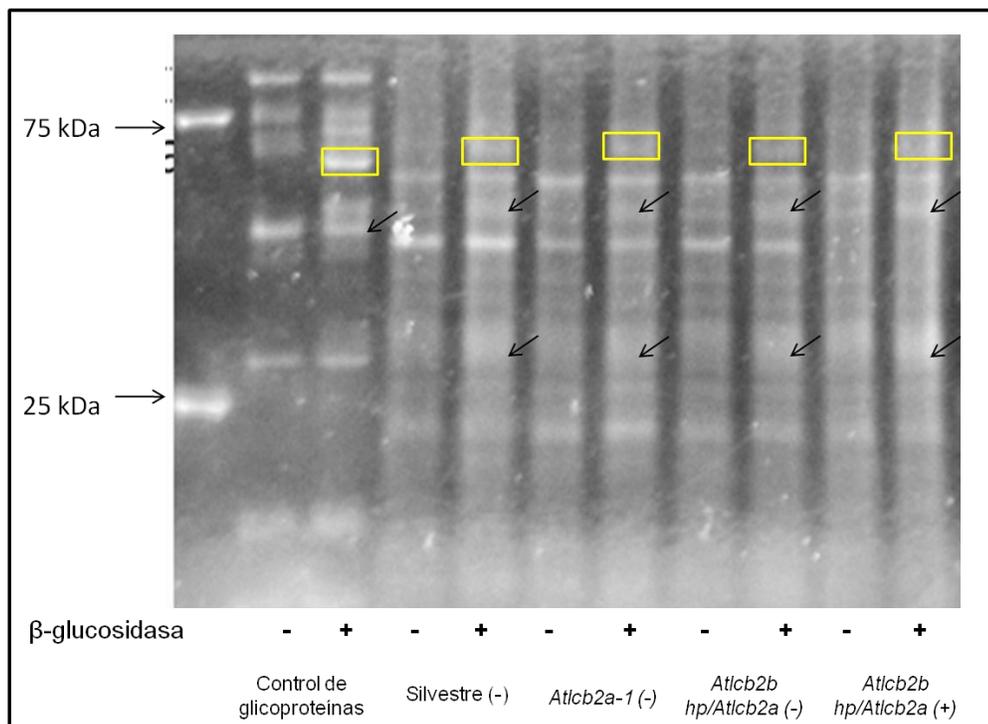
### 9. Detección de proteínas glicosiladas en vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

A continuación se investigó si el efecto observado en los experimentos en presencia de la  $\beta$ -glucosidasa sobre la actividad de la ATPasa se debía a su actividad de remover los carbohidratos unidos mediante un enlace  $\beta$  glucosídico, por medio del análisis del patrón de bandas de glicoproteínas de las vesículas de membrana plasmática de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción con metoxifenoizida después de ser tratadas con  $\beta$ -glucosidasa en las mismas condiciones experimentales usadas en la determinación del efecto de la  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de ATPasa. Las proteínas membranales se separaron por su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida-SDS y la posterior detección de glicoproteínas por tinción específica con un Kit comercial (Pro-Q® Emerald). En la Figura 22 se muestra que la cantidad de proteína cargada al gel de cada una de las líneas de *Arabidopsis*

fue similar. Como se muestra en la Figura 23, en el carril 2 que corresponde al control positivo, se observó que Pro-Q® Emerald tiñó preferencialmente proteínas glicosiladas, ya que las bandas con mayor intensidad correspondían a proteínas glicosiladas, correspondiente a la glucosa oxidasa (82 kDa), glicoproteína ácida-  $\alpha_1$  (42 kDa) y avidina (18 kDa). Sin embargo se observaron algunas bandas inespecíficas con menor intensidad. Por otra parte, el control positivo tratado con  $\beta$ -glucosidasa, mostró un cambio en la intensidad de algunas bandas, como es el caso de la banda de alrededor de 40 kDa, en la que se observó una disminución en presencia de  $\beta$ -glucosidasa. Además, se observó la aparición de una banda de alrededor de 65 kDa, que corresponde a la  $\beta$ -glucosidasa misma, ya que se ha reportado que es una glicoproteína homodimérica que consiste de 2 subunidades de 65 kDa [Grover y col., 1977]. Este mismo patrón se observó en las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana*, en las que hubo un cambio en el patrón de bandas en las muestras tratadas con  $\beta$ -glucosidasa comparadas con las muestras sin tratamiento, como se indica en las flechas de la Figura 23 y además de la presencia de la banda de alrededor de 65 kDa (correspondiente a la  $\beta$ -glucosidasa). Al realizar la tinción de proteínas totales de ese mismo gel por tinción de plata, se corroboró lo visto en la tinción de glicoproteínas, ya que hubo un cambio tanto en el patrón de bandas, como en la intensidad (Figura 24). Además, se observó que al teñir con plata, la banda de alrededor de 82 kDa no se distinguía en comparación con la banda teñida con Pro-Q® Emerald, en donde se observó una banda muy bien definida. Esto indicó que la tinción con el estuche para glicoproteínas fue muy sensible y efectiva para la detección de glicoproteínas. Los resultados obtenidos indicaron que la  $\beta$ -glucosidasa desplegó su actividad en las condiciones experimentales usadas para determinar su efecto en la actividad de ATPasa.

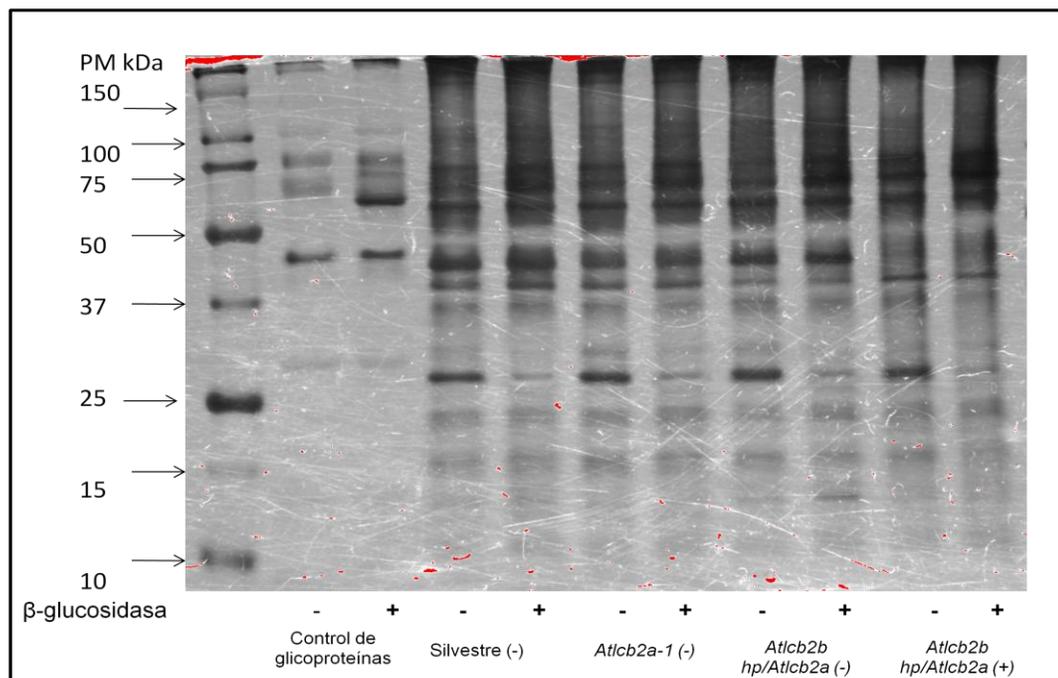


**Figura 22. Patrón electroforético de las proteínas asociadas a las preparaciones membranales de diferentes líneas *Arabidopsis thaliana*.** Se cargó en un gel de poliacrilamida-SDS lo equivalente a 10  $\mu$ g de proteína membranal para cada línea de *Arabidopsis thaliana* y 4  $\mu$ L del marcador de peso molecular (BioRad), después de la separación de las proteínas por electroforesis, se realizó la tinción de las proteínas con azul de Coomassie (azul brillante G 250). El carril (1) corresponde al marcador de peso molecular, (silv) es proteínas de plantas de genotipo silvestre, (Lcb2a) la línea *Atlcb2a-1*, (hp-) la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir y (hp+) la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con metoxifenozida. Los números colocados en la parte izquierda indican el peso molecular en kDa de cada banda (marcador de peso molecular).



**Figura 23. Detección de glicoproteínas en vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre, la línea *Atlcb2a-1* y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción.** Las vesículas de membrana

plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* fueron tratadas con  $\beta$ -glucosidasa en las mismas condiciones experimentales usadas en la determinación del efecto de la remoción de carbohidratos por  $\beta$ -glucosidasa sobre la actividad de ATPasa (ver Fig. 21). Enseguida, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS cargando lo equivalente a 10  $\mu$ g de proteína para cada línea y luego teñidas con el kit Emerald-Pro®. Las flechas indican cambios en el patrón de bandas y el recuadro amarillo la presencia de  $\beta$ -glucosidasa. En la parte inferior se denota con un (-) a las preparaciones membranales que no fueron tratadas con glucosidasa y con un (+) a las que sí se trataron.

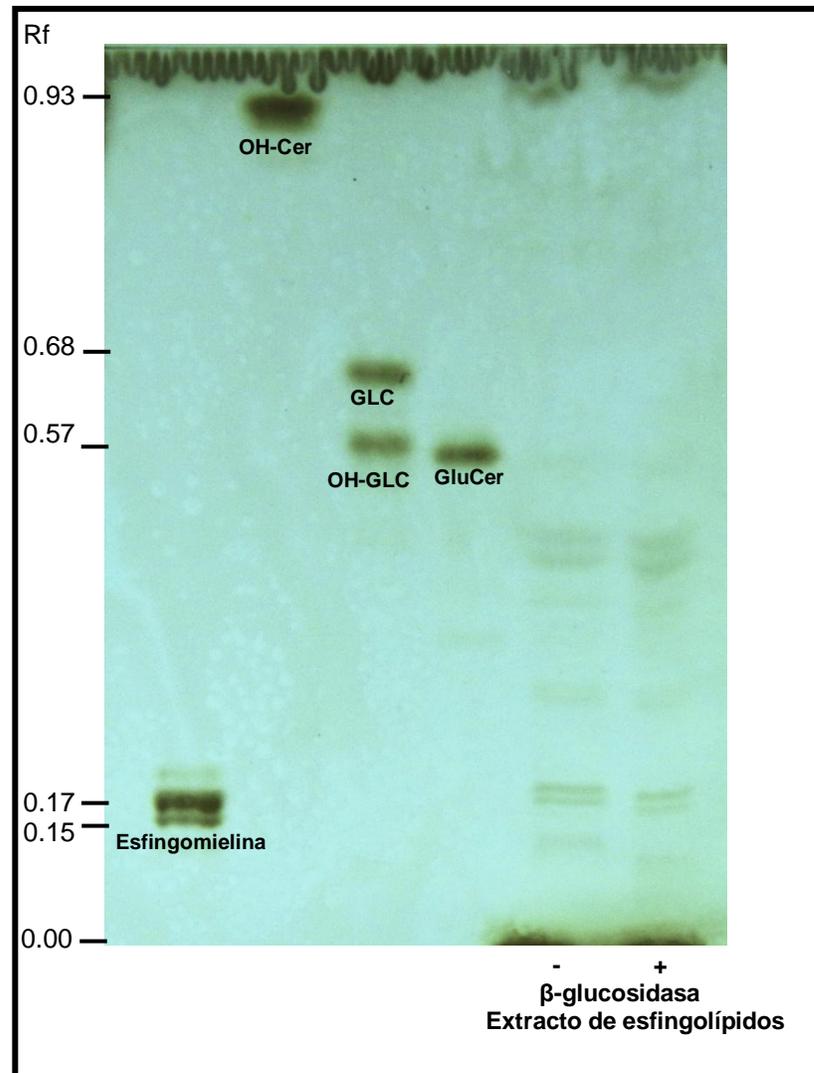


**Figura 24. Detección de proteínas totales en vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre, la línea *At1cb2a-1* y de la línea *At1cb2b hp/At1cb2a* con o sin inducción.** Las mismas muestras separadas para su tinción con el kit Emerald-Pro® (Figura 23), fueron separadas y teñidas con plata. Los números colocados en la parte izquierda indican el peso molecular en kDa de cada banda (marcador de peso molecular) y en la parte inferior se denota con un (-) a las preparaciones membranales que no fueron tratadas con  $\beta$ -glucosidasa y con un (+) a las que sí se trataron.

#### 10. Determinación de esfingolípidos glicosilados en vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de plantas del genotipo silvestre.

De acuerdo a los experimentos anteriores, los resultados indicaban que la  $\beta$ -glucosidasa estaba actuando sobre las vesículas membranales en las condiciones experimentales usadas y en las que se observaba un incremento en la actividad de ATPasa de las líneas controles. Con el objeto de relacionar esta activación con la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, a continuación se investigó si la  $\beta$ -glucosidasa estaba removiendo los carbohidratos de los esfingolípidos. Un experimento pertinente fue detectar los esfingolípidos glicosilados de las vesículas de membrana expuestas a la enzima y luego analizarlas por TLC (Thin Layer Chromatography). La

Figura 25 muestra una cromatoplaqueta revelada con sulfato de cobre, la cual muestra los estándares de esfingolípidos (esfingomielina, ceramida hidroxilada, galactosilceramida y glucosilceramida, respectivamente) separados en una fase móvil, así como el perfil de esfingolípidos del extracto obtenido de las vesículas membranales de plantas de *Arabidopsis* del genotipo silvestre con o sin exposición a la  $\beta$ -glucosidasa. En los primeros cuatro carriles que corresponden a los estándares de esfingolípidos, se observó una separación adecuada entre los esfingolípidos aniónicos (esfingomielina, carril 1) y los esfingolípidos neutros (galactosilceramida y glucosilceramida, carriles 3 y 4 respectivamente), así como los esfingolípidos complejos de las ceramidas hidroxiladas (carril 2). Además se logró resolver a la galactosilceramida hidroxilada de la no hidroxilada con un  $r_f$  de 0.57 y 0.68, respectivamente, lo que indica que la fase móvil utilizada permitió la separación y resolución de los esfingolípidos neutros. Con respecto a los extractos (carriles 5 y 6), las bandas con  $r_f$  de 0.17 y 0.15 que corresponden a la esfingomielina, que se usó como estándar interno del proceso de extracción, fueron de tamaños e intensidades similares entre los dos extractos, lo que indicó que se obtuvo una recuperación similar de esfingolípidos extraídos a partir de vesículas membranales con o sin exposición a  $\beta$ -glucosidasa. Este mismo comportamiento se observó en todo el perfil de esfingolípidos, no hubo cambios muy aparentes en la intensidad de las bandas en la muestra tratada con  $\beta$ -glucosidasa comparada con la muestra sin tratamiento, indicando que la remoción de carbohidratos de los esfingolípidos por la acción de glucosidasa sobre las vesículas membranales no se logró diferenciar claramente en este sistema. Es posible que esto se deba a la gran variedad de especies de esfingolípidos en las plantas, mismas que pueden estar en cantidades muy bajas y no detectables por el método, aunque sean selectivamente desglucosiladas.



**Figura 25. Detección de esfingolípidos glicosilados en vesículas de membrana plasmática de plantas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre.** Las vesículas de membrana plasmática de la línea silvestre fueron tratadas con  $\beta$ -glucosidasa en las mismas condiciones experimentales usadas en la determinación del efecto de la remoción de carbohidratos por  $\beta$ -glucosidasa sobre la actividad de ATPasa (ver Fig. 12). Enseguida, se extrajeron los esfingolípidos de acuerdo a Markham y Jaworski (2007) y posteriormente el extracto fue analizado por TLC. El primer carril corresponde al estándar interno de la extracción (esfingomielina), (OH-Cer) es el estándar ceramida hidroxilada, (OH-GLC y GLC) el estándar de galactosilceramida con o sin hidroxilaciones respectivamente, (GluCer) el estándar de glucosilceramida y los dos últimos carriles corresponde al extracto de esfingolípidos con o sin exposición a  $\beta$ -glucosidasa. En la parte inferior se denota con un (-) a las preparaciones membranales que no fueron tratadas con glucosidasa y con un (+) a las que sí se trataron. La cromatoplaca mostrada es una representativa de 6 repeticiones.

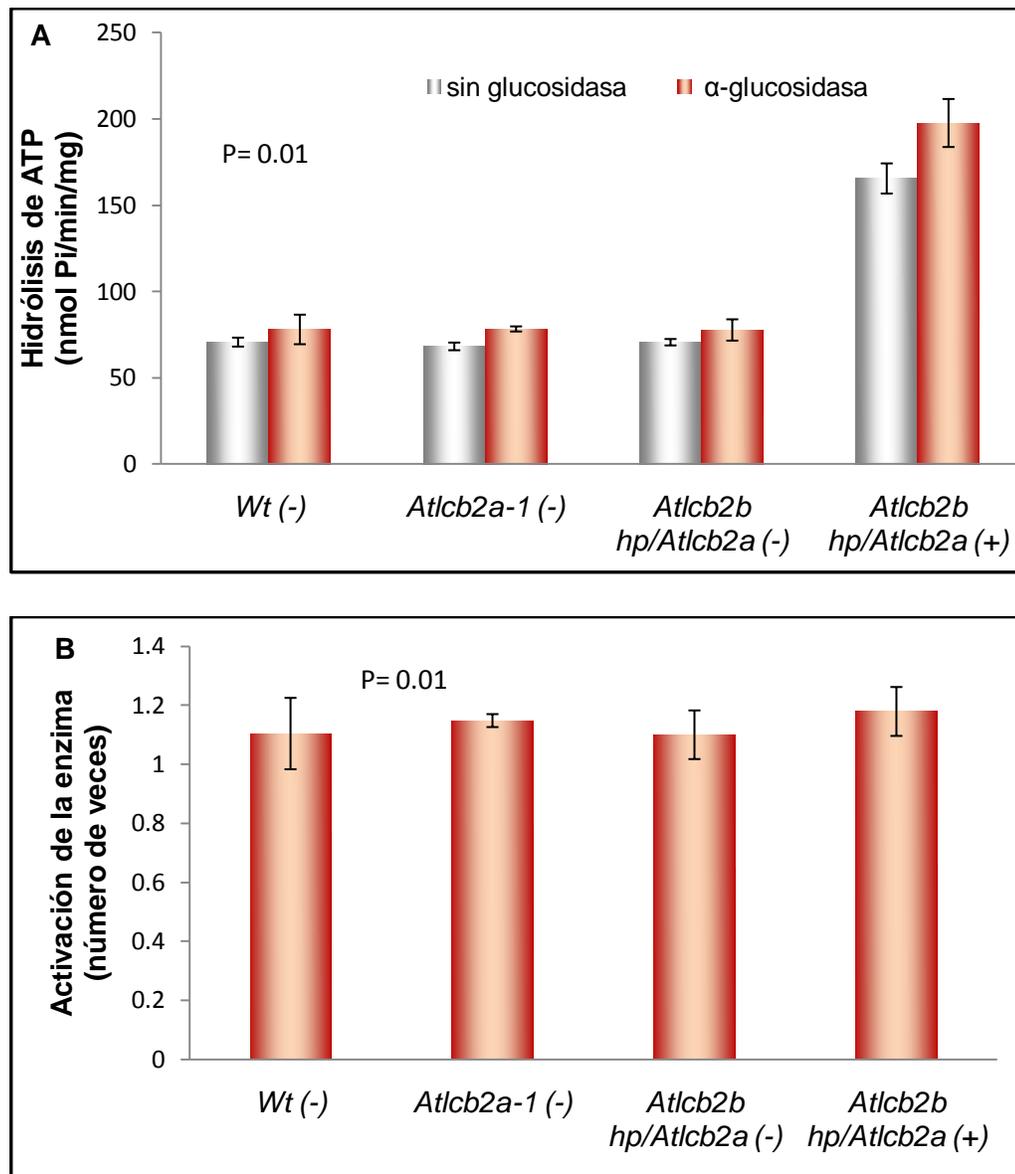
## 11. Validación de los experimentos de la remoción de carbohidratos de las vesículas de membrana plasmática por la $\beta$ -glucosidasa.

Para asegurarnos de que en los experimentos con  $\beta$ -glucosidasa el tipo de enlace  $\beta$ -glucosídico era el catalizado por la glucosidasa, ya que este es el tipo de unión que tienen los carbohidratos unidos a la parte hidrofóbica de los esfingolípidos (ceramida) y para así asegurar que el rompimiento de este enlace y la liberación del carbohidrato de la parte polar de los esfingolípidos podía estar asociado al efecto sobre la actividad de la enzima en las membranas, se realizaron estudios con otras dos glicosidasas que reconocen diferente tipo de enlace glucosídico ( $\alpha$ -glucosidasa) o diferente tipo de carbohidrato ( $\beta$ -galactosidasa).

En la Figura 26A se muestra el comportamiento de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $H^+$  en vesículas de membrana plasmática del tipo silvestre y de las dos líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción con metoxifenoazida, en presencia de  $\alpha$ -glucosidasa en las mismas condiciones usadas en los experimentos con  $\beta$ -glucosidasa. Como se observa en la Figura 26A, tanto en las vesículas de membrana plasmática del tipo silvestre como en las otras dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-)), no hubo un aumento significativo en la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de  $\alpha$ -glucosidasa con respecto a la actividad determinada en ausencia de glucosidasa, obteniéndose valores de 78 nmol Pi/min/mg en presencia de la  $\alpha$ -glucosidasa, mientras que en ausencia de glucosidasa, la actividad fue de alrededor de 70 nmol Pi/min/mg. En el caso de la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) se observó que hubo un ligero aumento en la actividad medida en presencia de  $\alpha$ -glucosidasa con respecto a la actividad en ausencia de glucosidasa, llegando a valores de 197 nmol Pi/min/mg, mientras que en ausencia de  $\alpha$ -glucosidasa, la actividad determinada fue de alrededor 165 nmol Pi/min/mg. Para comprobar si las diferencias determinadas eran significativas, se realizó el análisis estadístico de las actividades con o sin  $\alpha$ -glucosidasa en cada línea (ANOVA y aplicación de la prueba de comparación de medias de Bonferroni), se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de hidrólisis de ATP medidos, tanto en las líneas control (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-)) como en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+).

Para comparar el efecto de la  $\alpha$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP en cada una de las líneas, se determinó la actividad medida en presencia de  $\alpha$ -glucosidasa de cada línea con respecto a la actividad sin glucosidasa de cada una de ellas, expresado en términos de activación de la enzima en número de veces. Como se muestra en la Figura 26B, el aumento de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de  $\alpha$ -glucosidasa en la línea silvestre y en las

otras dos líneas control fue de 1.10 veces con respecto a la actividad sin glucosidasa de cada línea respectiva, mientras que en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a*) fue de 1.18 veces. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este aumento no resultó estadísticamente significativo.

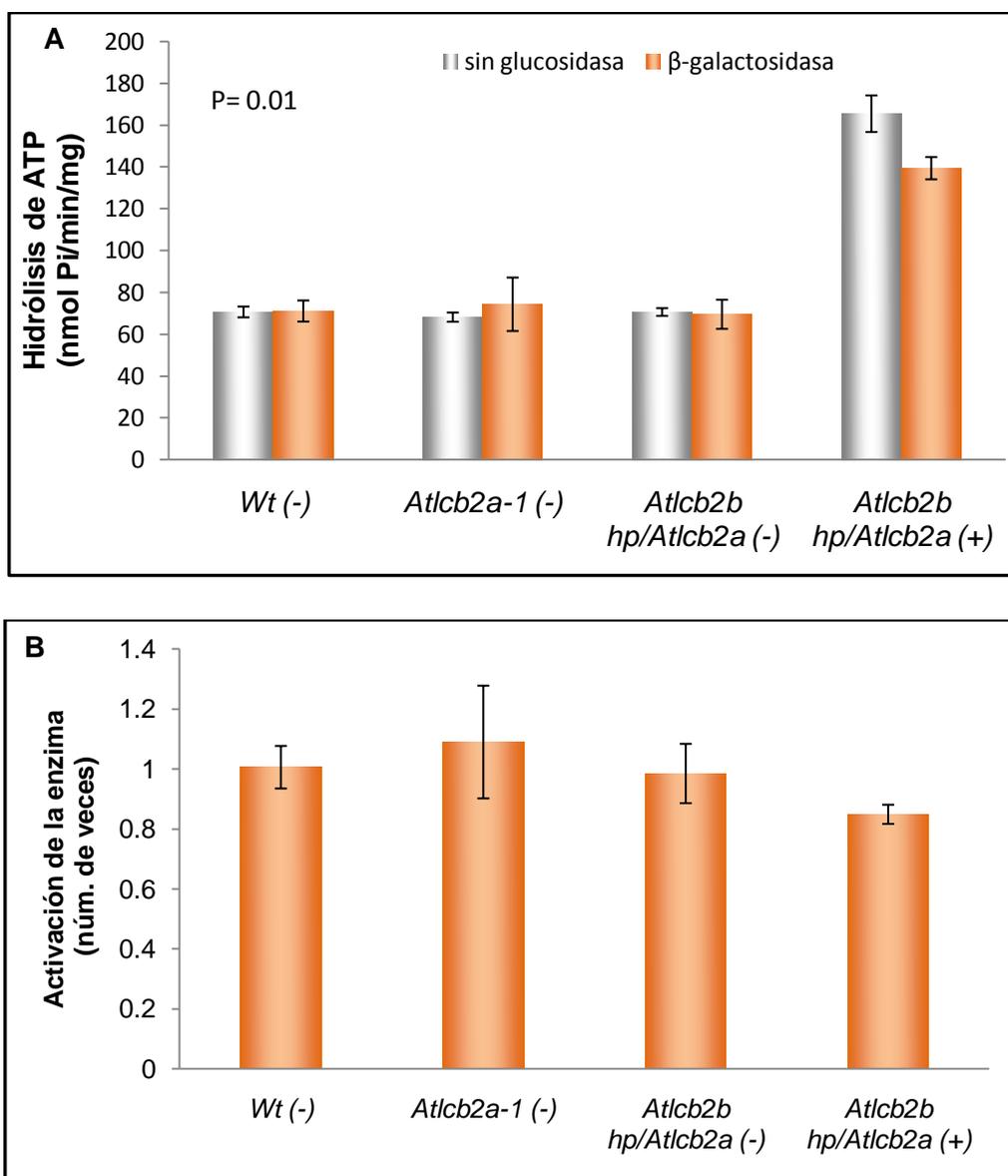


**Figura 26.** Efecto de la  $\alpha$ -glucosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de *A. thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a*. Se expusieron las preparaciones membranales a la acción de la  $\alpha$ -glucosidasa en las mismas condiciones empleadas en los experimentos con  $\beta$ -glucosidasa. Se utilizaron 4  $\mu$ g de proteína membranal para las plantas de genotipo silvestre y las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a* (-), y 2  $\mu$ g para la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/atlcb2a* (+). Se denota con un (-) a las plantas que no se asperjaron con el inductor metoxifenozida y con un (+) a las que sí se asperjaron. A) Valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $H^+$   $\pm$  EE. Se realizaron como mínimo 2 repeticiones con tres réplicas cada una para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. B) Los valores de la gráfica anterior fueron usados para expresar el cambio de la

actividad por  $\alpha$ -glucosidasa. La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces  $\pm$  EE con respecto a la actividad medida en ausencia de  $\alpha$ -glucosidasa de cada línea correspondiente. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5*, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

En los estudios con la otra glicosidasa que reconoce diferente tipo de carbohidrato ( $\beta$ -galactosidasa) (Figura 27A), se observó que al determinar la actividad de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de tipo silvestre y en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción, en presencia de  $\beta$ -galactosidasa, se obtuvo un comportamiento similar a los experimentos realizados con  $\alpha$ -glucosidasa, es decir, no hubo una estimulación de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática por  $\beta$ -galactosidasa, obteniéndose valores de alrededor de 72 nmol Pi/min/mg con o sin  $\beta$ -galactosidasa tanto en la silvestre como en las otras dos líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-). Mientras que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) (menor contenido de esfingolípidos totales), se observó que hubo una ligera disminución de la actividad de la enzima, llegando a valores de 140 nmol Pi/min/mg, mientras que la actividad en ausencia de glucosidasa fue alrededor de 165 nmol Pi/min/mg. Al realizar el análisis estadístico (ANOVA) se estableció que esta disminución de la actividad en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, no era estadísticamente significativo.

Estos resultados, expresados en términos de activación de la enzima en número de veces, se muestran en la Figura 27B. Se observó claramente que no hubo una activación de la enzima en presencia de  $\beta$ -galactosidasa en la línea silvestre y en las otras dos líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-). Este mismo comportamiento se observó en la línea con menor contenido de esfingolípidos *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Los resultados obtenidos indicaron que la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en las condiciones experimentales usadas en la determinación del efecto de la  $\beta$ -glucosidasa en la actividad de ATPasa fue específica para romper los enlaces tipo  $\beta$  glucosídicos presentes en las preparaciones membranales de las líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas en este estudio.

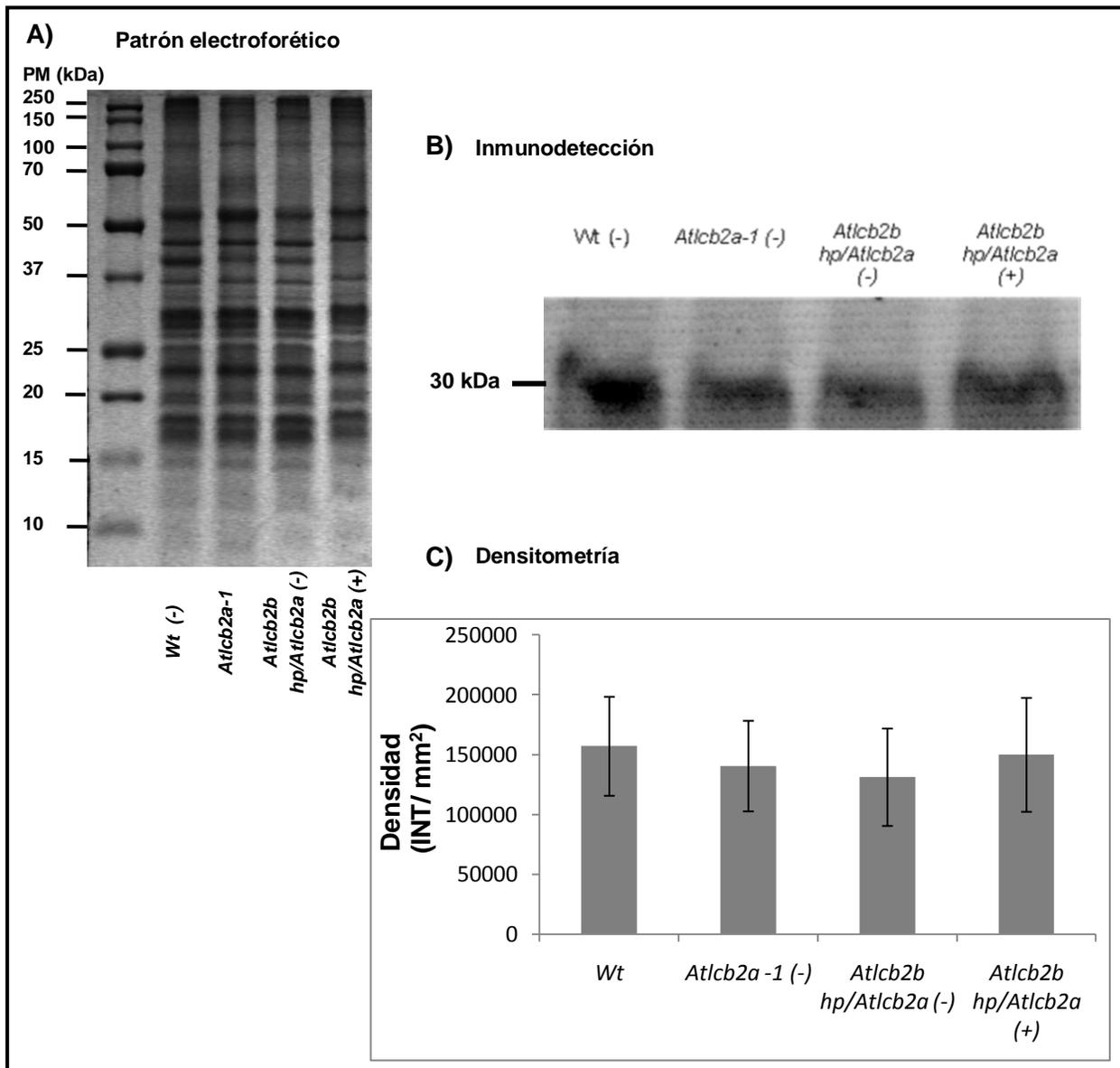


**Figura 27. Efecto de la  $\beta$ -galactosidasa en la actividad de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a*.** Se expuso a las preparaciones membranales a la  $\beta$ -galactosidasa a las mismas condiciones empleadas en los experimentos con  $\beta$ -glucosidasa. Se utilizaron 4  $\mu$ g de proteína membranal para las plantas de genotipo silvestre y las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/atlcb2a* (-), y 2  $\mu$ g para la línea con menor contenido de esfingolípidos totales *Atlcb2b hp/atlcb2a* (+). Se denota con un (-) a las plantas que no se asperjaron con el inductor metoxifenozida y con un (+) a las que sí se asperjaron. (A) Valores promedio de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $H^+$   $\pm$  EE. Se realizaron como mínimo 2 repeticiones con tres réplicas cada una para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. B) Los valores de la gráfica anterior fueron usados para expresar el aumento de la actividad por  $\beta$ -galactosidasa. La gráfica muestra los valores promedio de la activación de la enzima en número de veces  $\pm$ EE con respecto a la actividad medida en ausencia de  $\beta$ -galactosidasa de cada línea correspondiente. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5*, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

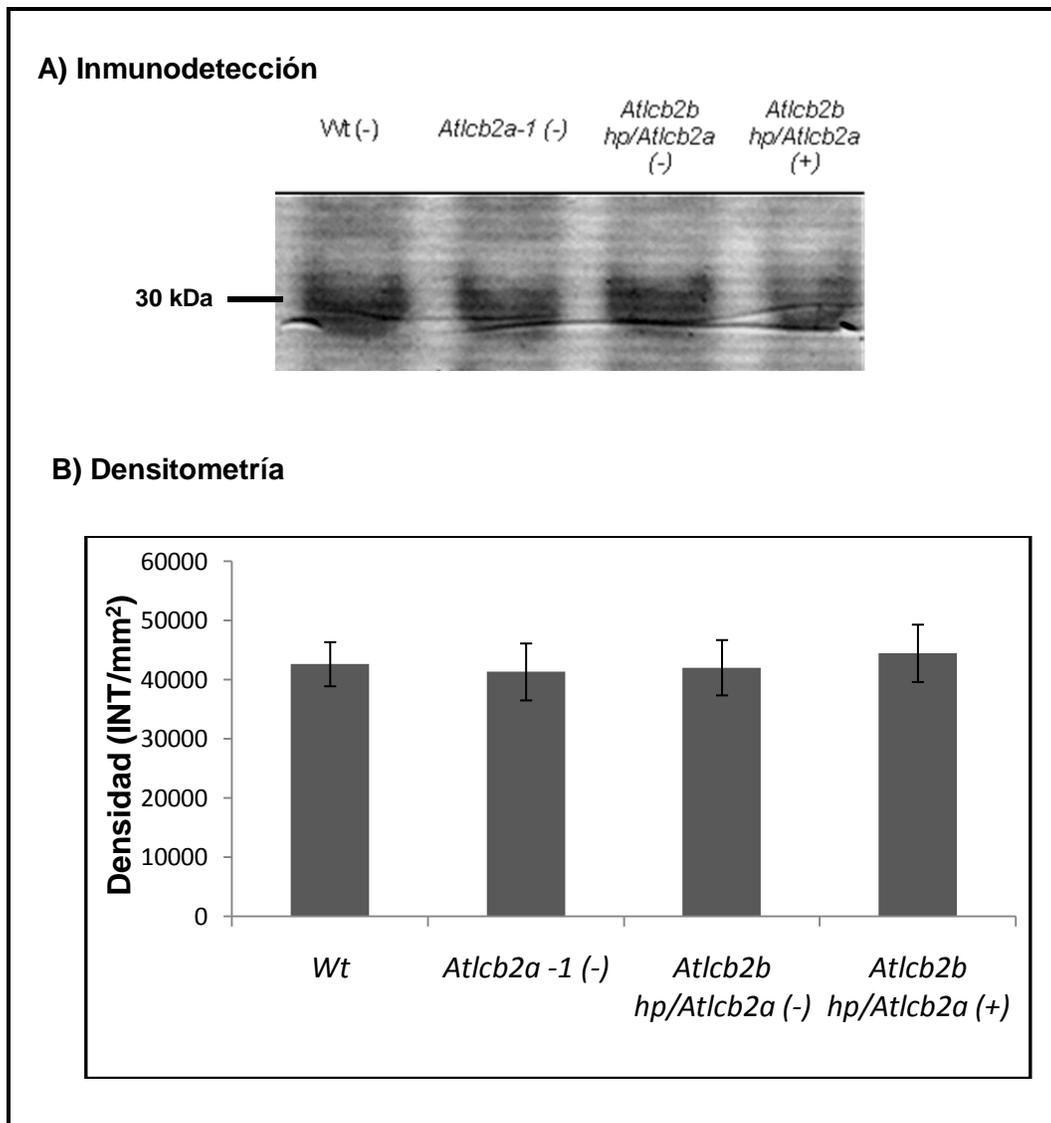
## 12. Niveles de la proteína 14-3-3 en las vesículas membranales de plantas silvestre y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción.

Se ha reportado que una de las principales formas de regulación de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas, es la que implica la interacción de la proteína 14-3-3 con la región del C-terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Para averiguar si la proteína reguladora 14-3-3, está involucrada en el mecanismo de aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática mediada por cambios específicos de esfingolípidos complejos en membrana plasmática, fue necesario estimar si los niveles de esta proteína reguladora variaban en las preparaciones membranales, mediante la detección con anticuerpos anti 14-3-3 (un anticuerpo heterólogo anti 14-3-3 de la isoforma  $\beta$  de humano y un anticuerpo homólogo anti 14-3-3 de *Arabidopsis*).

En la Figura 28A, se muestra el patrón electroforético de las proteínas de cada una de las líneas de *Arabidopsis*, en el se observa que la cantidad de proteína cargada al gel de cada una de las líneas fue similar. En la Figura 28B, se presenta la inmunoréplica contra la proteína 14-3-3 usando el anticuerpo heterólogo anti 14-3-3 de la isoforma  $\beta$  de humano, pudiéndose apreciar la detección de una banda con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, que corresponde al peso promedio reportado de para la proteína reguladora 14-3-3 [Fu y col., 2000; Morsomme y Boutry, 2000]. Como se puede observar en la inmunoréplica, la intensidad de la banda fue muy similar en todas las líneas. Para confirmar esta observación, se realizó la determinación de la densitometría de la banda de 30 kDa de las seis inmunorélicas de cada línea (Figura 28C), en la cual se observaron valores muy similares entre todas las líneas usadas en este trabajo. Este mismo comportamiento se observó usando el anticuerpo homólogo anti 14-3-3 de *Arabidopsis*, encontrándose que los niveles de la proteína 14-3-3 fueron muy similares en todas las líneas usadas en este trabajo (Figura 29A y B). Sin embargo, en el caso del anticuerpo homólogo se logró apreciar una banda más gruesa en todas las líneas, comparada con la de las inmunorélicas con el anticuerpo heterólogo, indicando que el anticuerpo homólogo de *Arabidopsis* logró detectar más de dos isoformas de la proteína 14-3-3 de *Arabidopsis* y que se encontraban presentes en las preparaciones membranales (Figura 29A). Este resultado indica que la proteína 14-3-3 no pudiera estar involucrada en el aumento de la actividad de la ATPasa observado en las plantas con una disminución de esfingolípidos totales.



**Figura 28. Detección de la proteína 14-3-3 en las preparaciones membranales con anticuerpo anti 14-3-3 de la isoforma  $\beta$  de humano.** A) Se cargó en un gel de poliacrilamida-SDS lo equivalente a 10  $\mu$ g de proteína membranal para cada línea de *Arabidopsis thaliana* y 4  $\mu$ L del marcador de peso molecular (BioRad); después de la separación de las proteínas por electroforesis, se realizó la tinción de proteínas con azul de Coomassie. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, en los siguientes carriles en la parte inferior se indica el tipo de muestra que se cargó en cada carril. Los números colocados en la parte izquierda indican el peso molecular en kDa de cada banda del marcador de peso molecular. B) Se cargaron 40  $\mu$ g de proteína membranal por carril, las proteínas fueron separadas en gels de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas PVDF, realizándose la inmunodetección de la proteína 14-3-3 con el anticuerpo heterólogo anti 14-3-3 de la isoforma  $\beta$  de humano (Santa Cruz Biotechnology). Experimento representativo de 6 inmunoréplicas realizadas con 2 preparaciones independientes de cada línea. C) Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la 14-3-3 y mediante el programa *Quantity One* de BioRad se realizó la determinación de la densitometría de la banda de 30 kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad en INT/mm<sup>2</sup>  $\pm$  EE, obtenidos para cada línea.



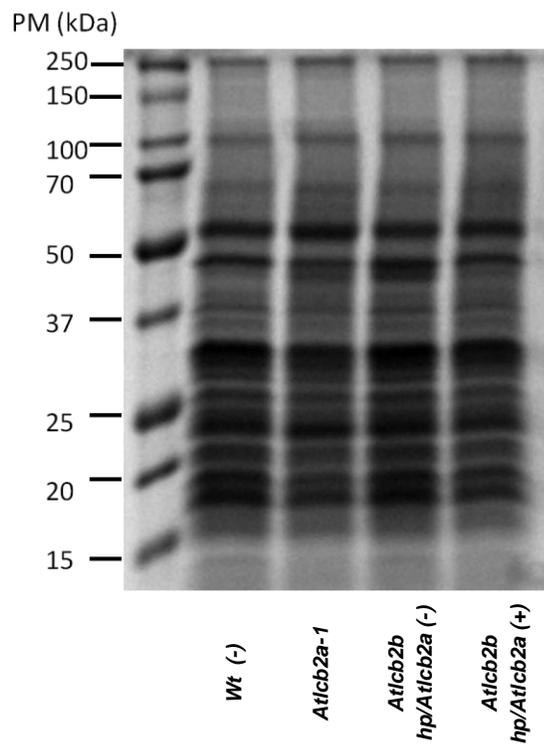
**Figura 29. Detección de la proteína 14-3-3 en las preparaciones membranales con anticuerpo anti 14-3-3 de *Arabidopsis*.** Se cargaron 40  $\mu\text{g}$  de proteína membranal por carril, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas PVDF. A) Inmunodetección de la proteína 14-3-3 con el anticuerpo homólogo anti 14-3-3 de *Arabidopsis* (Santa Cruz Biotechnology). Experimento representativo de 4 inmunoréplicas realizadas con 2 preparaciones independientes de cada línea. B) Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la 14-3-3 y mediante el programa *Quantity One* de BioRad se realizó la determinación de la densitometría de la banda de 30 kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad en  $\text{INT}/\text{mm}^2 \pm \text{EE}$ , obtenidos para cada línea.

### 13. Niveles de la ATPasa fosforilada en las vesículas membranales de plantas silvestre y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción.

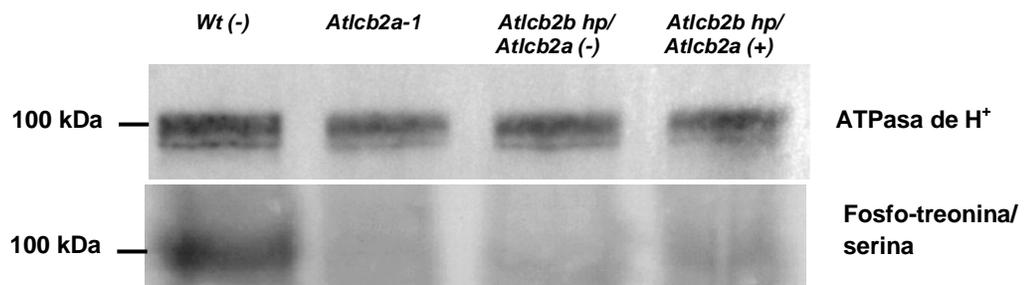
Para asegurarnos de que el aumento de actividad de la ATPasa mediado por los esfingolípidos, no involucraba la interacción de la proteína reguladora 14-3-3 con la región del carboxilo terminal, se realizó un segundo estudio que fue la estimación de la ATPasa fosforilada de las preparaciones membranales, mediante la detección con un anticuerpo anti fosfotreonina/fosfoserina, ya que la actividad de la ATPasa se restablece o aumenta cuando hay una fosforilación por una cinasa de treonina/serina en el aminoácido Thr948 [Olsson y col, 1998]. La fosforilación es la señal para que la proteína 14-3-3 se una al carboxilo terminal, aumentando la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>.

Con el objetivo de comprobar que se está cargando la misma cantidad de proteína en todos los carriles, se realizó el patrón electroforético de las líneas de Arabidopsis como se indica en la Figura 30A, en el cual se observa que la cantidad de proteína cargada al gel de cada una de las líneas de Arabidopsis fue similar. En la Figura 30B, en la parte superior se presenta la inmunoréplica contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática usando un anticuerpo anti ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, en ésta se observó que los niveles de la proteína fueron muy similares en todas las líneas de Arabidopsis. En la parte inferior de la Figura 30B se presenta la inmunoréplica contra la ATPasa fosforilada usando el anticuerpo anti fosfo-treonina/serina, pudiéndose apreciar la aparición de una banda con un peso molecular de aproximadamente de 100 kDa, que corresponde al peso promedio reportado para la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. En la inmunoréplica se observó que los niveles de la proteína fosforilada fueron menores en las líneas mutantes (*Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin inducción) comparadas con los de la línea silvestre. Para confirmar estas apreciaciones, se realizó la determinación de la densitometría de la banda de 100 kDa de las seis inmunorélicas de cada línea (Figura 30C), en el caso de las inmunorélicas contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, se observaron valores muy similares entre todas las líneas de Arabidopsis, mientras que la densimetría de la banda de 100 kDa de las inmunorélicas usando el anticuerpo anti fosfo-treonina/serina, se observó que los valores en la línea silvestre fueron mayores comparados con los valores de las 3 líneas mutantes usadas en este trabajo. Este resultado indica que el aumento de actividad de la ATPasa en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales no se debe a la fosforilación de la enzima en la Thr948.

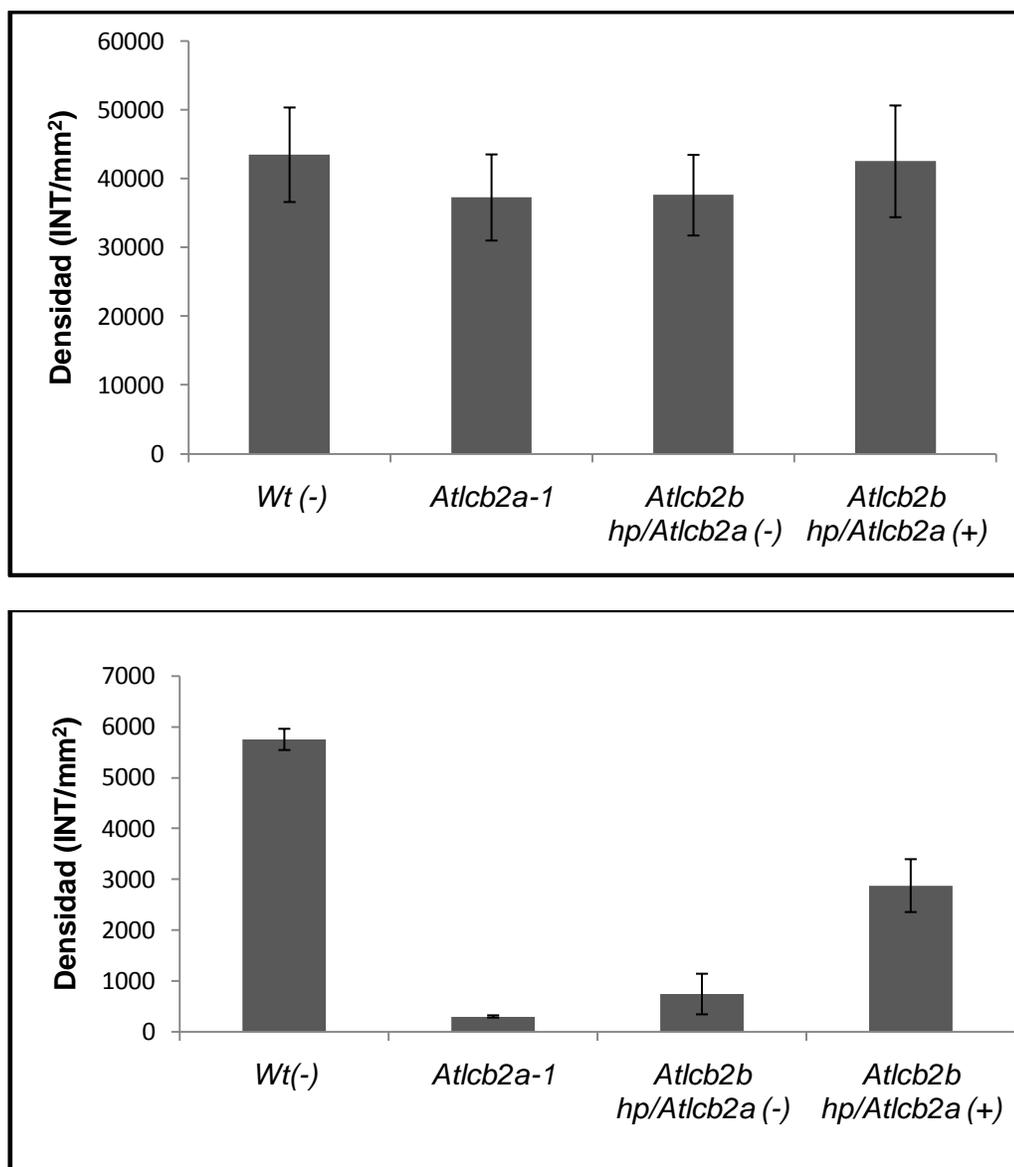
A) Patrón electroforético



B) Inmunodetección



C) Densitometría



**Figura 30. Detección de los niveles de la ATPasa fosforilada en las preparaciones membranales con anticuerpo anti fosfo-treonina/serina.** A) Se cargó en un gel de poliacrilamida-SDS lo equivalente a 10 µg de proteína membranal para cada línea de *Arabidopsis thaliana* y 4 µL del marcador de peso molecular (BioRad), después de la separación de las proteínas por electroforesis, se realizó la tinción de proteínas con azul de Coomassie (Azul brillante G 250). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, en los siguientes carriles, en la parte inferior se indica el tipo de muestra que se cargó en cada carril. Los números colocados en la parte izquierda indican el peso molecular en kDa de cada banda (marcador de peso molecular). B) Se cargaron 40 µg de proteína membranal por carril, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas PVDF y se realizó la inmunodetección de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y de la ATPasa fosforilada con el anticuerpo contra la ATPasa de H<sup>+</sup> de *Agrisera* y el anticuerpo fosfo-treonina/serina de Abcam®, respectivamente. Experimento representativo de 6 inmunoréplicas realizadas con 3 preparaciones independientes de cada línea. C) Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la ATPasa de H<sup>+</sup> y de la fosfo-treonina/serina, y mediante el programa *Quantity One* de BioRad se realizó la determinación de la densitometría de la banda de 100 kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad en INT/mm<sup>2</sup> ± EE, obtenidos para cada línea.

---

## DISCUSIÓN

La ATPasa H<sup>+</sup> es una proteína integral de la membrana plasmática, cuya actividad puede ser afectada por los lípidos que la rodean. Al respecto, existen reportes que indican que diferentes glicerolípidos y esteroides membranales, así como detergentes, modifican positiva o negativamente la actividad de la ATPasa de plantas [Brauer y Tu 1989; Cooke y col., 1994; Gomes y col., 1996; Grandmougin-Ferjani y col., 1997]. En cuanto a los esfingolípidos, otro grupo de lípidos de membrana que se ha reportado que componen > 40% de los lípidos de la membrana plasmática en plantas [Sperling y col., 2005], solo existe un reporte en levadura acerca del requerimiento de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena muy larga para el tránsito de la ATPasa de H<sup>+</sup> desde el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática [Gaigg y col., 2006; Toulmay y Schneiter, 2007]. Por otra parte, varios reportes ubican consistentemente a la ATPasa de H<sup>+</sup> de diversos tejidos vegetales en balsas lipídicas, las cuales están enriquecidas en esfingolípidos y esteroides [Mongrand y col., 2004; Borner y col., 2005; Morel y col., 2006; Lefebvre y col., 2007]. Sin embargo, hasta el momento no hay ningún trabajo que indique que la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas requiera de esfingolípidos para su función, o cómo este tipo de lípidos pueda afectar su actividad.

Estudios en nuestro laboratorio en la línea mutante silenciable *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* que tiene un contenido 36% menor de esfingolípidos totales después de ser expuesta al inductor metoxifenoizida, nos sugerían que el contenido de esfingolípidos basales endógenos en una planta silvestre mantiene a la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en unos niveles de actividad moderados aún cuando la enzima era capaz de tener actividades de por lo menos el doble [Mejía-Hernández, 2010; González-Reyes, 2010; Cornejo-Granados, 2011; Morales-Cedillo, 2012]. Este mismo efecto se ha observado en la cepa *lcb1-100* de *S. cerevisiae*, la cual es defectuosa en la síntesis de bases esfingoideas y en la que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> (Pma1) es mayor que la de la cepa progenitora [Permyakov y col., 2012]. En ese trabajo, el efecto encontrado se ha relacionado con el estado oligomérico de la enzima y con su activación por la glucosa. En la levadura, esta activación está relacionada con la región auto-regulatoria del carboxilo terminal de la enzima.

El aumento encontrado en la actividad de la ATPasa en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) de *Arabidopsis* por nuestro grupo, podía ser el reflejo de un cambio en la estructura de la enzima, en particular a través de cambios en la interacción de su región del carboxilo terminal con su entorno, lo cual a su vez sería inducido por una alteración en la composición de los esfingolípidos membranales [Morales-Cedillo, 2012]. En efecto, la implicación de la región del extremo carboxilo terminal fue identificada gracias a la mutante que tenía una deficiencia en

esfingolípidos totales en la planta [Morales-Cedillo, 2012]. Sin embargo, aún era necesario establecer que eran los esfingolípidos membranales los responsables, y cuáles eran las posibles especies de esfingolípidos y sus regiones químicas específicas involucradas en la interacción con la región del carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup>. Por ello, este trabajo se enfocó en identificar las especies de esfingolípidos de la membrana plasmática y sus regiones químicas responsables del efecto en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en *Arabidopsis*.

#### **14. Especies de esfingolípidos que tienen un papel importante en la interacción con la ATPasa de H<sup>+</sup>.**

Una manera de identificar las especies de esfingolípidos importantes en la actividad de la ATPasa, fue mediante la determinación de la composición y cuantificación de los esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de las plantas del genotipo silvestre y de las dos líneas de *Arabidopsis thaliana* en las condiciones de inducción y no inducción utilizadas en este trabajo, usando un protocolo que incluía la extracción selectiva de esfingolípidos y su separación e identificación por HPLC en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS [Markham y col., 2006]. Como fue descrito por Dietrich y col. (2008), la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* muestra una disminución del 36% en las BCL totales (suma de BCL libres y de BCL unidas a ceramidas o esfingolípidos complejos) después de ser expuesta al inductor metoxifenoazida. Este contenido de BCL fue determinado a partir de una preparación de plantas adultas completas a las cuales se les realizó una extracción selectiva y optimizada de esfingolípidos complejos [Markham y col., 2006] y a las que se les hizo una hidrólisis alcalina drástica para liberar las BCL (cuya estequiometría es 1 mol de la base por mol de ceramida o esfingolípidos complejo). Como se mencionó, esta extracción se hizo de las plantas completas, por lo que no se estableció cual era la disminución de la esfingolípidos complejos en las membranas celulares y menos en la membrana plasmática, si bien, por su naturaleza anfipática, era presumible que casi la totalidad de los esfingolípidos complejos deben estar formando parte de las membranas celulares. Hasta la fecha, la información de la distribución sub-celular de los esfingolípidos en las plantas no existe en la literatura. Por ello, los datos encontrados en esta tesis tanto en vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres como de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a ±* metoxifenoazida resultan ser el primer reporte detallado de la composición y cuantificación de esfingolípidos de la membrana plasmática. En este estudio, el análisis esfingolipidómico indicó un aumento en la cantidad de esfingolípidos totales en las vesículas de membrana plasmática purificadas de las líneas mutantes (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b*

*hp/Atlcb2a* ± metoxifenoza) de *Arabidopsis thaliana* comparada con la de las membranas de plantas silvestres. Esto fue un hallazgo inesperado, ya que al comparar este contenido de los esfingolípidos totales de la membrana plasmática con el contenido total de esfingolípidos de toda la planta en cada una de las líneas de *Arabidopsis*, antes determinado por Dietrich y col. (2008), no había correlación, ya que si bien el contenido total de esfingolípidos en toda la planta es igual en la línea silvestre y en las otras dos líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (sin inducir), en la membrana plasmática de estas líneas no fue el mismo, ya que las mutantes presentaron un contenido mayor con respecto a la silvestre (ver tabla de la Figura 31). La única diferencia genética entre la línea silvestre y las líneas mutantes *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir, es que las dos líneas mutantes solo pueden tener la versión del heterodímero LCB1/LCB2b de la SPT (serina palmitoiltransferasa), mientras que las plantas silvestres tienen ambas versiones LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b. Se ha determinado que el RNAm del gene de la subunidad LCB2a se transcribe con mayor frecuencia que el de la LCB2b [Dietrich y col., 2008]. Quizás esto origine un desbalance cualitativo en la síntesis de bases de cadena larga, que podría ser detectado por la célula, la cual, al tratar de asegurar el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática, la refuerza aumentando el contenido de esfingolípidos totales. Recientemente se han reportado mecanismos de regulación de la SPT que involucran la interacción de proteínas con esta enzima y que pueden regular cuantitativamente la síntesis de esfingolípidos [Liu y col., 2012; Kimberlin y col., 2013]. Con base en esto y en la función de los esfingolípidos, es probable que un descenso en la síntesis de esfingolípidos en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) tenga un impacto en el tráfico de endomembranas y en las posibles funciones reguladoras de los esfingolípidos en los procesos celulares básicos, lo cual pone de manifiesto la relevancia que tiene la síntesis de esfingolípidos en la homeostasis celular.

Si bien el contenido de esfingolípidos totales en la membrana plasmática era más alto en las tres líneas mutantes (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2* ± metoxifenoza) con respecto a la silvestre, era posible que hubiera diferencias en la composición de especies moleculares de esfingolípidos individuales y que estas diferencias explicaran los distintos valores de la actividad de ATPasa entre la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) y las líneas controles (la silvestre, la *Atlcb2a-1* y la *Atlcb2b hp/Atlcb2* (-)) (ver tabla de la Figura 31). Por ello se procedió a hacer el análisis del esfingolipidoma de las membranas plasmáticas de estas líneas.

Los esfingolípidos son moléculas estructuralmente diversas, tan solo en hojas de *Arabidopsis* se han encontrado 168 especies diferentes [Markham y Jaworski. 2007]. Estas moléculas pueden diferir en la composición de su grupo polar, la longitud de la cadena acílica, el grado de hidroxilación, y número y posición del doble enlace, tanto de la BCL como de su ácido graso. De acuerdo al grupo polar de los esfingolípidos, las dos clases mayoritarias de

esfingolípidos complejos en plantas son las glucosilceramidas y los glicosil-inositolfosforilceramidas (GIPC) [Sperling y col., 2005; Markham y col., 2006, Buré y col., 2011]. Los resultados del análisis de la esfingolipidómica de la membrana plasmática, revelaron que el contenido de esfingolípidos totales en las membranas de plantas mutantes tienen como componentes principales a los GIPCs totales. Indicando que este tipo de esfingolípidos pueden contribuir a la estabilidad e integridad de la membrana plasmática, lo cual explicaría en parte su abundancia en las plantas [Markham y col., 2006; Markham and Jaworski, 2007; Buré y col. 2011]. Al hacer el análisis exhaustivo de glucosilceramidas y GIPCs en nuestras preparaciones, se encontró que la línea con mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) tenía algunos cambios en ciertas especies de esfingolípidos: un aumento en la cantidad relativa de GIPCs con una BCL di- o tri-hidroxilada de 18 carbonos (d18:0 y t:18:0) unidas a un ácido graso de 16 carbonos, una disminución de GIPCs con una BCL t18:0 unida a un ácido graso de 24 carbonos y una disminución significativa de glucosilceramidas con una BCL t18:1 unida a un ácido graso de 22 carbonos. Todos estos cambios se encontraron en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) en comparación con las tres líneas que fungieron como controles.

Estas especies individuales de glucosilceramidas y GIPCs que resultaron diferentes en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) con respecto a las líneas control (silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir (-)) podrían ser las que interaccionan con la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática modulando así su actividad. Para corroborar que la deficiencia de estos esfingolípidos complejos específicos era lo que estaba aumentando la actividad de hidrólisis de ATP en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) se realizó un conjunto de experimentos de reconstitución. La idea detrás de estos experimentos era que si las membranas plasmáticas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) tenía una ATPasa de H<sup>+</sup> con una actividad incrementada debido a que esas membranas eran deficientes en los esfingolípidos específicos encontrados, entonces al serles reconstituidos estos esfingolípidos de manera exógena, la actividad de la enzima en las membranas se recuperaría, es decir, descendería a los niveles del control. Para reconstituir estos esfingolípidos específicos que se encontraban disminuidos en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) se hicieron experimentos de reconstitución con una fracción enriquecida en esfingolípidos endógenos extraídos de la membrana plasmática de la línea silvestre, asumiendo que entre las diferentes especies de esfingolípidos extraídas se encontraban los esfingolípidos necesarios para la reconstitución de las membranas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Los resultados indicaron que en la línea control, la *Atlcb2a-1*, que tiene el mismo contenido total de esfingolípidos en la membrana plasmática que la línea con mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), la incubación con la fracción enriquecida en esfingolípidos no modificó la actividad de la enzima. Sin embargo, en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), que tiene una

deficiencia total de esfingolípidos complejos y de algunos específicos de la membrana plasmática, al suplementarla con la fracción enriquecida de esfingolípidos de las plantas silvestres para reconstituírle los esfingolípidos faltantes, la actividad disminuyó de acuerdo a la cantidad de esfingolípidos exógenos añadidos. De esta manera, se obtuvo una reducción de la actividad de 200 nmol Pi/min/mg a valores de 150 nmol Pi/min/mg con 15 µg de extracto. Sin embargo, a cantidades mayores a 20 µg de extracto, la actividad se fue incrementando según la cantidad de esfingolípidos exógeno añadido, alcanzándose valores de actividad muy similares a los medidos en ausencia de esfingolípidos exógeno. Estos resultados indican dos cosas: por un lado, apoya que la disminución de esfingolípidos como glucosilceramida y GIPCs específicos están asociados al aumento en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) y por otro, la restauración parcial de la actividad de ATPasa cercana a los valores de una planta silvestre, sugiere que además de la disminución de estos esfingolípidos específicos, el aumento de GIPCs que tienen unido a su BCL un ácido graso de 16 carbonos está también involucrado en el aumento de actividad de la ATPasa. Por lo tanto el contenido de glucosilceramidas y de GIPCs, tienen un papel importante sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática.

	<i>Wt</i>	<i>Atlcb2a-1</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)</i>	<i>GC-A</i>
Contenido de esfingolípidos totales en la planta	100 %	100 %	100 %	64 %	-----
Contenido de esfingolípidos totales en la membrana plasmática	100 %	150 %	150 %	150 %	-----
Cantidad relativa de GIPCs y glucosilceramidas	BASAL	BASAL	BASAL	Aumento de GIPCs de ác. grasos de 16 C y disminución de glucosilceramidas con BCL t18:1 unida a un ácido graso de 22 C	Deficiente en glucosilceramidas (solo tiene 2 % de glucosilceramidas con respecto a la silvestre ( <i>Wt</i> ) Chen y col., no publicado)
Actividad de ATPasa	100 %	100 %	100 %	200 %	150 %

**Figura 31. Resumen de las características fenotípicas, contenido de esfingolípidos y actividad de ATPasa de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a ± metoxifenoza* y *GC-A*.** En la parte superior se ilustran las características fenotípicas de las plantas adultas de *Arabidopsis* usadas en este trabajo. Se denota con un (+) a las plantas que se

asperjaron con la disolución de metoxifenozida, las flechas amarillas indican la clorosis presente en las hojas producto de la disminución de esfingolípidos totales en la planta. En la parte inferior se ilustra una tabla que muestra el contenido de esfingolípidos totales en la planta determinado por Dietrich y col. (2008), el contenido de esfingolípidos totales presentes en la membrana plasmática obtenidos en este trabajo, la cantidad relativa de GIPCs y glucosilceramidas en las plantas y la actividad de hidrólisis de ATP de las preparaciones membranales obtenida de la parte aérea de la planta. Los datos se muestran en % con respecto a la línea silvestre.

### **1.1 Papel de la glucosilceramida en el aumento de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas.**

Dada la complejidad de la estructura y composición de la membrana plasmática, no existe hasta ahora ningún modelo que permita saber con precisión cuáles, cuantos y en qué posición los lípidos membranales rodean a una proteína membranal. Los pocos trabajos referentes a este problema se basan en evidencias cristalográficas de algunas proteínas y en ensayos de reconstitución de otras, haciendo posible identificar algunos lípidos que son esenciales para la función de algunas proteínas y en algunos casos, de su influencia en la actividad de las proteínas [Serrano y col., 1988; Kasamo y col., 1990; Lee, 2004; Bogdanov y col., 2009; Bogdanov y col., 2010; Vitrac y col., 2011].

Con los hallazgos anteriores sobre los resultados de la esfingolipidómica en combinación con los de reconstitución, quisimos incidir en la influencia de la glucosilceramida en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. Para ello, utilizamos un enfoque alternativo: utilizar una línea de *Arabidopsis thaliana* deficiente en el contenido de glucosilceramida endógena (*GC-A*). Esta línea tiene un RNAi en el producto del gen que codifica a la enzima glucosil ceramida sintasa [Chen y col., no publicado]. De estas plantas se usaron preparaciones microsomales, en lugar de membranas plasmáticas puras debido a que las plantas son fenotípicamente enanas (ver imagen de la Figura 31), y el material foliar solo era suficiente para aislar preparaciones microsomales. En estas plantas mutantes deficientes en glucosilceramidas se esperaba tener una ATPasa de H<sup>+</sup> con una alta actividad, a semejanza a lo observado en la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*). Para poder explorar la contribución de la glucosilceramida en esta línea, fue necesario incluir en el presente estudio la fracción microsomal de dos líneas control: un control estuvo constituido por plantas (silvestres) con valores moderados de actividad basal de ATPasa. El otro control fue el de plantas (*Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*) con una actividad de ATPasa alta. Así fue que se encontró que mientras la actividad de preparaciones microsomales de plantas silvestres era de alrededor de 30 nmol Pi/min/mg, la actividad de plantas con una ATPasa de H<sup>+</sup> estimulada por disminución de esfingolípidos totales era de 58 nmol Pi/min/mg. Esta diferencia coincidía con los valores de actividad reportados para las membranas plasmáticas de las líneas respectivas, indicando que

se podían detectar las diferencias de actividad también en las fracciones microsomales. No solo eso, sino que al comparar estos valores de actividad de ATPasa de los controles con los obtenidos en trabajos anteriores en el laboratorio, tanto en fracciones microsomales de plantas adultas como de estadios jóvenes, los valores fueron muy cercanos, pues se encontró que la actividad fue de 26.5 nmol Pi/min/mg en plantas silvestres [Vázquez-Vázquez, 2008], mientras que en fracciones microsomales de estadios jóvenes (plántulas), los valores están entre 28 a 43 nmol Pi/min/mg en la línea silvestre y 56 a 76 nmol Pi/min/mg en el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) [Mejía-Hernández, 2010; Cornejo-Granados, 2012]. Esta reproducibilidad en las actividades de las preparaciones microsomales nos permitió asegurarnos de que las condiciones en las que se iba a evaluar el efecto de la glucosilceramida eran adecuadas. Hay que hacer notar que en todos los experimentos precedentes se habían estado utilizando preparaciones de membranas plasmáticas purificadas, por lo que resultaba indispensable contar con preparaciones microsomales en las que la actividad de hidrólisis de ATP determinada fuera la de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, sin que se viera mezclada con la actividad de otras enzimas que hidrolizan ATP y así poder determinar confiablemente el efecto de la glucosilceramida sobre la ATPasa de H<sup>+</sup>. Por ello, la actividad se determinó en presencia de inhibidores selectivos.

Al comparar la actividad de las fracciones microsomales obtenidas de plantas deficientes en glucosilceramidas (*GC-A*) con la de los controles, efectivamente se observó que la actividad se incrementaba 1.5 veces comparada con la actividad de plantas silvestres, pero esta activación era menor comparada con la observada en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), en la que se había obtenido una activación de 1.9 veces comparada con la silvestre. Este aumento parcial en la actividad de hidrólisis de ATP por deficiencia de glucosilceramida, indica que si bien esta no parece ser la única especie de esfingolípidos involucrada en la activación, la glucosilceramida tiene un efecto importante en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas. Posiblemente al disminuir la cantidad de glucosilceramida total en la mutante silenciada inducida, haya una reorganización de los lípidos de la membrana plasmática, ocasionando un cambio de conformación de la enzima. Lo anterior implica que en el caso de la enzima de las plantas silvestres, la glucosilceramida está ejerciendo un efecto de control sobre la conformación de la enzima que la lleva a una actividad moderada. Por experimentos previos que indicaban que el extremo carboxilo terminal estaba involucrado en el efecto de aumento de la actividad por alteración en los esfingolípidos en la mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) [Morales-Cedillo, 2012], este cambio conformacional estaría mediado por la deficiencia de glucosilceramida. Al respecto, se ha reportado recientemente que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> del tonoplasto de melanocitos depende de glucosilceramida [van der Poel y

col., 2011]. En ese trabajo, se establece un vínculo entre el pH, la glucosilceramida y la ATPasa de tonoplasto, ya que se encontró que en células GMB5 de melanocitos, que no tienen glucosilceramida sintasa activa, lo que resulta en una falta total de glucosilceramida en la célula, hay un aumento de pH y una menor actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> del tonoplasto comparado con células de melanocitos de tipo silvestre, sugiriendo que la glucosilceramida participa indirectamente en la biogénesis de melanosomas estimulando la ATPasa de H<sup>+</sup> del tonoplasto, posiblemente a través de la unión de la glucosilceramida con la enzima.

Para apoyar la propuesta de que el aumento en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas estaba provocado por un descenso en la cantidad de glucosilceramida presente en la membrana, se realizó un conjunto de experimentos de reconstitución, ya que si la membrana plasmática de la línea GC-A tenía una ATPasa de H<sup>+</sup> con una actividad incrementada debido a que estas membranas eran deficientes en glucosilceramidas, entonces, al serles reconstituidos estos esfingolípidos de manera exógena, la actividad en las membranas se restauraría a niveles de actividad de una planta silvestre. Los resultados indicaron que en la línea silvestre, la incubación con glucosilceramida exógena no modificó la actividad de la enzima; mientras que en la línea GC-A que es deficiente en glucosilceramida total, al aumentar la cantidad de este esfingolípido exógeno añadido, la actividad se acercó al valor de la línea silvestre (ver Figura 9). Estos resultados apuntan fuertemente a que el aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la línea GC-A, se debe efectivamente a la deficiencia de glucosilceramida presente en la membrana, por ello, al reconstituir estos esfingolípidos, la línea GC-A recuperó los niveles de actividad característicos de la línea silvestre, misma que contiene valores normales de esfingolípidos. Esto se corrobora con lo observado en experimentos anteriores realizados por González-Reyes (2010), en los cuales mostraron que al reconstituir las vesículas de membrana plasmática de plantas adultas de la línea con menor contenido de esfingolípidos totales (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) con 50 µg de glucosilceramida exógena, los niveles de actividad de hidrólisis de ATP disminuían hasta llegar a los valores de las líneas utilizadas como control. De acuerdo al análisis exhaustivo de las 40 especies de glucosilceramidas cuantificadas por HPLC-MS-MS, la glucosilceramida responsable del efecto en la actividad de la ATPasa es la que tiene una BCL tri-hidroxiada de 18 carbonos con una insaturación (t18:1) y un ácido graso de 22 carbonos (ver Figura 14), debido a que fue la única que resultó disminuida en la línea con mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) comparada con la línea silvestre. Estas características de la parte hidrofóbica de la glucosilceramida identificada son consistentes con lo reportado, ya que de acuerdo a la literatura, las BCLs de las glucosilceramidas en una planta silvestre de *Arabidopsis* están significativamente enriquecidas en la especie d18:1Δcis/trans (usualmente en

combinación con ácidos grasos de cadena corta), así como en la t18:1Δ8cis [Markham y col., 2006; Pata y col., 2009; Chen y col., 2012], sugiriendo que este tipo de glucosilceramida podría estar interaccionando con la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, modulando así su actividad.

Para investigar si las características de la región hidrofóbica de la glucosilceramida eran importantes para mantener a la ATPasa en estados moderados de actividad (en una planta silvestre), uno de los enfoques fue explorar si solo la parte hidrofóbica era capaz de restaurar la actividad de ATPasa, como lo visto con los experimentos de reconstitución con la glucosilceramida completa. La parte hidrofóbica de la especie más abundante de glucosilceramida en *Arabidopsis* está formada por una BCL d18:1 unida a un ácido graso de cadena corta (16-20 carbonos) [Sullards y col., 2000; Markham and Jaworski, 2007, Chen y col., 2012]. De acuerdo a lo anterior y a nuestros resultados, se realizó la reconstitución membranar usando una ceramida exógena con una BCL d18:1 y un ácido graso de 16 carbonos y otra ceramida cuyo ácido graso es de 18 carbonos e hidroxilado en la posición 2. En estos estudios, se observó que ambas ceramidas no afectaron la actividad de las membranas provenientes de plantas silvestres y tampoco restauró la actividad de la ATPasa H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas deficientes en glucosilceramidas totales a los niveles de las plantas silvestres como lo visto con la reconstitución con glucosilceramida exógena. Inclusive, la actividad aumentó en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) con la ceramida de ácido graso de 18 carbonos. Esto indica que la parte hidrofóbica de la glucosilceramida formada por una BCL d18:1 con ácidos grasos de cadena corta no está asociada directamente con el efecto de mantener la actividad de ATPasa en niveles moderados en las plantas silvestres. Esto contrasta con lo hallado en la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de levadura en la que esfingolípidos con ácidos grasos de cadena muy larga son requeridos para el tránsito de la ATPasa de H<sup>+</sup> desde el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática [Gaigg y col., 2006].

Nuestros resultados sugerían que entonces la glucosilceramida necesita de la parte hidrofílica para ejercer su efecto en la actividad de ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas. Con respecto a las características de la ceramidas usadas, se ha sugerido que esfingolípidos con ceramidas que contienen ácidos grasos de 16 carbonos y BCLs di-hidroxiladas son incapaces de soportar un crecimiento normal de la planta y que estos esfingolípidos o sus metabolitos no pueden regular la homeostasis de los esfingolípidos, por lo que se destaca la importancia de las BCLs tri-hidroxiladas [Chen y col., 2008]. Lo anterior apoya lo encontrado en la esfingolipidómica, que reveló una disminución de glucosilceramidas con BCL tri-hidroxiladas en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Por ello, estas especies son

candidatos importantes para modular la actividad de la ATPasa mediante la interacción con la enzima. Es posible que el tercer hidroxilo en la BCL favorezca las interacciones esfingolípido-ATPasa de  $H^+$ , siendo estas interacciones de tipo polar, y reforzando así la idea de que la parte hidrofílica de la glucosilceramida está interaccionando con la ATPasa a través de su región del carboxilo terminal.

Una manera de explorar si la parte hidrofílica de la glucosilceramida es la importante para modular la actividad de ATPasa, fue determinar el efecto de la modificación del ambiente polar de las vesículas de membrana plasmática, removiendo carbohidratos por tratamiento con  $\beta$ -glucosidasa, ya que se ha descrito que los carbohidratos presentes en los esfingolípidos se encuentran unidos a la ceramida mediante un enlace tipo  $\beta$  [Markham y col., 2006]. De esta manera investigamos la activación de la ATPasa por modificación del ambiente polar de la membrana. Se observó que tanto en las plantas silvestres como en las de las otras dos líneas control (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducir), la actividad de ATPasa se incrementó un 50% con respecto a la actividad medida en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa en cada línea. En contraste con este comportamiento, en la línea con mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), la actividad de ATPasa no cambió, determinada con o sin  $\beta$ -glucosidasa. Al comparar este aumento encontrado en las tres líneas control con lo observado en la línea con menor contenido de glucosilceramida total GC-A, el efecto fue muy similar, ya que en todas hubo un incremento de la actividad de alrededor del 50%, indicando que el ambiente de la región polar de la bicapa en el que se encuentran residuos glucosídicos y en el que se encuentra la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, influye en su actividad. A este respecto, se ha reportado que la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico es regulada por la asociación con la proteína integral de membrana fosfolambam o PLB. Esta interacción es mantenida en equilibrio por los fosfolípidos neutros [Li y col., 2012]. De manera análoga, la glucosilceramida que es un esfingolípido neutro podría estar manteniendo a la ATPasa en un equilibrio entre la conformación activa y la inactiva en una planta silvestre, mediante interacciones polares entre la región hidrofílica de la glucosilceramida y la región auto-inhibitoria del carboxilo terminal de la ATPasa.

### **1.2 Efecto de las glicosil-inositolfosforil-ceramidas (GIPCs) en la actividad de la ATPasa de $H^+$ de la membrana plasmática.**

En mamíferos se ha reportado que diversos esfingolípidos aniónicos pueden interactuar con diversas proteínas de membrana, que incluyen a la caveolina-1 y diferentes integrinas [Wang y col., 2001; Wang y col., 2002; Toledo y col., 2005; Duan y col., 2006]. Lo anterior apoyaría una

propuesta de que los GIPCs, que son los esfingolípidos aniónicos de plantas, también sean candidatos para interactuar y modular proteínas membranales como la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática.

El hecho de que los resultados con la mutante *GC-A* indicaran que la glucosilceramida contribuía parcialmente al aumento de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, implican que además de la glucosilceramida hay otras especies de esfingolípidos involucradas en la modulación de la actividad de la ATPasa. Este efecto se evidenció por un aumento mayor de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida con metoxifenzida (en la que disminuyen los esfingolípidos totales en la planta), en comparación con el efecto de aumento parcial de actividad mostrado por la mutante *GC-A*. Por tanto los GIPCs también podrían estar involucrados en el aumento de la actividad de la ATPasa. Esta posibilidad se robusteció cuando el análisis esfingolipídico arrojó un resultado de aumento de la fracción de GIPCs en las preparaciones membranales de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Para investigar esta posibilidad, se estudió el efecto de GIPC en la actividad de la ATPasa. Debido a la no disponibilidad de una GIPC comercial, se utilizó inositol-fosfoesfingosina (un liso-derivado de GIPC, al cual le falta la cadena de ácido graso en la porción hidrofóbica y a la porción hidrofílica le faltan los residuos de carbohidrato). Se encontró lo esperado, es decir, en las membranas provenientes de plantas silvestres, la adición del liso-derivado de GIPC aumentó la actividad un 22% o sea una activación de 1.22 veces con respecto a la actividad sin esfingolípidos exógenos. Sin embargo, en la línea que tiene mayor cantidad de GIPCs en la membrana plasmática (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)) comparada con la línea silvestre (ver Figura 13), se observó que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> no fue afectada por la adición de inositol-fosfoesfingosina. Por lo tanto, el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP producido por la inositol-fosfoesfingosina en la línea silvestre, apoya fuertemente la propuesta de que el incremento de GIPCs en la membrana está involucrado en el aumento de actividad de hidrólisis de ATP de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), e indica que los GIPCs tienen un efecto positivo en la actividad de hidrólisis de ATP a diferencia de la glucosilceramida que tiene un efecto negativo.

Comparando este efecto con el de los glicerofosfolípidos y en particular con el fosfatidilinositol que es el que tiene el grupo polar parecido a los GIPCs, se ha reportado que la ATPasa de levadura se activa o es estimulada por fosfatidilinositol que tiene cadenas hidrofóbicas insaturadas [Serrano y col., 1988]. Algo similar se observó en preparaciones de plántulas de rábano, en las que la ATPasa dependiente de Mg<sup>2+</sup> fue activada por fosfatidilinositol [Cocucci y Marre, 1984]. Si la única similitud estructural entre el glicerolípido fosfatidilinositol y los GIPCs es que ambos tienen el grupo inositol-fosfato en la parte polar, y ambos tienen efectos activadores sobre la ATPasa de levadura y de plantas, respectivamente,

entonces el efecto activador observado en la línea silvestre al adicionar el liso derivado de GIPCs muy probablemente se debe a la interacción de la cabeza polar del esfingolípido exógeno con la región carboxilo terminal de la enzima. Este efecto es lo que probablemente está pasando en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*: que el aumento de GIPCs en la membrana plasmática produce un cambio conformacional de la ATPasa en el cual hay un desplazamiento de la región del carboxilo terminal debido posiblemente a las interacciones electrostáticas entre los aminácidos de la región del carboxilo terminal y el grupo polar de los esfingolípidos aniónicos (GIPCs). Al respecto, se ha reportado que el centro de reacción fotosintético de *Thermochromatium tepidum* y el citocromo *bc<sub>1</sub>* de levaduras adoptan diferentes conformaciones debido a la interacción del grupo fosfato de los fosfolípidos con los residuos Lys, Arg o Glu de esas proteínas, dependiendo esta interacción del tamaño y la carga del grupo polar del lípido [Nogi y col., 2000; Lange y col., 2001]. Adicionalmente, se ha sugerido que la región hidrofílica de los lípidos puede afectar la actividad de proteínas de membrana por cambios en la concentración de moléculas cargadas en la superficie de la bicapa [Lee, 2004]. En este sentido, estudios de la regulación de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA por sus siglas en inglés), a través de la interacción con la proteína fosfolamban o PLB, indican que el incremento de lípidos aniónicos producen una mayor inhibición de SERCA por PLB, debido a que los grupos cargados de los lípidos perturban la interacción electrostática del dominio citoplásmico de PLB con la superficie de la membrana [Li y col., 2012].

Se ha reportado que diversos fosfolípidos necesitan tanto de su región hidrofílica como de la región hidrofóbica para ejercer su efecto sobre la actividad de las proteínas de membrana [Serrano y col. 1988, Kasamo, 1990]. De acuerdo a la esfingolipidómica de la línea que tiene mayor actividad de ATPasa de  $\text{H}^+$  (*Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*), hubo un incremento de GIPCs que contiene una BCL d18:1 y un ácido graso de 16 carbonos en su región hidrofóbica, indicando que este tipo de ceramidas en los GIPCs podría ser importante para asegurar la activación de la ATPasa de  $\text{H}^+$ . Sin embargo, como se mencionó anteriormente en nuestros resultados, ceramidas con BCL di-hidroxiladas que tienen unido un ácido graso de cadena corta no tuvieron un efecto en la actividad de la ATPasa, descartándose así la posibilidad de que las ceramidas de ácidos grasos de cadena corta de los GIPCs tengan un efecto en la actividad. De acuerdo a la literatura, la región hidrofóbica de los GIPCs está formada principalmente por ácidos grasos de cadena muy larga. Es sugerente el hecho de que los GIPCs contengan ácidos grasos de cadena larga o muy larga [Markham y col., 2006; Chen y col., 2009; Buré y col., 2011], ya que éstos podrían estar asegurando la activación de la enzima. Al respecto, se ha reportado que la lisofosfatidilcolina de cadena larga estimula la actividad de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de vesículas de membrana plasmática con un alto grado de especificidad, y que la substitución de la larga

cadena acílica (más de 14 carbonos) por una de 10 a 12 carbonos, da como resultado la pérdida total de la capacidad de activación [Palmgren y col., 1990; Gómez y col., 1996]. Además, hay evidencias en levadura acerca del requerimiento de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena muy larga para el transporte de la ATPasa de H<sup>+</sup> hasta la membrana plasmática [Gaigg y col., 2006; Toulmay y Schneiter, 2007]. Por ello, para explorar la posibilidad de que el aumento en el número de carbonos en la cadena acílica del ácido graso favorecía la activación de la ATPasa, se realizaron experimentos de reconstitución usando una ceramida formada por una BCL d18:1 unida a un ácido graso de 24 carbonos. Se encontró que en la línea silvestre la actividad era estimulada alrededor de un 30% por la adición de ceramida con ácidos grasos de cadena muy larga, mientras que en la línea que tiene mayor cantidad de GIPCs en la membrana plasmática (*Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*) comparada con la línea silvestre, se observó que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> aumentaba alrededor de un 10%. Esto indica que esfingolípidos complejos con ácidos grasos de cadena larga o muy larga pueden estimular la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, como es el caso de los GIPCs que son enriquecidos en ácidos grasos de cadena larga [Markham y col., 2006; Buré y col., 2011]. Si bien en nuestros experimentos de reconstitución con el liso derivado de GIPC (inositol-fosfoesfingosina) que carece del ácido graso de cadena larga, hubo una activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> en preparaciones membranales de plantas silvestres, se podría pensar que el esfingolípido complejo completo produciría una estimulación mayor en la actividad de la ATPasa, como lo visto por Serrano y col. (1988) en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de levadura, la cual es mayor con fosfatidilinositol que con lisofosfatidilinositol.

Los resultados de nuestros estudios apoyan fuertemente que ambas interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre GIPCs-ATPasa de H<sup>+</sup> son importantes para la modulación de la actividad de la enzima, así como lo antes descrito sobre el efecto de glicerolípidos, esteroides y detergentes en la actividad de la ATPasa. Para estos anfífilos, el efecto depende tanto de su región hidrofílica como de su porción hidrofóbica [Kasamo y col., 1990; Cooke y col., 1994]. Algo similar se ha encontrado para los esfingolípidos de mamíferos, por ejemplo, la esfingomielina interacciona directa y específicamente con la proteína membranal p24 y esta asociación depende tanto del grupo polar como de la región hidrofóbica del esfingolípido [Contreras y col., 2012].

Proponemos que, en las vesículas de membrana plasmática de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*, el aumento de GIPCs modifica las interacciones lípido-ATPasa, ocasionando un cambio de conformación de la enzima al nivel de los contactos con la región autoinhibitoria del carboxilo terminal, lo que conlleva al aumento de la actividad de hidrólisis de ATP. Adicionalmente, estos resultados apuntan a que los GIPCs también se encuentran del lado citosólico de la membrana,

ya que la región del carboxilo terminal de la enzima se encuentra en esta fase, por lo que para que se lleve a cabo la interacción de la parte polar de los GIPCs con la región del carboxilo terminal, ambos tendrían que estar por lo menos en el mismo lado de la membrana. Hay pocos datos disponibles de la localización sub-celular de GIPCs, la suposición es que en general están localizados en la membrana plasmática, pero no hay una evidencia directa de su distribución celular y en las membranas vegetales [Sperling y Heinz, 2003; Lynch y Dunn, 2004; Sperling y col., 2005; Markham y col., 2006; Markham y Jaworski y col., 2007]. Se ha descrito que la correcta asociación de la ATPasa de H<sup>+</sup> a la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* depende de los lípidos que forman parte de las vesículas generadas en el retículo endoplásmico, ya que ellos contribuyen a la determinación de la orientación transmembranal de la proteína y de su subsecuente estabilización. Para ello, las interacciones de los dominios extramembranales de la proteína y los grupos de la cabeza de los lípidos que se encuentran circundantes al lugar de inserción de la proteína en la membrana son cruciales [Gaigg y col., 2005; Bogdanov y col., 2009]. Por lo tanto, nuestros datos serían una evidencia importante de la distribución de los GIPCs en la membrana plasmática.

## **2. Participación de la proteína 14-3-3 en el mecanismo de aumento de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática mediada por cambios en el contenido de esfingolípidos en la membrana.**

Considerando que nuestro trabajo propone al carboxilo terminal de la ATPasa de H<sup>+</sup> como el sitio de interacción con los esfingolípidos membranales y tomando en cuenta que uno de los mecanismos de regulación por los que la ATPasa de H<sup>+</sup> aumenta su actividad, es mediante la unión de la proteína 14-3-3 al carboxilo terminal, se exploró la posibilidad de que el aumento en la actividad mostrada en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) pudiera deberse a una mayor cantidad de la proteína 14-3-3 asociada a la ATPasa. Para ello, se estimó la cantidad de la proteína 14-3-3 en las preparaciones membranales usadas en este trabajo mediante inmunoréplica. Al inicio se usó un anticuerpo heterólogo anti 14-3-3 de la isoforma β de humano, por lo que se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos entre la proteína 14-3-3 de la isoforma β de humano contra las diferentes isoformas de la 14-3-3 de Arabidopsis, siendo el porcentaje de identidad de 60-64% (ver Apéndice 4). Con este anticuerpo, los niveles de la proteína reguladora 14-3-3 no se vieron afectados por cambios en el contenido de esfingolípidos totales en la membrana plasmática, tanto en la línea silvestre como en las tres líneas mutantes (*Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/Atlcb2a* ± metoxifenoza), ya que la cantidad de proteína 14-3-3 resultó muy similar. Este mismo comportamiento se observó usando un anticuerpo anti 14-3-3 de

Arabidopsis. Estos resultados indican que la proteína 14-3-3 no está involucrada en el aumento de la actividad de la ATPasa de  $H^+$  provocada por cambios en el contenido de esfingolípidos complejos específicos en la membrana. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con reserva, ya que Arabidopsis cuenta con 13 isoformas de la proteína 14-3-3, de las cuales 9 se expresan en hojas y de estas 9, las isoformas GF14mu, GF14lambda y GF14epsilon se expresan mayoritariamente [Alsterfjord y col., 2004]. Por lo tanto, si hubiera un aumento diferencial de una de las isoformas expresadas en hojas, este no podría ser detectado por los anticuerpos usados para la proteína 14-3-3, pues lo que muestran las inmunoréplicas son todas las isoformas de las proteínas 14-3-3 presentes en las preparaciones membranales. Adicionalmente, hay que considerar que la proteína 14-3-3 podría estar asociada a otras proteínas de la membrana plasmática [Bunney y col., 2002]. Por tanto, nuestra forma de detectar la proteína 14-3-3, no permite distinguir cuántas o cuales de las isoformas estaría(n) unida(s) exclusivamente a la ATPasa de  $H^+$ .

Dado lo anterior y para obtener una evidencia que nos permitiera más certidumbre sobre la posibilidad de que la interacción de la proteína reguladora 14-3-3 con la región del carboxilo terminal contribuyera al aumento en la actividad de la ATPasa mediado por los esfingolípidos, se realizó la estimación de los niveles de la ATPasa fosforilada en las preparaciones membranales por inmunoréplica, usando un anticuerpo anti fosfo-treonina/serina, ya que la fosforilación del penúltimo residuo de la región del carboxilo terminal (Thr948) es la señal para que la proteína 14-3-3 se una al carboxilo terminal, aumentando la actividad de la ATPasa de  $H^+$  [Lu y col., 1992; Olsson y col., 1995; Janh y col., 1997]. Se pudo advertir que en la línea que tiene mayor actividad de ATPasa (*Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+)), los niveles de la proteína fosforilada fueron mayores con respecto a sus líneas control inmediatas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-) mientras que al compararla con la línea silvestre, el nivel de proteína fosforilada fue menor en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). En resumen, no hay una correlación entre los niveles de fosforilación y la actividad de la enzima. La diferencia del nivel de proteína fosforilada entre la línea silvestre y las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-) está en concordancia con las diferencias encontradas en el contenido de esfingolípidos totales en la membrana plasmática de las diferentes líneas, ya que las líneas mutantes tienen mayor contenido de esfingolípidos en la membrana que la línea silvestre; este aumento de esfingolípidos en la membrana posiblemente ocasiona un cambio de conformación de la enzima. Y probablemente el cambio de esfingolípidos complejos específicos observado en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) esté provocando un cambio de conformación adicional o diferente al que sufren las dos líneas mutantes *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-), en las que las alteraciones conformacionales no involucrarían la región del carboxilo terminal, pues en estas dos líneas, el cambio no se traduce

en un aumento en la activación de la enzima. Esta interpretación está apoyada en trabajos anteriores en el laboratorio, en los que se detectó mediante inmunoréplica la remoción de la región del carboxilo terminal de la ATPasa por proteólisis controlada. Estos resultados revelaron que en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+), la proteólisis del carboxilo terminal era más rápida con respecto a sus líneas control inmediatas, las *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-), pero al compararla con la de la línea silvestre, la proteólisis era más lenta en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+). Estos resultados se pueden interpretar en términos de la accesibilidad de la región del carboxilo terminal de la enzima a la tripsina. Al respecto, se ha señalado en la literatura que esta región, compuesta de aproximadamente 100 aminoácidos, es extremadamente móvil [Pedersen y col., 2007] y presenta interacciones complejas de sus sub-regiones con el resto de la enzima [Morsomme y col., 1998; Axelsen y col., 1999; Speth y col., 2010], manifestándose en su actividad. Considerando lo anterior, nuestros resultados sugieren que mientras en la enzima de las plantas silvestres, la región del carboxilo terminal está muy expuesta, en las mutante silenciada lo está menos y en las plantas mutantes controles mucho menos. Esto apoya la posibilidad de que el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) se deba a un cambio diferente en la interacción de la región del carboxilo terminal con su entorno esfingolipídico [Morales-Cedillo, 2012].

Una evidencia adicional que apoya esta interpretación es la encontrada en el estudio de los parámetros cinéticos de la actividad de hidrólisis de ATP realizada en fracciones membranales de las plantas de las tres líneas control y la de la actividad aumentada de hidrólisis de ATP (con menor contenido de esfingolípidos totales en la planta, y con cambios diferenciales en niveles de glucosilceramidas y GIPCs). Estas determinaciones revelaron diferencias en la  $K_m$  entre la línea silvestre y las líneas controles *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-), en las que la  $K_m$  es mayor en la línea silvestre que la de las líneas mutantes, como se muestra en la Tabla 2 [González Reyes, 2010]. Esto explicaría porque la actividad de hidrólisis de ATP es igual en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-) que la de plantas silvestres, ya que por un lado en las líneas control *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (-) su ATPasa tienen mayor afinidad por su sustrato (menor  $K_m$ ) pero hay menor cantidad de ATPasa fosforilada (activa) comparado con las plantas silvestres, y viceversa, la ATPasa de las plantas silvestres tiene menor afinidad por su sustrato (mayor  $K_m$ ) pero poseen mayor cantidad de ATPasa fosforilada.

En resumen, con respecto a las plantas silvestres, las plantas mutantes (*Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*  $\pm$  metoxifenoazida) presentan menores valores de  $K_m$ , menores niveles de fosforilación, una menor accesibilidad del carboxilo terminal a la tripsina y mayores contenidos de esfingolípidos totales membranales. Esto implica que al aumentar el contenido de

esfingolípidos totales en la membrana plasmática, la ATPasa de H<sup>+</sup> sufre un cambio conformacional, que se ve reflejado en una mayor afinidad por su sustrato y una conformación diferente del carboxilo terminal evidenciada por su estado fosforilado y su accesibilidad a la proteólisis con respecto a la ATPasa de plantas silvestres. Adicionalmente, en el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)*, hay cambios específicos de ciertos esfingolípidos complejos en la membrana, que provocan una conformación diferente a la de las silvestres y las controles mutantes. Estos cambios se traducen en un aumento de la actividad de hidrólisis de ATP y se demuestran por un aumento en la  $V_{max}$ , y una mayor fosforilación y accesibilidad del carboxilo terminal a la tripsina.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la ATPasa de la membrana plasmática de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas [González Reyes, 2010].

		Silvestre	<i>Atlcb2a-1</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a (-)</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)</i>
Michaelis-Menten	$K_m$ (mM)	2.06 ± 0.26	1.07 ± 0.05	1.29 ± 0.11	1.23 ± 0.1
	$V_{max}$ (nmol Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	168.5 ± 7.7	130.1 ± 1.8	223.2 ± 6.0	315.9 ± 9.2

### 3. Modelo de la interacción esfingolípidido-ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de Arabidopsis.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la funcionalidad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática requiere de una alta especificidad en el tipo de lípidos circundantes, en especial de esfingolípidos que resultan críticos en ciertas regiones específicas de la proteína como el carboxilo terminal. Los datos con la mutante silenciada indican que cuando hay una disminución de glucosilceramidas o un aumento de GIPCs se favorece una conformación que se refleja en un aumento en la actividad. Estos cambios en conformación podrían ser reversibles e inducidos por condiciones inducidas *in vivo*. Lo anterior se ve apoyado por el hecho de que la alta movilidad de la región del carboxilo terminal ha impedido su resolución en el análisis cristalográfico de la enzima [Pedersen y col., 2007].

En la Figura 32 se presenta un modelo que trata de describir e interpretar los resultados obtenidos en esta tesis. En él se propone que los esfingolípidos membranales están en contacto directo con la ATPasa de  $H^+$  y que esta interacción tiene influencia en la conformación de la enzima, de tal manera que cuando hay niveles de esfingolípidos normales (100%) la enzima se mantiene en un estado de actividad “moderada” o bien está en equilibrio entre la forma inactiva y la activa, y cuando hay un cambio en el contenido de esfingolípidos complejos específicos, la enzima toma otra conformación diferente. Esta transición en estados conformacionales estaría mediada por un cambio en la interacción de la región polar membranal de esfingolípidos adyacentes a la enzima con el dominio auto-inhibitorio de la región del carboxilo terminal, lo cual tendría una repercusión con el sitio catalítico. En este contexto, los esfingolípidos podrían ser fundamentales en la expresión de la capacidad catalítica de la enzima, constituyendo factores importantes en su regulación.

Este modelo fue construido basado en la estructura cristalográfica de la isoforma 2 de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (AHA2) disponible en el Protein Data Bank (PDB ID: 3b8c; Pedersen y col., 2007] y la galactosilceramida (PDB ID: 3sdx, Pellici y col., 2011]. En él se muestra la interacción de la parte hidrofílica del esfingolípidos con motivos específicos de la región del carboxilo terminal de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, ya que se ha encontrado en diversas proteínas solubles un motivo denominado dominio de unión a esfingolípidos (SBD por sus siglas en inglés), que es una estructura de horquilla ( $\alpha$ -hélice-giro- $\alpha$ -hélice), en la cual el giro contiene un mínimo de un residuo aromático que es crítico para la interacción con el carbohidrato del esfingolípidos [Fantini, 2003]. Al buscar características de estos motivos en la región del carboxilo de la enzima, se encontraron posibles SBDs. Con respecto a la interacción por GIPCs, el modelo sería muy similar, solo se requeriría de interacciones adicionales complementarias, especialmente de residuos de aminoácidos básicos (Arg y Lys) del SBD (Ver Figura 32B) para estabilizar el complejo GIPC-ATPasa a través de uniones electrostáticas adecuadas entre la carga negativa del grupo fosfato del GIPC y residuos cargados o polares de la enzima. Obviamente, los aminoácidos aromáticos del SBD interactuarían con las unidades de azúcares del GIPC, ya que se ha sugerido que la parte alifática de la Lys y Arg interactúan con el núcleo hidrofóbico de la membrana, mientras que la carga positiva está localizada en la parte polar, en donde puede interactuar con la carga negativa del grupo fosfato del lípido, en este caso del GIPC [Fantini, 2003].

Basados en lo anterior, en la Figura 32A se muestran dos posibles modelos de interacción entre los posibles dominios de unión a esfingolípidos del carboxilo terminal con la parte hidrofílica de la galactosilceramida (glucosilceramida en plantas). Estos dos modelos se obtuvieron por el procedimiento de docking, el cual inicialmente arrojó 6 modelos, de los cuales

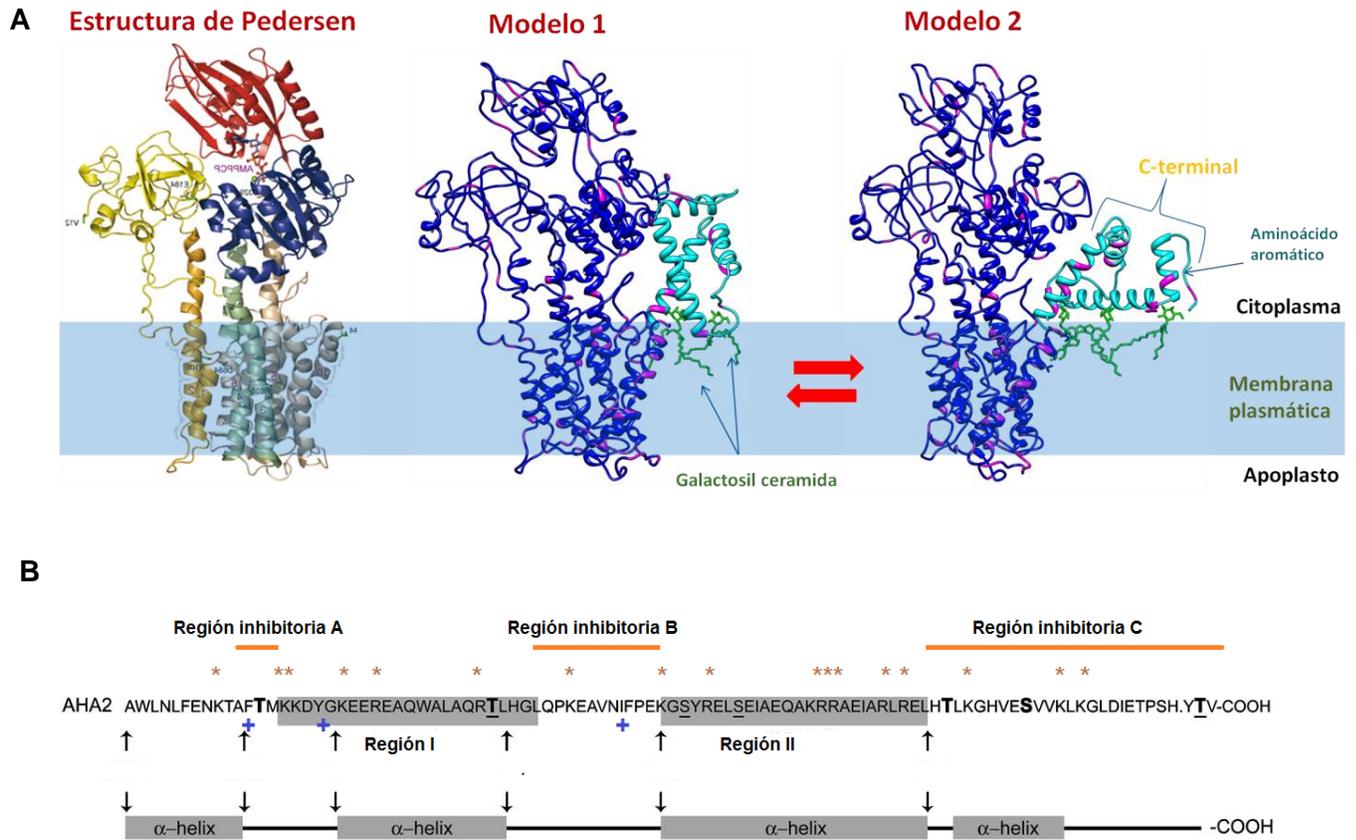
4 fueron desechados por ser inviables. Los dos modelos finales presentaron dos características fundamentales: en uno, la región del carboxilo terminal se halla próximo al sitio catalítico (Modelo 1) y en el otro está cercano a la membrana (Modelo 2). Ambos modelos podrían corresponder a estados diferentes dados por la gran movilidad de esta región y por ello corresponder a intermediarios conformacionales de la ATPasa que podrían estar en equilibrio en una planta silvestre.

Adicionalmente se ha sugerido que la función inhibitoria del dominio carboxilo terminal de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática está mediada por dos regiones (regiones I y II) que interactúan con dominios citoplásmicos esenciales para el ciclo catalítico. Las mutaciones dentro de estas regiones abaten el efecto inhibitor de la región carboxilo terminal, tanto en *Arabidopsis* [Baunsgaard y col., 1996; Axelsen y col., 1999] como en *Nicotiana plumbaginifolia* [Morsomme y col., 1996; Morsomme y col., 1998]. Además, estudios de la región del carboxilo terminal de la isoforma PMA2 de la ATPasa de  $H^+$  de *Nicotiana plumbaginifolia* indican que son tres regiones las que actúan directamente como auto-inhedoras (regiones A, B y C), dos regiones que unen hélices predichas dentro del dominio carboxilo terminal (regiones A y B), y una región que consta de los últimos 30 aminoácidos del carboxilo terminal (región C), sugiriéndose que las regiones I y II no inhiben a PMA2 de una manera directa, sino más bien tienen un impacto en la conformación global del dominio carboxilo terminal, ya que la función inhibitor de las regiones A y B puede ser parcialmente revertida por la adición de las regiones I y II, indicando que estas últimas regiones tienen un impacto en la conformación del dominio carboxilo terminal [Speth y col., 2010]. Esto sugiere que la inhibición de la ATPasa por su dominio carboxilo terminal puede ocurrir de una manera progresiva y compleja. Como se puede observar en la Figura 32B, las regiones A y B forman parte de los posibles SBD del C-terminal de la ATPasa, sugiriendo que estas regiones son las que están involucradas en la interacción esfingolípido- ATPasa de  $H^+$ .

Este modelo apoyaría los recientes estudios que ubican a la ATPasa de  $H^+$  en microdominios membranales enriquecidos en esfingolípidos y esteroides, sugiriendo que una de las razones por la que esta enzima migra de la membrana a estos microdominios es para aumentar su nivel de actividad catalítica. De cualquier forma, el hecho de que los esfingolípidos membranales estuvieran promoviendo un rígido control sobre la actividad de la enzima, les da enorme valor en términos fisiológicos.

Este control del ambiente lipídico sobre la ATPasa podría tener implicaciones en términos fisiológicos en la planta, como en el caso de la respuesta a estrés por frío. En la actualidad, se conoce muy poco sobre los eventos tempranos de la detección de la temperatura por las plantas, así como de los mecanismos moleculares para contender con los cambios en la

temperatura. Sin embargo, se ha señalado a la membrana plasmática como la base de la percepción de la temperatura por su función en la fisiología celular, sus propiedades dinámicas, y al hecho de que se han reportado estudios examinando la composición lipídica de la membrana plasmática en relación a la aclimatación al frío. En ellos, se ha encontrado una serie de cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática [Steponkus and Lynch, 1989; Uemura y col., 1995]. Estudios en *Arabidopsis thaliana* han demostrado que la aclimatación al frío resulta en un aumento de la proporción de fosfolípidos totales, con cambios pequeños en cada clase de fosfolípido y un aumento en la proporción de especies di-insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, mientras que las proporciones de esfingolípidos, así como la de esteroides libres disminuyen, entre ellos la glucosilceramida [Uemura y col., 1995; Minami y col., 2009]. Uno de los componentes importantes de la aclimatación es el mantenimiento de la homeostasis iónica y que está regulada por proteínas de la membrana plasmática, como la ATPasa de H<sup>+</sup>. Al respecto se ha reportado que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de centeno, pepino, camelina y de uvas se ve afectada por aclimatación al frío [White y col., 1990; Zhang y col., 2005; Janicka-Russak y col., 2012; Kim y col., 2013]. Estudios preliminares en nuestro laboratorio han encontrado que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas silvestres disminuye después de la aclimatación al frío, condición en la que Uemura y col. (1995) y Minami y col. (2009) encontraron una disminución de esfingolípidos en la membrana plasmática de *Arabidopsis*. Es posible, que en este caso también opere un mecanismo semejante de regulación de la actividad de la enzima como el que se describe en esta tesis.



**Figura 32. Modelo del modo de acción de los esfingolípidos sobre la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en *Arabidopsis thaliana*, en el cual está involucrada la región del carboxilo terminal en la activación de la enzima por cambios específicos de esfingolípidos complejos.** A) Modelos basados en la estructura cristalográfica de la isoforma 2 de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (AHA2) (Pedersen y col., 2007) y la galactosilceramida (Pellici y col., 2011) en los cuales se muestra la interacción de la parte polar del esfingolípido con los residuos aromáticos de los posibles SBD de la región del carboxilo terminal de la ATPasa. B) Regiones del carboxilo terminal de la ATPasa (Modificada de Speth y col., 2010). Se denotan con (\*) los residuos básicos Lys y Arg y con un (+) a los residuos aromáticos, que se encuentran en los posibles SBD. En la parte inferior de la Figura 32B se muestran las hélices predichas en la región del carboxilo terminal de la ATPasa.

**RELEVANCIA DE ESTE TRABAJO**

**A continuación se enlistan las contribuciones relevantes obtenidas en este trabajo:**

- La funcionalidad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática es afectada por la parte polar de esfingolípidos específicos que alteran la actividad de la enzima a través de un contacto con el carboxilo terminal de la enzima.
- Este mecanismo es independiente de la interacción de la proteína 14-3-3 con la región auto-inhibitoria del carboxilo terminal de la ATPasa.

- La glucosilceramida tiene un papel importante sobre la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, manteniendo a la ATPasa en una conformación de actividad moderada en una planta silvestre, mediante interacciones polares entre la región hidrofílica de la glucosilceramida y la región auto-inhibitoria carboxilo terminal de la ATPasa.
- Los GIPCs tienen un efecto positivo en la actividad de la ATPasa, y ambas interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre GIPCs-ATPasa de H<sup>+</sup> son importantes para la modulación de la actividad de la enzima.
- Este trabajo da información sobre la importancia funcional de los grupos de la parte polar de esfingolípidos complejos con regiones citosólicas de la ATPasa.
- Los GIPCs tienen la función de dar estabilidad e integridad a la membrana plasmática, lo cual explica en parte su abundancia en las plantas.
- Los datos de reconstitución con ceramidas con ácidos grasos de cadena larga destacan la importancia que tienen los esfingolípidos con ácidos de cadena larga o muy larga indicando que esfingolípidos con estas características pueden estimular la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, como es el caso de los GIPCs que son enriquecidos en ácidos grasos de cadena larga.
- Se aporta una evidencia importante de la distribución de los GIPCs en la membrana plasmática, ya que apuntan que los GIPCs también se encuentran del lado citosólico de la membrana, ya que la región del carboxilo terminal de la enzima se encuentra en esta fase, por lo que para que se lleve a cabo la interacción de la parte polar de los GIPCs con la región del carboxilo terminal, ambos tendrían que estar por lo menos en el mismo lado de la membrana.
- El análisis lipidómico de las vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres y de las líneas mutantes *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a ± metoxifenoza* serían el primer reporte detallado de la composición y cuantificación de esfingolípidos de la membrana plasmática.
- En condiciones limitantes de síntesis de esfingolípidos, las plantas compensan sus membranas con esfingolípidos, revelando que estos lípidos son esenciales para el funcionamiento de la membrana plasmática, lo cual pone de manifiesto la relevancia que tiene la síntesis de esfingolípidos en la homeostasis celular.

**CONCLUSIONES**

Estos resultados indican que los esfingolípidos de la membrana plasmática son importantes moduladores de la actividad de la ATPasa de  $H^+$ . La glucosilceramida regula negativamente la actividad de la ATPasa de  $H^+$  a través de la interacción de su región polar con la región del carboxilo terminal de la ATPasa. Mientras que los GIPCs regulan positivamente la actividad de la ATPasa de  $H^+$  y posiblemente lo hacen también a través de la interacción de su región polar con la región del carboxilo terminal de la ATPasa. El aumento de actividad de la ATPasa mediado por alteración en los niveles de esfingolípidos específicos, no involucra la interacción de la proteína reguladora 14-3-3 con la región del carboxilo terminal.

En resumen, los esfingolípidos de la membrana plasmática están involucrados en el control de la actividad catalítica de la ATPasa de  $H^+$ . Esta regulación involucra la interacción de la región del carboxilo terminal de la enzima y la parte polar de los esfingolípidos complejos.

## PERSPECTIVAS

Determinar el contenido y composición de los esfingolípidos complejos de las fracciones microsomales de plantas adultas de la línea *GC-A* para identificar qué esfingolípidos modificaron sus niveles y provocaron el cambio de actividad de la ATPasa en esta línea mutante y así corroborar el papel importante que tienen los esfingolípidos específicos endógenos en la interacción con la ATPasa.

Realizar la caracterización de la línea mutante *std1/std2* de Arabidopsis, que tiene una disminución de un 50% de glucosilceramidas y un aumento proporcional de GIPCs [Chen y col., 2012] para corroborar que cambios específicos de ciertos esfingolípidos complejos en la membrana (aumento de GIPCs y a una disminución de glucosilceramidas) provocan una conformación diferente de la ATPasa a la de plantas silvestres. Confirmar si estos cambios se traducen en un aumento de la actividad de hidrólisis de ATP y un aumento en la  $V_{max}$ , y cambios en la fosforilación y accesibilidad del carboxilo terminal a la tripsina como lo observado en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+).

Explorar la interacción de la ATPasa de  $H^+$  con esfingolípidos fluorescentes para confirmar y/o visualizar de una manera más directa la interacción esfingolípido-ATPasa.

Investigar si una mayor actividad de ATPasa de  $H^+$  mediada por alteración en los niveles de esfingolípidos específicos endógenos en la membrana plasmática de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) provoca una mayor apertura estomática y esta situación favorece una mayor invasión de patógenos en los tejidos internos de las plantas. Lo anterior es una forma de corroborar la significancia fisiológica que tiene la regulación de la ATPasa de  $H^+$  por esfingolípidos.

## Apéndice 1

### Reactivos especiales

$\beta$ -glucosidasa: Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri. PM. 135 kDa. No. Cat. G0395. Concentración final utilizada 0.3 mg/mL, disuelta en buffer MES- NaCl ambos a 10 mM a pH = 6.5. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

$\alpha$ -glucosidasa: Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri. PM 68.5 kDa. No. Cat. G0660. Concentración final utilizada 0.03 mg/mL, disuelta en buffer MES- NaCl ambos a 10 mM a pH = 6.5. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

$\beta$ -galactosidasa: Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri. PM 464 kDa No. Cat. G5160. Concentración final utilizada 0.075 mg/mL, disuelta en buffer MES- NaCl ambos a 0.01 M a pH = 6.5. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

GC: Glucocerebrósido (soya 98%). Glucosilceramida. Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama. PM. 714.04 g/mol. No. Cat. 1522. Se disolvió en Cloroformo:Metanol (2:1, v:v). Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

GLC: Ceramida  $\beta$ -D-galactósido, galactocerebrósido de bovino. Mezcla de Tipo I (Contiene  $\alpha$ -ácidos grasos hidroxilados) y Tipo II (contiene  $\alpha$ -ácidos grasos no hidroxilados). Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri. P.M. 812.26 g/mol. Se disolvió en metanol absoluto. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ceramida hidroxilada. Matreya LLC, St. Pleasant Gap. F.M. C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>4</sub> (2-hidroxiesteroil), PM. 582 g/mol. No. Cat. 1323. Se disolvió en Cloroformo:Metanol (2:1, v:v). Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ceramida C16: 2-R-hidroxipalmitoil-D-eritro-esfingosina. Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama. PM. 553.9 g/mol. No. Cat. 860815. Se disolvió en Cloroformo:Metanol (2:1, v:v). Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Inosil-fosfoesfingosina (FE). D-eritro-esfingosil fosfoinositol. Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama. PM. 541.6 g/mol. No. Cat. 860616P. Se disolvió en DMSO a  $60^{\circ}\text{C}$  con sonicación. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Esfingomielina (cérebro bovino 99%). Contiene principalmente como ácidos grasos al ácido esteárico y al nervónico. Sigma Chemicals, Co., St Louis Missouri. No. Cat. S7004. Se disolvió en Cloroformo:Metanol (2:1, v:v). Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Apéndice 2****Amortiguador de homogeneización**

620 mM sorbitol

50 mM Hepes/BTP (Bis-Tris propano) pH = 7.8

15 mM ácido ascórbico

3 mM EDTA

1 mM KCl

0.8% polivinilpirrolidona

0.2% BSA

AL momento de usar, agregar al amortiguador de homogenización:

Ditiotreitol (DTT) en una relación: 16  $\mu$ L/ 5 mL de amortiguador

Cocktail de inhibidores de proteasas en una relación: 115  $\mu$ L/ 5 mL de amortiguador

$\beta$ -Mercaptoetanol em una relación: 4.9  $\mu$ L/ 5 mL de amortiguador

**Cocktail de inhibidores de proteasas.**

0.01 mM Quimostatina

0.01 mM Leupeptina

0.1 mM Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF)

0.1 mM Na-Tosil-Lys-clorometilcetona (TLCK-HCl)

0.1 mM Na-Tosil-Phe-clorometilcetona (TPCK-HCl)

3 mM EDTA- $\text{Na}_2$

**Amortiguador de ajuste de peso**

620 mM Sorbitol

5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH = 7.8)

1 mM Ditiotreitol

0.1 mM EDTA

**Reactivos para TLC****Fase Móvil**

69.15 mL de  $\text{CHCl}_3$

26.6 mL  $\text{CH}_3\text{OH}$

4.2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2 M

**Solución de revelado**

Sulfato de cobre pentahidratado 15.6 g y 9.4 ml de Ácido fosfórico 85% en agua (w/v), aforar a 100 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

**Apéndice 3**

**Soluciones y condiciones para la inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF.**

- A. Disolución amortiguadora de transferencia para Réplica en Western.
  - a) 15 ml de una solución 1 M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 (se prepara tomando 7.5 mL de 1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 7.5 mL de 1M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
  - b) 200 mL de metanol reactivo analítico
  - c) 2.5 mL de una solución 20% de SDS
 Aforar todo lo anterior a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada
- B. Amortiguador pH 9.5 (PBS)
  - a) 12.1 g/L Trizma base
  - b) 5.8 g/L de NaCl
  - c) 1.0 g/L de  $\text{MgCl}_2$
 Ajustar a pH 9.5
- C. Disolución amortiguadora PBS con Tween 20 (PBS -Tween)
  - a) PBS .....900 mL.
  - b) Tween 20 al 0.1% v/v..... 100 mL.

Tabla 3. Condiciones para las incubaciones y revelado de las réplicas en Western

Tipo de anticuerpo utilizado	Solución Bloqueadora	Anticuerpo y condiciones de incubación	Solución del segundo anticuerpo y condiciones de incubación
14-3-3 isoforma $\beta$ de humano	2 % L* en PBS-Tween	1:1000 2 % L* en PBS-Tween En una bolsita a t. amb. Durante toda la noche	Fosfatasa alcalina 1:1000 en 2% L* en PBS-Tween. En recipiente a t. amb. durante 5 h
14-3-3 de Arabidopsis	2 % L* en PBS-Tween	1:1000 2% L* en PBS-Tween En una bolsita a t. amb. durante toda la noche	Fosfatasa alcalina 1:1000 en 2% L* en PBS-Tween En recipiente a t. amb. durante 2 h
Fosfo-treonina/serina	5% L en PBS-Tween**	1:1000 2% L** en PBS-Tween en una bolsita. Durante toda la noche a 4°C	Fosfatasa alcalina 1:1000 en 2% L** en PBS-Tween en recipiente a t. amb. durante 2 h

ATPasa de H <sup>+</sup> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrisera)	2% L* en PBS	1:1000 2% L* en PBS En una bolsita a t. amb. Durante toda la noche	Fosfatasa alcalina 1:1000 en 2% L* en PBS-Tween en recipiente a t. amb. durante 2 h
--	--------------	---	---

\* Leche descremada Svelty

\*\* Blot-Quickblocker

D. Solución patrón de NBT para desarrollar color.

- Preparar 1 mL de 70% de dimetilformamida (0.7 mL de DMF más 0.3 mL de agua bidestilada).
- Disolver 30 mg de NBT en la disolución de 70% de DMF. Guardar a 4 °C en un envase protegido de la luz, siendo estable por 2 meses.

E. Solución patrón de BCIP para desarrollar color.

- Disolver 15 mg de BCIP en 1 mL de dimetilformamida. Guardar a 4 °C en un envase protegido de la luz, siendo estable por 2 meses.

F. Mezcla para desarrollar color.

- Se prepara justo antes de ser usada.

Añadir 100 µL de solución de NBT y 100 µL de solución BCIP por cada 10 mL de disolución amortiguadora pH 9.5 (PBS).

#### Apéndice 4

Tabla 4. BLAST de la proteína 14-3-3 de la isoforma β de humano con las diferentes isoformas de la 14-3-3 de Arabidopsis.

Isoforma de Arabidopsis	Max score	E-value	Identidad Maxima	Peso (kDa)
14-3-3 GF14 Kappa	308	4E <sup>-105</sup>	63%	28.03
14-3-3 GF14 omega	308	7E <sup>-105</sup>	64%	29.16
14-3-3 GF14 chi	307	2E <sup>-104</sup>	64%	29.32
14-3-3 GF14 psi	304	3E <sup>-103</sup>	64%	28.60
<b>14-3-3 GF14 lambda</b>	<b>302</b>	<b>6E<sup>-103</sup></b>	<b>60%</b>	<b>27.98</b>
14-3-3 GF14 nu	298	8E <sup>-101</sup>	63%	29.82
14-3-3 GF14 phi	298	1E <sup>-100</sup>	63%	30.19
14-3-3 GF14 iota	296	4E <sup>-100</sup>	61%	30.55
<b>14-3-3 GF14 mu</b>	<b>294</b>	<b>3E<sup>-99</sup></b>	<b>59%</b>	<b>29.52</b>
<b>14-3-3 GF14 epsilon</b>	<b>289</b>	<b>2E<sup>-97</sup></b>	<b>59%</b>	<b>28.90</b>
14-3-3 GF14 upsilon	283	4E <sup>-95</sup>	60%	30.18
14-3-3 GF 14 omicron	---	---	---	28.78

\* Las isoformas marcadas en negritas son las que se expresan más en hojas

## Apéndice 5

Tabla 5. Analisis exhaustivo de glucosilceramidas de las vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* cuantificadas por HPLC-ESI MS/MS. Se muestra el contenido de glucosilceramida de acuerdo a las 4 tipos de BCL y los 10 tipos de ácidos grasos analizados en este trabajo, obteniéndose como resultado la cuantificación de 40 especies de glucosilceramidas. Los valores son el promedio de 6 determinaciones independientes de dos muestras diferentes de cada línea.

BCL ↓	Ácido graso →	16:0	18:0	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1	26:0	26:1	TOTAL
d18:0	Silvestre (wt)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Atlcb2a-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Atlcb2b hp/Atlcb2a (-)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
d18:1	Silvestre (wt)	337.96	0.00	0.00	0.00	8.88	0.00	21.87	53.16	4.74	3.45	429.26
	Atlcb2a-1	350.48	0.00	0.00	0.00	6.42	0.00	15.92	56.08	4.41	5.68	432.64
	Atlcb2b hp/Atlcb2a (-)	295.80	0.00	0.00	0.00	6.06	0.00	16.06	46.00	5.15	4.75	360.02
	Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)	328.21	0.00	0.00	0.00	6.60	0.00	21.11	56.10	6.63	5.77	421.67
t18:0	Silvestre (wt)	2.85	0.00	0.00	0.00	0.90	0.00	2.52	5.93	0.00	0.00	9.09
	Atlcb2a-1	4.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.01	1.83	0.15	0.00	7.94
	Atlcb2b hp/Atlcb2a (-)	2.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.75	4.83	0.00	0.00	9.55

	<b>At1cb2b hp/At1cb2a (+)</b>	3.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.78	5.38	0.00	0.00	11.46
<b>t18:1</b>	<b>Silvestre (wt)</b>	188.46	5.11	<b>13.88</b>	0.00	127.99	1.36	509.64	931.54	139.78	96.08	2013.16
	<b>At1cb2a-1</b>	205.86	5.24	<b>11.70</b>	0.00	114.86	0.00	407.16	1099.80	132.45	119.53	2089.87
	<b>At1cb2b hp/At1cb2a (-)</b>	158.12	3.91	<b>11.56</b>	0.00	107.22	0.00	355.94	840.18	128.51	87.60	1650.87
	<b>At1cb2b hp/At1cb2a (+)</b>	172.24	4.38	<b>9.84</b>	0.00	99.61	0.00	399.00	942.75	145.13	96.58	1869.05
<b>Total</b>	<b>Silvestre (wt)</b>	529.27	5.11	13.88	0.00	137.62	1.36	534.03	987.66	143.73	99.53	2451.51
	<b>At1cb2a-1</b>	559.88	5.24	11.70	0.00	120.21	0.00	422.43	1156.80	136.27	123.31	2529.13
	<b>At1cb2b hp/At1cb2a (-)</b>	456.02	3.91	11.56	0.00	111.79	0.00	371.15	882.54	132.80	90.77	2016.84
	<b>At1cb2b hp/At1cb2a (+)</b>	503.75	4.38	9.84	0.00	105.47	0.00	422.88	1004.23	151.03	101.07	2303.60

\* Los valores marcados en negritas son los que hubo una diferencia estadísticamente significativa en la línea *At1cb2b hp/At1cb2a (+)* con respecto a los controles (*silvestre*, *At1cb2a-1* y *At1cb2b hp/At1cb2a (-)*).

## BIBLIOGRAFÍA

- Alsterfjord M, Sehnke PC, Arkell A, Larsoon H, Svannelid F, Rosenquist M, Ferl RJ Sommarin M and Larsson C. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves. Evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H<sup>+</sup>-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol*, 45: 1202-1210 (2004).
- Antipova OV, Bartova LM, Kalashnikova TS, Obroucheva NV, Voblikova VD and Muromtsev GS. Fusicoccin-induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seeds. *Plant Physiol Biochem*, 41: 157-164 (2003).
- Axelsen KB, Venema K, Jahn T, Baunsgaard L and Palmgren MG. Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2: Mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry*, 38: 7227-7234 (1999).
- Baunsgaard L, Venema K, Axelsen KB, Villalba JM, Welling A, Wollenweber B and Palmgren MG. Modified plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. *Plant J*, 10: 451-458 (1996).
- Berkey R, Bendigeri D and Shunyuan X. Sphingolipid and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. *Front Plant Sci*, 3: 1-22 (2012).
- Bogdanov M, Xie J and Dowhan W. Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive inside rule. *J Biol Chem*, 284: 9637-9641 (2009).
- Bogdanov M, Heacock P, Guan Z and Dowhan W. Plasticity of lipid-protein interactions in the function and topogenesis of the membrane protein lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 107: 15057-15062 (2010).
- Borch J, Bych K, Roepstorff P, Palmgren MG and Fuglsang AT. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem Soc Trans*, 30: 411-415 (2002).
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, MacAskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS and Dupree P. Analysis of detergent resistant membranes in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 137: 104-116 (2005).
- Brauer D and Tu SI. Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol*, 89: 867-874 (1989).
- Buchanan B, Gruissem W and Jones RL. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville (2000) Pp 902-904.

- Bunney TD, van den Wijngaard PWJ and de Boer HA. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol Biol*, 50: 1041-1051 (2002).
- Bush DR. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 513-542 (1993).
- Buré C, Cacas JL, Wang F, Gaudin K, Domergue F, Mongrand S and Schmitter JM. Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25: 3131-3145 (2011).
- Callen J. Biología Celular. De las Moléculas a los Organismos. Primera edición. Compañía Editorial Continental. Ciudad de México (2000). Pp 353-485.
- Carmona-Salazar L, El Hafidi M, Enríquez-Arredondo C, Vázquez-Vázquez C, González de la Vara LE and Gavilanes-Ruíz M. Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Anal Biochem*, 417: 220-227 (2011).
- Chang Li Z and Bush DR.  $\Delta$ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves: II. Evidence for multiple aliphatic, neutral amino acid symports. *Plant Physiol*, 96: 1338-1344 (1991).
- Chen M, Hang G, Dietrich CR, Dunn TM and Cahoon EB. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the identification and functional characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*, 18: 3576-3593 (2006).
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB. Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20: 1862-1878 (2008).
- Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J and Gavilanes-Ruiz M, Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. En: *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*, (Wada H, Murata N, Govindjee, Eds) Pp 77-115 (2009).
- Chen M, Markham JE and Cahoon EB. Sphingolipid  $\Delta$ 8 unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. *Plant J*, 69: 769-781 (2012).
- Cocucci MC and Marre E. Lysophosphatidylcholine activated, vanadate-inhibited, Mg-ATPase from radish microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 771: 42-52 (1984).
- Contreras FX, Ernst AM, Haberkant P, Björkholm P, Lindahl E, Gönen B, Tischer C, Elofsson A, von Heijne G, Thiele C, Pepperkok R, Wieland F and Brügger B. Molecular recognition of a single sphingolipid species by a proteins transmembrane domain. *Nature*, 481: 525-529 (2012).

- Cooke DT, Burden RS, James CS, Seco T and Sierra B. Influence of sterols on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. *Plant Physiol*, 32: 769-773 (1994).
- Cornejo Granados MF. Contribución del nivel de proteína y de glicerolípidos a la activación de la ATPase de H<sup>+</sup> de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2011).
- Dietrich C, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM and Cahoon EB. 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 (2008).
- Dowhan W, Mileykovskaya E and Bogdanov M. Diversity and versatility of lipid-protein interaction revealed by molecular genetic approaches. *Biochim Biophys Acta*, 1666: 19-39 (2004).
- Duan J, Zhang J, Zhao Y, Yang F and Zhang X. Ganglioside GM2 modulates the erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase through its binding to the calmodulin-binding domain and its "receptor". *Arch Biochem Biophys*, 454: 155-159 (2006).
- Fantini J. How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *CMLS Cell Mol Life Sci*, 60: 1027-1032 (2003).
- Fu H, Subramanian R and Masters SC. 14-3-3 Proteins: Structure function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 617-647 (2000).
- Fuglsang AT, Borch J, Bych K, Jahn TP, Roepstorff P and Palmgren MG. The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem*, 278: 42266-42272 (2003).
- Gaigg B, Timischl B, Corbino L and Schneiter R. Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase of the cell surface of yeast. *J Biol Chem* 280: 22515-22522 (2005).
- Gaigg B, Toulmay A and Schneiter R. Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids per se are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. *J Biol Chem*, 281: 34135-34145 (2006).
- Gavilanes M, Sánchez S, Enríquez M y García O. Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia*, 46: 251-262 (1995).
- Gaxiola RA, Palmgren MG and Schumacher K. Plant proton pumps. *FEBS Lett*, 581: 2204-2214 (2007).

- Goldstein JL and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343: 425-430 (1990).
- Gomes E, Venema K, Simon-Plas F, Milat ML, Palmgren MG and Blein JP. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS Lett*, 398: 48-52 (1996).
- González-Romo P, Sánchez-Nieto S and Gavilanes-Ruíz M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal Biochem*, 200: 235-238 (1992).
- González-Reyes KM. Caracterización de la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2010).
- Grandmougin Ferjani A, Schuller Muller I and Hartmann MA. Sterol modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol*, 113: 163-174 (1997).
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M. Fumonisin B<sub>1</sub>, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 221: 589-596 (2005).
- Hartmann MA. Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci*, 3: 170-175 (1998).
- Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barret-Wilt G, Kline KG, Mohson SB, Young JC, Otegui MS and Sussman MR. Molecular characterization of mutant Arabidopsis plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biol Chem*, 285: 17918-17929 (2010).
- Holthuis JCM and Levine JP. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 6: 209-220 (2005).
- Jahn T, Fuglsang AT, Olsson A, Brüntrup IM, Collinge DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG and Larsson C. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell*, 9: 1805-1814 (1997).
- Janicka-Russak M, Kabata K, Wdowikowska A and Klobus G. Response of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to low temperature in cucumber roots. *J Plant Res*, 125: 291-300 (2012).
- Kanczewska J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud JL, Boutry M. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc Nat Acad Sci USA*, 102: 11675-11680 (2005).

- Kasamo K and Nouche I. The role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiate* L. (Mung bean) roots and hypocotyls. *Plant Physiol*, 83: 323-328 (1987).
- Kasamo K. Mechanism for activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) culture cells by molecular species of a phospholipid. *Plant Physiol*, 93: 1049-1052 (1990).
- Kasamo K and Sakakibara Y. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci*, 111: 117-131 (1995).
- Kasamo K. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res*, 116: 517-523 (2003).
- Kim HS, Oh JM, Luan S, Carlson JE and Ahn SJ. Cold stress causes rapid but differential changes in properties of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of camelina and rapessed. *J Plant Physiol*, 170: 828-837 (2013).
- Kimberlin AN, Majumder S, Han G, Chen M, Cahoon RE, Stone JM, Dunn TM and Cahoon EB. Arabidopsis 56-amino acid serine palmitoyltransferase-interacting protein stimulate sphingolipid synthesis, are essential, and affect mycotoxin sensitivity. *Plant cell*, 25: 4627-4639 (2013).
- Kinoshita T and Shimazaki KI. Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J*. 18: 5548-5558 (1999).
- Lange C, Nett JH, Trumpower BL and Hunte C. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex structure. *EMBO J*, 20: 6591-6600 (2001).
- Lee MCS, Hamamoto S and Schekman R. Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 277: 22395-22401 (2002).
- Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1666: 62-87 (2004).
- Lefebvre B, Furt F, Harmann MA, Michaelson LV, Cade JP, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule JJ and Mongrand S. 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 (2007).
- Li J, James ZM, Dong X, Karin CB and Thomas DD. Structural and functional dynamics of an integral membrane protein complex modulation by lipid headgroup charge. *J Mol Biol*, 418: 379-389 (2012).

- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ and Coaker G. RIN4 functions with plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *Plos Biol*, 7: 1-16 (2009).
- Liu M, Huang C, Polu SR, Schneiter R and Chang A. Regulation of sphingolipid synthesis through Orm1 and Orm2 in yeast. *J Cell Sci*, 125: 2428-2435 (2012).
- Luckey M. Structural Biology with Biochemical and Biophysical Foundations. Cambridge University Press. New York (2008) Pp 13-100.
- Lynch DV and Dunn TM. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol*, 161: 677-702 (2004).
- Markham JE, Cahoon EB and Jaworski JG. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, 281: 22684-22694 (2006).
- Mejía Hernández E. Contribución de los esfingolípidos a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en plantas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2010).
- Mendenhall W and Sincich T. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias. 4ta. Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana (1997) Pp 789-899.
- Michelet B and Boutry M. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol*, 108: 1-6 (1995).
- Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y and Uemura M. Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol*, 50: 341–359 (2009).
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R and Bessoule JJ. Lipid rafts in higher plants cells. *J Biol Chem*, 279: 36277-36286 (2004).
- Morales Cedillo F. Papel de la región del carboxilo terminal en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de plantas con menor contenido de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2012)
- Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule JJ, Blein JP and Simon-Plas F. Proteomics of plant detergent resistant membranes. *Mol Cell Proteomics*, 5: 1396-1411 (2006).
- Morsomme P and Boutry M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 1-16 (2000).
- Morsomme P, de Kerchove d'Exaerde A, De Meester S, Thines D, Goffeau A and Boutry M. Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H<sup>+</sup>-pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO J*, 15: 5513-5526 (1996).

- Morsomme P, Dambly S, Maudoux O and Boutry M. Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H<sup>+</sup>-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem*, 273: 34837-34842 (1998).
- Moss GP. The nomenclature of steroids: recommendations by the IUPAC–IUB joint commission on biochemical nomenclature. *Eur J Biochem*, 186: 429–458 (1989).
- Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 4ta. Edición, (2006) Pp 374.
- Nogi T, Fathir I, Kobayashi M, Nozawa T and Miki K. Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: thermostability and electron transfer. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 13561-13566 (2000).
- Ohlrogge J and Browse J. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 957-970 (1995).
- Olsson A, Johansson F, Sommarin M and Larsson C. Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant J*, 8: 959-962 (1998).
- Ottmann C, Marco S, Jaspert N, Marcon C, Schauer N Weyand, M Vandermeeren C, Duby G, Boutry M, Wittinghofer A, Rigaud JL and Oecking C. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol Cell*, 25: 427-440 (2007).
- Palmgren MG, Larsson C and Sommarin M. Proteolytic activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by removal of a terminal segment. *J Biol Chem*, 265: 13423-13426 (1990a).
- Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskow P and Larsson C. Effect of detergents on the H<sup>+</sup>-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1021:133-140 (1990).
- Palmgren MG. Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Physiol Plant*, 83: 314-323 (1991).
- Palmgren MG and Christensen G. Functional comparisons between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms expressed in yeast. *J Biol Chem*, 269: 3027-3033 (1994).
- Palmgren MG. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 817-845 (2001).
- Palmgren MG and Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 40: 243-266 (2011).
- Pata MO, Hannun YA and Ng C. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the sphinx. *New Phytol*, 185: 611-630 (2010).
- Pedersen BP, Buch-Pedersen M, Morth P, Palmgren MG and Nissen P. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450: 1111-1115 (2007).

- Pellici DG, Clarke AJ, Patel O, Mallevaey T, Beddoe T, Le Nours J, Uldrich AP, McCluskey J, Besra GS, Porcelli SA, Gapin L, Godfrey DI and Rossjohn J. Recognition of  $\beta$ -linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. *Nat Immunol*, 12: 827-833 (2011).
- Permyakov S, Suzina N and Valiakhmetov A. Activation of H<sup>+</sup>-ATPase of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose: the role of sphingolipid and lateral enzyme mobility. *PLoS one*, 7: 1-7 (2012).
- Piette AS, Derua R, Waelkens E, Boutry M and Duby G. A phosphorylation in the C-terminal auto-inhibitory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activates the enzyme with no requirement for regulatory 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, 286: 18474-18482 (2011).
- Portillo F. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, 1469: 31-42 (2000).
- Reyes-Mateo C, Gómez J, Villalaín J and González J. Protein-Lipid Interactions. First edition. Springer Series in Biophysics 9. Germany (2006). Pp 203-208.
- Roberts MR, Salinas J and Collinge DB. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol Biol*, 50: 1031-1039 (2002).
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I and Sánchez-Nieto S. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *J Expl Bot*, 63: 4513-4526 (2012).
- Saucedo-García M, González-Solís A, Rodríguez-Mejía P, Olivera-Flores TJ, Vázquez-Santana S, Cahoon EB and Gavilanes-Ruíz M. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Signal Behav*, 6: 1616-1619 (2011).
- Serrano R, Kielland-Brandt MC and Fink GR. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Nature*, 319: 689-693 (1986).
- Serrano R, Montesinos C and Sánchez J. Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Sci*, 56: 117-122 (1988).
- Shägger H and Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368-379 (1987).
- Skou JC and Esmann M. The Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*, 24: 249-261 (1992).
- Sondergaard TE, Schulz A and Palmgren MG. Energization of transport processes in plants. Role of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol*, 136: 2475-2482 (2004).

- Sperling P and Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1632: 1-15 (2003).
- Sperling P, Franke S, Luthje S and Heinz E. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes?. *Plant Physiol Biochem*, 43: 1031-1038 (2005).
- Speth C, Jaspert N, Marcon C, Oecking C. Regulation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by its C-terminal domain: What do we know for sure?. *Eur J Cell Biol*, 89: 145-151 (2010).
- Steponkus PL and Lynch DV. Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *J Bioenerg Biomembr*, 21: 21-41 (1989).
- Stryer L, Berg J y Tymoczko J. Bioquímica 5<sup>o</sup> edición, Ed. Reverté. Barcelona, 2004, Pp 320-341.
- Sullards MC, Lynch DV, Merrill AH Jr and Adams J. Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 35: 347-353 (2000).
- Toledo MS, Suzuki E, Handa K and Hakomori S. Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*, 280: 16227-16234 (2005).
- Toulmay A and Schneider R. Lipid dependent surface transport of the proton pumping ATPase: A model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie*, 89: 249-254 (2007).
- Uemura M, Joseph RA and Steponkus PL. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol*, 109: 15-30 (1995).
- Vázquez Vázquez CA. Mecanismo de inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática por disminución de ceramidas endógenas en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM (2007).
- Van der Poel S, Wolthoorn J, van den Heuvel D, Egmond M, Groux-Degroote S, Neumann S, Gerritsen H, van Meer G and Sprong H. Hyperacidification of trans-Golgi network and endo/lysosomes in melanocytes by glucosylceramide-dependent V-ATPase activity. *Traffic*, 12: 1634-1647 (2011).
- Vance DE and Vance JE. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 4<sup>o</sup> edition, 2002. Elsevier Science, B.V. New York.
- Vitrac H, Bogdanov M, Heacock P and Dowhan W. Lipids and topological rules of membrane protein assembly: Balance between long and short range lipid-protein interactions. *J Biol Chem*, 286: 15182-15194 (2011).

- Wang XQ, Sun P, Al-Qamari A, Tai T, Kawashima I and Paller AS. Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5) beta(1) function. *J Biol Chem*, 276: 8436-8444 (2001).
- Wang XQ, Sun P and Paller AS. Ganglioside induces caveolin-1 redistribution and interaction with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 277: 47028-47034 (2002).
- White PJ, Cooke DT, Earnshaw MJ, Clarkson DT and Burden RS. Does plant growth temperature modulate the membrane composition and ATPase activities of tonoplast and plasma membrane fractions from rye roots?. *Phytochemistry*, 29: 3385-3393 (1990).
- Zhang JH, Liu YP, Pan QH, Zhang JC, Wang XQ and Huang WD. Changes in membrane-associated H<sup>+</sup>-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Sci*, 170: 768-777 (2006).