



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA INDUCIDA POR ACUMULACIÓN DE BASES DE CADENA LARGA EN *Arabidopsis thaliana*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Q.F.B. Cinthya Rocío Tapia de Aquino**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marina Gavilanes Ruiz  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Rolando Hernández Muñoz  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

MÉXICO, D. F. MARZO, 2015



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	Dra. Lourdes Massieu Trigo
VOCAL	Dr. Roberto Coria Ortega
VOCAL	Dr. Eleazar Martínez Barajas
VOCAL	Dr. Francisco Ruiz Terán
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 Ruiz

SUSTENTANTE: Q.F.B. Cinthya Rocío Tapia de Aquino

## RECONOCIMIENTOS

A la Q.F.B. Ma. del Consuelo Enríquez Arredondo (Facultad de Química, UNAM) por su asesoría en las técnicas de laboratorio y a la M. C. Laurel Fabila Ibarra por su ayuda en el mantenimiento y manejo de plantas..

Al Dr. Diego González Halphen y el M.C. Rodolfo Paredes (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) por los ensayos de microscopía electrónica de transmisión.

A los Dres. Edgar B. Cahoon, de la Universidad de Nebraska por la línea de *Arabidopsis lcb2a-1* y al Dr. Néstor Carrillo, de la Universidad de Rosario por la línea de *Arabidopsis pfl18-18*.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado por las becas otorgadas para la asistencia a congresos.

A los miembros del comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis:  
Dra. Marina Gavilanes Ruiz de la Facultad de Química, UNAM. Asesora.  
Dr. Mohamed El Hafidi del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".  
Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

\*\*\*\*\*

La Q.F.B. Cinthya Rocío Tapia de Aquino realizó esta tesis de maestría gracias a una beca de CONACYT (Registro No. 484326).

\*\*\*\*\*

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de la DGAPA (UNAM) proyectos PAPIIT IN211409 e IN222815, y de la Facultad de Química, proyecto PAIP 5000 9115.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a todas las personas que con su ayuda, su apoyo y su cariño me fue posible concluir este proyecto.

¡Gracias! :D

A mis padres Constantina de Aquino Lara y Jaime Tapia Laguna por sus consejos, su guía y su amor incondicional.

A mis hermanos Pablo, Mauricio y Ana Margarita.

A mis primos Fany, Diana, Luis Enrique, Diego, Juanito, Emanuel y Julio César.

A mis tíos Rogelio, David, Juan, Julio, Enrique, Emiliano, Lucy, Martha, Margarita Tapia y Margarita Morales.

A mis queridos amigos Francisco, Claudia, Dora, Carmen Nallely, Daniela, Rubén, Sofía, Christina, Atzin y Heidi, ya que hemos ido evolucionando juntos a lo largo de los años desde que entramos a esta increíble Facultad, estoy muy agradecida por tener amigos como ustedes.

A mis amigos Ariadna, Paulina, Anabel, Lizbeth Helena, Alfredo Javier, Abraham, Diana, Erick, Ilián, Araceli, Manuela, Maru, José y Eduardo del Departamento de Bioquímica.

A Consuelo Enríquez por su ayuda invaluable, su paciencia y sus consejos.

A mis amiguitos ingenieros Gerardo y Erick Roy.

A la Dra. Sobeida Sánchez y al Dr. Javier Plasencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Finalmente y de manera muy especial quiero agradecer a la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por todos sus consejos, por su confianza y su generosidad. Gracias Dra!! de usted he aprendido muchísimo a lo largo de estos años. Me siento muy afortunada de haber llegado a su laboratorio y que me abriera las puertas, ya que ahí no solo encontré amigos, también encontré oportunidades y enseñanzas que me convirtieron en una mejor persona.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	
2.1. Generalidades de estructura y función del retículo endoplásmico.....	2
2.1.1. Síntesis y plegamiento de proteínas.....	3
2.1.2. Glicosilación del extremo N-terminal.....	5
2.1.3. Ciclo de pegamiento calnexina/calreticulina.....	6
2.1.4. Formación de puentes disulfuro.....	6
2.2. Esfingolípidos.....	7
2.2.1. Estructura de los esfingolípidos.....	7
2.2.2. Esfingolípidos complejos.....	8
2.2.3. Síntesis <i>de novo</i> .....	8
2.3. Muerte celular programada.....	10
2.3.1. Muerte celular vacuolar.....	11
2.3.1.1. El papel de la vacuola en la muerte celular programada.....	11
2.3.1.2. Muerte celular programada mediada por la fusión de la membrana plasmática y el tonoplasto .....	11
2.3.1.3. Muerte celular programada mediada por la destrucción de la vacuola.....	12
2.3.1.4. Enzima de procesamiento vacuolar .....	12
2.3.2. Muerte celular programada mediada por bases de cadena larga.....	13
2.4. El estrés de retículo endoplásmico.....	14
2.4.1. La respuesta a proteínas desplegadas y los mecanismos que abaten el estado de estrés de retículo endoplásmico.....	15
2.4.2. La respuesta a proteínas desplegadas en plantas.....	16
2.4.3. El estrés de retículo endoplásmico y la muerte celular programada.....	17
<b>3. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>6. OBJETIVO.....</b>	<b>23</b>
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>23</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
8.1. Reactivos especiales.....	24
8.2. Material biológico.....	24
8.3. Germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24

8.4. Tratamiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
8.5. Registro fotográfico del fenotipo. ....	26
8.6. Visualización de la ultraestructura celular por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	26
8.7. Toma de muestra de los tejidos vegetales expuestos a los tratamientos.....	27
8.8. Obtención de la fracción soluble .....	27
8.9. Determinación de proteína de la fracción soluble por el método de Bradford.....	28
8.10. Separación electroforética desnaturizante. ....	30
8.10.1. Preparación de geles de poliacrilamida. ....	30
8.10.2. Tinción de geles con azul de Coomassie.....	31
8.10.3. Western blot.....	31
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
9.1. Caracterización fenotípica del efecto del tratamiento con TM de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de genotipo silvestre.....	33
9.2. Comparación fenotípica del efecto del tratamiento con TM y FB <sub>1</sub> en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de genotipo silvestre. ....	35
9.3. Análisis del efecto en la ultraestructura celular de la exposición a TM o a FB <sub>1</sub> en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de genotipo silvestre.....	37
9.4. Efecto del tratamiento con TM en el desarrollo de las raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de genotipo silvestre.....	40
9.5. Efecto del tratamiento con FB <sub>1</sub> en el desarrollo de las raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de genotipo silvestre.....	42
9.6. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB <sub>1</sub> en el fenotipo de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>lcb2a-1</i> .....	44
9.7. Análisis del efecto en la ultraestructura celular de la exposición a TM o a FB <sub>1</sub> en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>lcb2a-1</i> .....	46
9.8. Comparación del efecto de los tratamientos con TM y FB <sub>1</sub> en el fenotipo de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>pfl18-18</i> .....	49
9.9. Determinación de la expresión de la proteína luminal de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de genotipo silvestre expuestas a TM y FB <sub>1</sub> . ....	51
9.10. Determinación de la expresión de la proteína luminal de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>lcb2a-1</i> expuestas a TM y FB <sub>1</sub> . ....	54
9.11. Determinación de la expresión de la proteína luminal de unión como marcador de	

estrés de RE en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>pfl18-18</i> expuestas a TM y FB <sub>1</sub> . .....	56
<b>10. DISCUSIÓN</b>	
10.1. Caracterización fenotípica del efecto del tratamiento con TM de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo silvestre.....	58
10.2. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB <sub>1</sub> en el fenotipo y en la ultraestructura de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo silvestre.....	59
10.3. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB <sub>1</sub> en el desarrollo de las raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo silvestre.....	61
10.4. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB <sub>1</sub> en el fenotipo y en la ultraestructura de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>lcb2a-1</i> .....	63
10.5. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB <sub>1</sub> en el fenotipo de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>pfl18-18</i> . .....	65
10.6. Determinación de la expresión de la proteína de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo silvestre expuestas a TM y FB <sub>1</sub> .....	67
10.7. Determinación de la expresión de la proteína de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>lcb2a-1</i> expuestas a TM y FB <sub>1</sub> .....	69
10.8. Determinación de la expresión de la proteína de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea <i>pfl18-18</i> expuestas a TM y FB <sub>1</sub> . .....	70
10.9. Señalización de la muerte celular programada en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	71
<b>11. RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	73
<b>12. CONCLUSIÓN</b> .....	73
<b>13. PERSPECTIVAS</b> .....	74
<b>14. APÉNDICE</b> .....	75
<b>15. REFERENCIAS</b> .....	76



## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Ácido abscísico
Avr	Avirulencia
BCL	Base de cadena larga
BiP	Proteína luminal de unión
CNX	Calnexina
CoA	Coenzima A
CRT	Calreticulina
d18:0	Esfinganina
d18:0-P	Esfinganina-1-fosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EN	Envoltura nuclear
EPN	Espacio perinuclear
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FB <sub>1</sub>	Fumonisinina B1
Fld	Flavodoxina
GIPCs	Glicosilinositol fosfoceramidas
GlcCers	Glucocerebrósidos
HPLC	High performance liquid chromatography
IPCs	Inositol fosfoceramidas
MCP	Muerte celular programada
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MNE	Membrana nuclear externa
MNI	Membrana nuclear interna
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
NADPH	Nicotinamida
OST	Oligosacaril transferasa
PDI	Proteína disulfidoisomerasa
PN	Poros nucleares
PR	Proteína relacionada con patógenos
Pst DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>
RE	Retículo endoplásmico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPT	Serina palmitoiltransferasa
TBS	Amortiguador tris buffer salino
TM	Tunicamicina
TMV	Virus del mosaico del tabaco
UGGT	UDP-glucosa: glucosiltransferasa de glucoproteínas
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas
VLCFA	Very long chain fatty acid

## 1. RESUMEN.

La respuesta de hipersensibilidad es una respuesta que induce la muerte celular programada (MCP) tras la infección de ciertos patógenos y es una respuesta que confiere inmunidad a la planta al evitar que la infección prospere y ésta sea colonizada (Agrios 1997). La vía de transducción de señales que conducen a la MCP no se ha descrita, sin embargo se ha relacionado con el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma, la acumulación de bases de cadena larga (BCL), la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la activación de la cinasa MPK6 (Saucedo-García *et al.* 2011) y la enzima de procesamiento vacuolar ( $\gamma$ VPE) (Hatsugai *et al.* 2004; Kuroyanagi *et al.* 2005). Recientemente otra vía de MCP se ha identificado en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), la vía de MCP inducida por estrés de retículo endoplásmico (RE), en la que la acumulación de proteínas desplegadas y el estrés de RE se desencadena frente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Esta vía de MCP también es de tipo vacuolar y requiere de la ruptura del tonoplasto y de la activación de la enzima  $\gamma$ VPE (Qiang *et al.* 2012).

Este trabajo tiene como objetivo conocer otros eventos de señalización de la vía de MCP medida por BCL y se estudió al estrés de RE como un posible evento de señalización de esta vía. Para determinar si el estrés de RE estaba relacionado con la vía de muerte mediada por BCL se indujo acumulación de BCL y estrés de RE por exposición a fumonisina B1 ( $FB_1$ ) y tunicamicina (TM) respectivamente, en plántulas de *A.thaliana* de genotipo silvestre y de las líneas *lcb2a-1* y *pfl18-18* y se compararon los efectos de ambos tratamientos en el fenotipo de la porción aérea de las plántulas, la ultraestructura celular y la expresión de la proteína luminal de unión (BiP) como marcador de estrés de RE. Se encontró que para las plántulas de genotipo silvestre el efecto del tratamiento con  $FB_1$  y TM en el fenotipo de la porción aérea de las plántulas y en la ultraestructura celular son similares en ambos tratamientos, sin embargo, la exposición a  $FB_1$  no fue capaz de inducir la expresión de BiP. Sin embargo cuando se indujo estrés de RE en plántulas de la línea *lcb2a-1*, que producen menos BCL y en la línea *pfl18-18*, que producen menos ERO en el cloroplasto, las plántulas presentaron menor daño, así como una menor expresión de BiP respecto a las plántulas de genotipo silvestre, evidenciando la importancia de las BCL y las ERO como segundos mensajeros de la vía de MCP inducida por estrés de RE. Aunque las evidencias experimentales son insuficientes, se sugiere que la ambas vías de MCP tanto la mediada por BCL y la inducida por estrés de RE están relacionadas, tratándose de una sola vía que culmina con la ruptura del tonoplasto.

## 2. INTRODUCCIÓN.

La muerte celular programada (MCP) es un mecanismo celular muy importante en las plantas, ya que se presenta durante diversos procesos tanto de desarrollo como de estrés, son ejemplos de ellos la formación de gametos, la senescencia y la defensa contra patógenos, entre otros. A un tipo particular de MCP que se produce en la defensa contra patógenos se le denomina respuesta de hipersensibilidad. Esta es una respuesta que le confiere inmunidad a la planta infectada por un patógeno al evitar que la infección prospere y la planta sea colonizada. Por ello, el conocimiento de los sucesos moleculares que desencadenan esta respuesta en la planta es muy importante y por lo tanto, estudiarlos es de nuestro particular interés. A continuación se presenta la información general y los antecedentes encontrados en la literatura que nos llevan a plantear este estudio y que tiene el objetivo de caracterizar y entender el mecanismo de la vía de MCP mediada por bases de cadena larga (BCL).

### 2.1. Generalidades de estructura y función del retículo endoplásmico.

El retículo endoplásmico (RE) es un sistema endomembranoso muy dinámico, que se distribuye a través de todo el citosol, y está constituido por membranas laminares con ribosomas unidos a ellas que dan lugar a la formación de cisternas. Éstas conforman el RE rugoso y la red de membranas tubulares, componen el RE liso. El RE posee principalmente tres regiones morfológicas distintas, las membranas de la lámina nuclear, la extensa red de túbulos periféricos interconectados y las láminas periféricas del RE. La envoltura nuclear (EN) es un dominio del RE conformado por dos extensas bicapas de membranas planares, la membrana nuclear interna (MNI) y la externa (MNE). Ambas, MNI y MNE están separadas por el espacio perinuclear (EPN), pero están conectadas una con la otra por los poros nucleares (PN) (Hetzer *et al.* 2005). El RE periférico está conectado a la MNE como una extensa red de cisternas y túbulos que se extiende por todo el citoplasma hasta la membrana plasmática. El lumen del RE periférico es continuo con el lumen del EPN.

El RE rugoso se caracteriza por la presencia de ribosomas unidos a la superficie de la membrana, que forma láminas y cisternas. El RE rugoso es fundamental para la vía de secreción de proteínas, ya que asiste a la síntesis de proteínas solubles y transmembranales del RE, el Aparato de Golgi, la vacuola, la membrana plasmática y el espacio extracelular. Por otro lado el RE liso tiene entre sus principales funciones la síntesis de lípidos.

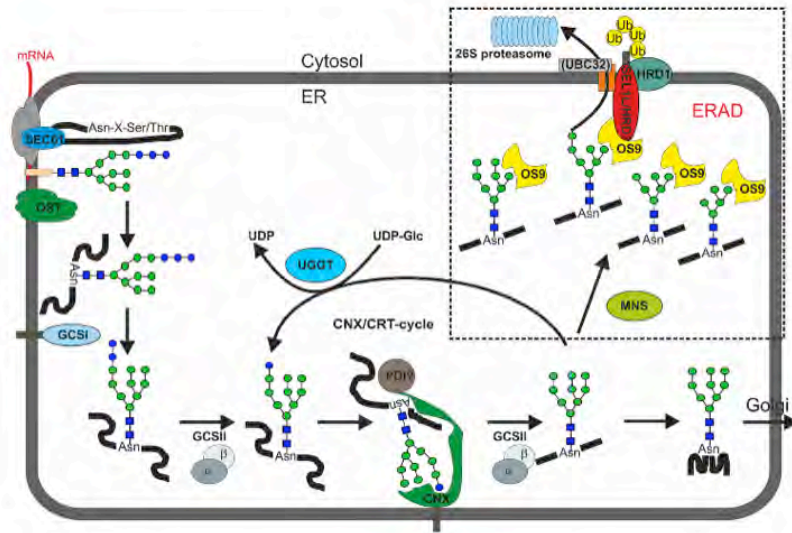
El RE posee regiones que están en estrecha asociación con otros organelos de la célula, la membrana plasmática, el aparato de Golgi, la vacuola, mitocondrias, cloroplastos y

peroxisomas. Estas interacciones son funcionalmente importantes, ya que estos sitios están relacionados con el transporte no vesicular de lípidos y esteroides sintetizados en el RE entre las membranas de los organelos adyacentes y con la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  entre organelos (Friedman y Voeltz 2011).

### **2.1.1. Síntesis y plegamiento de proteínas.**

En todos los eucariontes el RE tiene un papel central en el plegamiento de proteínas y la maduración de las proteínas membranales y de secreción. Tras su translocación al RE, los polipéptidos son inmediatamente sujetos al plegamiento y a modificaciones como la formación de puentes disulfuro, la glicosilación y el ensamble de las subunidades de los complejos multiprotéicos. Las proteínas cuyo destino son el lumen o las membranas de los organelos, o la membrana plasmática o el exterior de la célula son translocadas primero al RE para ser plegadas y luego transportadas a sus organelos correspondientes o al aparato de Golgi donde sufrirán subsecuentes modificaciones post-traduccionales.

Tras el inicio de la síntesis de proteínas, el péptido señal en el extremo *N*-terminal de la proteína dirige a la proteína naciente al RE. El péptido señal, que es translocado por el complejo Sec61, es escindido co-traduccionalmente por las peptidasas señal del lumen del RE, un paso que puede ser crítico para el proceso de plegamiento (Coleman *et al.* 1995; Vitale y Denecke 1999). Tras su ingreso al lumen del RE, las chaperonas y cochaperonas se unen a las cadenas polipeptídicas crecientes para protegerlas de la agregación, dándoles el tiempo suficiente para plegarse y prevenir su colapso hacia estructuras no nativas. Unidades de oligosacáridos son añadidas a las proteínas con sitios de reconocimiento de glicosilación, la presencia y modificación de esas unidades funcionan como señales para el reconocimiento del péptido por la maquinaria de plegamiento calnexina/calreticulina. El monitoreo del plegamiento de las proteínas y la modificación de los oligosacáridos es un proceso de control de calidad que determina si una proteína puede ser exportada al Aparato de Golgi o dirigida a su degradación (Hubbard e Ivatt 1981).



Esquema representativo de la N-glicosilación y plegamiento en el lumen del RE. CNX: calnexina, CRT: calreticulina, ERAD: degradación asociada al retículo endoplásmico, GCSI:  $\alpha$ -glucosidasa I, GCSII:  $\alpha$ -glucosidasa II, MNS:  $\alpha$ -manosidasa, OST: complejo oligosaciltransferasa, PDI: proteína disulfidoisomerasa, Ub: ubiquitina, UGGT: UDP-glucosa:glucoproteína glucosiltransferasa. (Huttner y Strasser 2012).

El plegamiento de las proteínas, en particular en el RE, es asistido por proteínas chaperonas y cochaperonas. Las chaperonas son proteínas que interactúan transitoriamente con otras proteínas en estado no nativo para ayudarlas a adquirir un estado nativo. Las chaperonas no dirigen el resultado del proceso de plegamiento, pero sí aumentan la eficiencia del proceso (Hartl y Hayer-Hartl 2009). El principal papel de las chaperonas es prevenir la agregación de las proteínas, que al encontrarse en un ambiente con gran cantidad de intermediarios proteicos, puede derivar en una formación de agregados a través de interacciones hidrofóbicas no específicas entre ellos.

La proteína luminal de unión (BiP), un miembro de la familia de chaperonas HSP70, es la proteína chaperona más abundante en el RE. Se encuentra asociada con el complejo de translocación Sec61, e interactúa co-traduccionalmente con las proteínas nacientes (Kleizen y Braakman 2004). La proteína BiP puede unirse a los intermediarios de plegamiento de muchas proteínas, debido a su capacidad de unirse a los péptidos hidrofóbicos que en su estado plegado forma láminas- $\beta$  localizadas en el núcleo hidrofóbico de la proteína en su estado nativo (Flynn *et al.* 1991). Adicionalmente, tiene un sitio de unión a nucleótido en su dominio N-terminal y tiene actividad de ATPasa. En su estado de unión a ADP, la proteína BiP tiene alta afinidad para unir proteínas en su dominio de unión a sustrato en el C-terminal (Flynn *et al.* 1989). La unión entre la proteína BiP y las proteínas blanco es revertida por la unión a ATP a

través de un intercambio de nucleótido (Wei *et al.* 1995); por lo tanto, ciclos de hidrólisis de nucleótidos y su intercambio dirigen la unión y liberación de las proteínas sustrato, que se encuentran desplegadas o plegadas erróneamente, un proceso que finaliza cuando las secuencias hidrofóbicas en la proteína sustrato son plegadas e internalizadas en el núcleo hidrofóbico de la proteína (Gething 1999).

El genoma de *A. thaliana* tiene tres genes BiP: *At-BiP1*, *At-BiP2* y *At-BiP3*. *At-BiP1* y *At-BiP2* son casi idénticos en su secuencia de aminoácidos, ambos son expresados en toda la planta y son inducidos por agentes que causan estrés de RE, tales como tunicamicina y DTT (Liu *et al.* 2007; Iwata *et al.* 2008) y por calor (Gao *et al.* 2008). *At-BiP3* se expresa normalmente a niveles mucho menores, pero es altamente inducido por agentes causantes de estrés de RE en plántulas (Martínez y Crispeels 2003; Liu *et al.* 2007; Iwata *et al.* 2008). La sobreexpresión de los genes de BiP en las plantas también se ha demostrado bajo otros tipos de estrese ambiental, como sequía (Figueiredo *et al.* 1997), bajas temperaturas (Anderson *et al.* 1994) y el ataque de insectos y patógenos (Jelitto-Van Dooren *et al.* 1999). Adicionalmente, se ha reportado que la sobreexpresión de BiP confiere tolerancia a la sequía en plantas de soya (*Glycine max*; Valente *et al.* 2009) y tabaco (*Nicotiana tabacum*; Alvim *et al.* 2001). Por otro lado, la mutación en *At-BiP2* genera plantas más sensibles al ataque de los patógenos, resultando en la inducción de PR1 y relacionando así a la vía secretoria con la vía de resistencia sistémica adquirida (Wang *et al.* 2005).

### **2.1.2. Glicosilación del extremo N-terminal.**

La glicosilación es una importante modificación post-traducciona ya que estabiliza a algunas proteínas y evita su desnaturalización y proteólisis, mejora su solubilidad y sirve como señal de reconocimiento para las enzimas del sistema de control de calidad del RE (Hammond *et al.* 1994; Ceriotti *et al.* 1998; Helenius y Aebi 2004).

Las proteínas nascentes que entran al lumen de RE que poseen las secuencias o motivos blanco de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) son reconocidas por la oligosacariltransferasa (OST), posteriormente las unidades de oligosacáridos Glc3Man9GlcNAc2 unidas a lípidos acarreadores (dolicol-pirofosfato) son transferidos en conjunto por la OST al grupo amida del residuo Asn en el motivo blanco de glicosilación (Kornfeld y Kornfeld 1985). La enzima OST es una proteína multimérica, en levadura ésta consta de 8 subunidades, de las cuales 5 son esenciales. *A. thaliana* posee homólogos para las 5 subunidades esenciales: DAD1 y DAD2

(Ost1 y Ost2 en levadura), STT3A y STT3B (Stt3 en levadura, DGL1 (Wbp1 en levadura) y HAP6 (Swp1 en levadura) (Ruiz-Canada *et al.* 2009).

### **2.1.3. Ciclo de plegamiento calnexina/calreticulina.**

Las proteínas calnexina (CNX) y calreticulina (CRT) son fundamentales para el plegamiento de los péptidos en el RE. Una vez que el péptido nascente ha adquirido el oligosacárido en el extremo N-terminal por la enzima OST, las enzimas glucosidasas I y II remueven del oligosacárido el residuo de glucosa 14 (G14) y 13 (G13) respectivamente. El péptido con el oligosacárido con un residuo de glucosa G12 se une a CNX y/o CRT que protegen las regiones hidrofóbicas de los péptidos nascentes, evitando que formen agregados oligoméricos (Ruddock y Molinari 2006). La CRT es una proteína soluble en el lumen del RE y CNX es una proteína con un dominio transmembranal. En *Arabidopsis* hay tres isoformas de CRT y dos de CNX. El extremo N-terminal de ambas proteínas son dominios globulares de sándwich  $\beta$  que interactúan con el residuo de glucosa 12 del oligosacárido de la glicoproteína nascente (Navazio *et al.* 2002).

Las glicoproteínas son liberadas de CNX o CRT por la acción posterior de la glucosidasa II que corta el residuo de glucosa 12 (G12), dejando un oligosacárido no glicosilado. Las proteínas liberadas que no han sido plegadas correctamente, son glicosiladas nuevamente por la enzima UDP-glucosa: glucosiltransferasa de glicoproteínas (UGGT) que adiciona nuevamente el residuo de glucosa 12 para comenzar otro ciclo de plegamiento CNX/CRT (Liu y Howell 2010).

### **2.1.4. Formación de puentes disulfuro.**

Durante el ciclo de plegamiento CNX/CRT se forman los puentes disulfuro de las proteínas mediante la oxidación y reducción catalizada por la proteína disulfidoisomerasa (PDI) y otras tiodisulfido oxidoreductasas. La formación de puentes disulfuro requiere de equivalentes oxidantes que son provistos por la oxidoreductasa de RE, AERO1 y AERO2 en *A. thaliana* (Ero1p en levadura) (Dixon *et al.* 2003). En levaduras Ero1p es una proteína asociada a la membrana del RE que contiene un grupo prostético de flavina que transfiere electrones directamente al oxígeno molecular (Sevier y Kaiser 2006).

## 2.2. Esfingolípidos.

Los esfingolípidos son componentes esenciales del sistema endomembranoso en plantas y otros eucariontes ya que constituyen  $\geq 40\%$  de los lípidos de la membrana plasmática (Verhoek *et al.* 1983; Yoshida y Uemura 1986; Haschke *et al.* 1990; Sperling *et al.* 2005; Laloi *et al.* 2007). Sin embargo, los esfingolípidos no solo son componentes cuantitativamente importantes, también cumplen funciones significativas en los procesos asociados a las endomembranas y en la señalización mediada por ácido abscísico (ABA) para el cierre de los estomas (Ng *et al.* 2001), en la muerte celular programada (MCP) (van Door y Woltering, 2005; Shi *et al.* 2007), entre otros.

### 2.2.1. Estructura de los esfingolípidos.

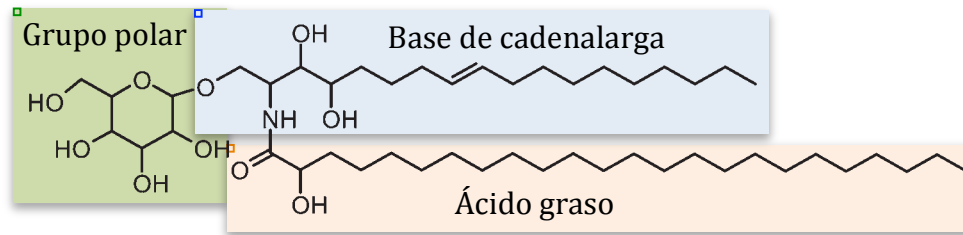
Los esfingolípidos son moléculas anfífilas que contienen un grupo polar y dos cadenas acílicas hidrofóbicas. La porción hidrofóbica de los esfingolípidos se compone de una ceramida que a su vez se constituye en un ácido graso de 16 a 26 átomos de carbono unido a una BCL mediante un enlace amida. Las BCL son moléculas formadas por una molécula de serina y un ácido graso, típicamente ácido palmítico (16:0). En las plantas las BCL contienen frecuentemente 18 átomos de carbono y se caracterizan por la presencia de 2 o 3 grupos hidroxilo en las posiciones C1, C3 y C4 y un grupo amino en la posición C2.

La BCL inicial producida en plantas es esfinganina (dihidroesfingosina d18:0) cuya cadena hidrocarbonada está completamente saturada y contiene dos grupos hidroxilo. Esta BCL puede ser modificada posteriormente por la adición de un grupo hidroxilo en el C4 formando 4-hidroxi esfinganina (o fitoesfingosina, t18:0) o por la introducción de dobles ligaduras entre los átomos C4 y C5 (trans) o C8 y C9 (cis o trans).

Los ácidos grasos de los esfingolípidos de plantas tienen una longitud típica de 16 a 26 átomos de carbono y pueden presentar insaturaciones con un doble enlace en cis (Imai *et al.* 2000), sin embargo también hay una pequeña cantidad de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs) y con números impares de átomos de carbono (21, 23 y 25 C) (Sastry y Kates 1964; Carter y Koob 1969).



Debido a las diferentes modificaciones que pueden sufrir las BCL, existe una gran diversidad de éstas, sin embargo, la BCL más abundante en los esfingolípidos de las plantas es la esfinganina, la 4- hidroxiesfinganina, 4-hidroxi $\Delta$ cis/trans esfinganina ( $\Delta$ 8cis/trans-t18:1) y esfingadieno ( $\Delta$ 4trans-,  $\Delta$ 8cis/trans-d18:2) (Lynch y Dunn, 2004). La gran mayoría de las BCL se encuentran en ceramidas, sin embargo una pequeña cantidad es detectable en las plantas como BCL en forma libre o como ésteres de fosfato (Markham y Jaworski 2007).



Estructura representativa de un esfingolípido complejo.

### 2.2.2. Esfingolípidos complejos.

La porción hidrofílica o grupo polar de los esfingolípidos complejos se encuentra unida al C1 de la BCL que compone a la ceramida. Una gran variedad de diferentes grupos polares pueden ser encontrados en las cabezas polares de los esfingolípidos complejos en eucariontes incluyendo simples residuos de carbohidratos de glucosa o galactosa, presentes en glucosilceramidas o galactosilceramidas respectivamente, u oligosacáridos compuestos de varios residuos de carbohidratos como los que se encuentran en los gangliósidos. Los esfingolípidos también pueden tener otros grupos polares como la fosfocolina, presente es la esfingomielina, o fosfoinositol. En plantas, las dos principales clases de esfingolípidos complejos son los glucocerebrosidos (GlcCers), que conforman aproximadamente el 30% de los esfingolípidos totales en las plantas y las glicosilinositol fosfoceramidas (GIPCs) que conforman el 60-65 % (Carter *et al.* 1958, 1960; Kaul y Lester 1975; Markham *et al.* 2006).

### 2.2.3. Síntesis *de novo*.

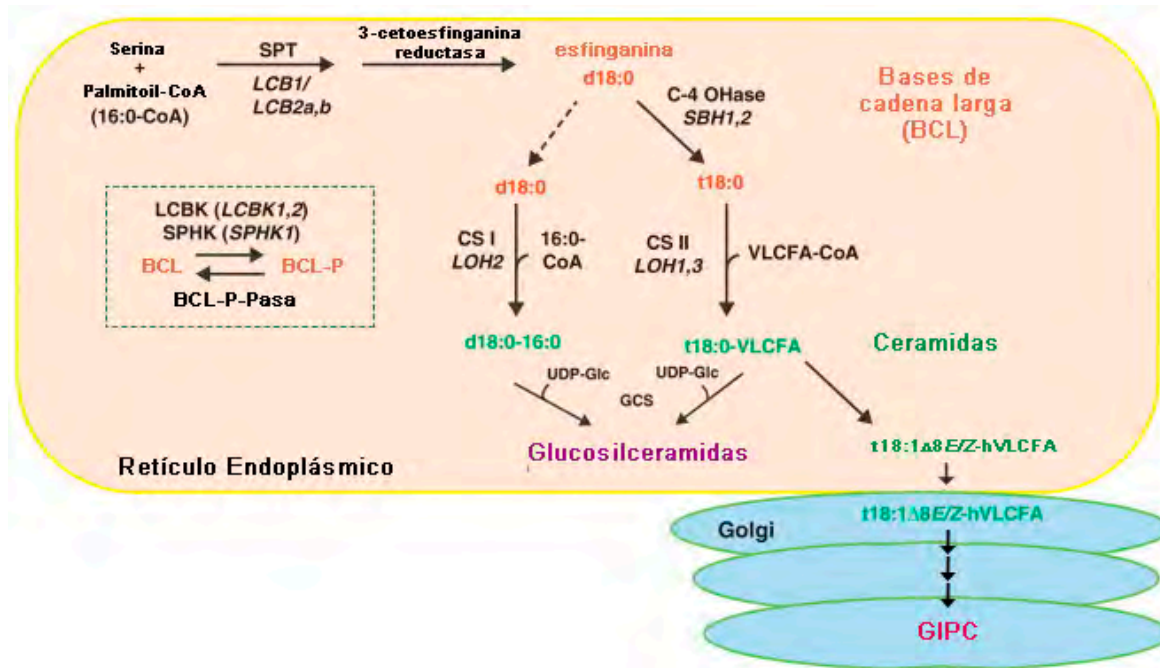
La síntesis de esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y el Aparato de Golgi. La síntesis comienza en el RE con la síntesis de la BCL con la formación de 3-cetoesfinganina a partir de palmitoil CoA y serina mediante la actividad de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) que es miembro de la subfamilia de sintasas de  $\alpha$ -oxamina dependientes de fosfato de

piridoxal. La SPT de *Arabidopsis* es un tetrámero que consta de un homodímero de subunidades LCB1 y un heterodímero de las subunidades LCB2a y LCB2b (Tamura *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006; Dietrich *et al.* 2008). Posteriormente la 3-cetoesfinganina se convierte en esfinganina (d18:0) mediante la 3-cetoesfinganina reductasa.

La esfinganina puede originar otras bases modificadas como la esfinganina -1-fosfato (d18:0-P) por la acción de la esfingosina cinasa o a la 4 hidroxí esfinganina por acción de la base esfingoidea C4-hidroxilasa, o bien incorporar un ácido graso- CoA y transformarse en ceramida mediante la ceramida sintasa (esfinganina N-acetiltransferasa). Estudios recientes de esfingolípidos de hojas de *Arabidopsis* muestran que los ácidos grasos de 16 carbonos se unen preferentemente a BCL dihidroxiladas y los VLCFAs a BCL trihidroxiladas (Markham y Jaworski 2007; Chen *et al.* 2008).

La mayoría de las ceramidas que se producen son subsecuentemente transformadas en esfingolípidos complejos al incorporar residuos de glucosa u otros grupos polares por enzimas como la GlcCer sintasa o la inositol fosfoceramida sintasa (IPCs sintasa), entre otras.

Las primeras reacciones de la síntesis de esfingolípidos hasta la formación de ceramidas se han identificado en el RE (Tamura *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006; Lynch y Dunn 2004 Hillig *et al.* 2003), mientras que la formación de GIPCs y GlcCers se ha identificado en el Aparato de Golgi (Bromley *et al.* 2003; Levine *et al.* 2000, Wang *et al.* 2008), por lo que el transporte de ceramidas al Aparato de Golgi es un proceso necesario, sin embargo éste aún no ha sido descrito.



Biosíntesis de esfingolípidos. C-4 Ohase: C-4 hidroxilasa de BCL, CSI: Ceramida sintasa I, CSII: ceramida sintasa II, GCS: glucosilceramida sintasa, GIPC: glucosil inositol fosfoceramida, LCB-P-Pasa: fosfatasa de BCL-P, LCBK: cinasa de BCL; SPHK, esfingosina cinasa; SPT: serina palmitoiltransferasa, VLCFA: ácido graso de cadena muy larga. Modificado de Markham *et al.* 2013.

### 2.3. Muerte celular programada.

La MCP es un tipo de muerte que se diferencia de la necrosis por ser un proceso genéticamente regulado que involucra sucesos como la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA, la activación de proteínas con actividad de caspasas entre otros eventos que tienen como resultado la muerte selectiva de algún tejido dentro de la planta.

Debido a que las plantas no poseen células inmunes móviles, han desarrollado sistemas inmunes únicos con diferentes estrategias para diferentes patógenos (Yamada *et al.* 2005). Una de estas estrategias es la respuesta de hipersensibilidad. Esta respuesta es frecuentemente acompañada por la rápida MCP de las células en el sitio de infección con el fin de prevenir el crecimiento y la propagación de los patógenos en los tejidos sanos (Goodman y Novakcy 1994; Greenberg 1997). La MCP ocasionada tras la inducción de la respuesta de hipersensibilidad por algunos patógenos, es una muerte mediada por la vacuola (Hara-Nishimura y Hatsugai 2011).

### **2.3.1. Muerte celular vacuolar.**

Las células vegetales poseen dos tipos de sistemas de vacuolas, vacuolas de almacenamiento y vacuolas líticas (Hoh *et al.* 1995, Okita y Rogers 1996, Paris *et al.* 1996).

Las vacuolas son compartimentos que almacenan la mayoría de las enzimas hidrolíticas encontradas en los lisosomas de células animales, así como proteínas, iones y sales orgánicas que participan en la transducción de señales y el mantenimiento de la presión de turgencia de las células vegetales. Además, pueden contener enzimas y metabolitos secundarios que participan en respuestas de defensa, productos de desecho como ácido oxálico, metales tóxicos, así como los pigmentos característicos de las flores (Wink 1993).

#### **2.3.1.1. El papel de la vacuola en la muerte celular programada.**

Existen dos diferentes vías de muerte celular mediada por la vacuola, uno de ellos es de tipo destructivo, ya que está terciado por el colapso de la membrana vacuolar (Nishimura *et al.* 2005; Hatsugai *et al.* 2004; Kuroyanagi *et al.* 2005; Nakaune *et al.* 2005). Mientras que la segunda vía (no destructiva) comienza con la membrana vacuolar y el citoplasma intactos y no involucra el colapso de la membrana vacuolar (Hatsugai *et al.* 2009).

#### **2.3.1.2. Muerte celular programada mediada por la fusión de la membrana plasmática y el tonoplasto.**

La vía no destructiva fue recientemente observada en la muerte celular de la respuesta de hipersensibilidad inducida por bacterias avirulentas (Hatsugai *et al.* 2009), en la que la fusión de la membrana resulta en la interconexión de la vacuola y el espacio extracelular en las células de las hojas, lo que hace posible la descarga de las enzimas vacuolares hidrolíticas en la matriz extracelular. En este reporte se observó que plantas de *A. thaliana* que mostraron una respuesta de hipersensibilidad contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que portan el gen de avirulencia (Avr) *avrRpm1* (cepa Pst DC3000/*avrRpm1*) (Mackey *et al.* 2002) o el gen *avrRpt2* (cepa Pst DC3000/*avrRpt2*) (Mackey *et al.* 2003; Axtell y Staskawicz 2003) presentaron una vacuola central grande y fusionada con la membrana plasmática a las 6 h posteriores a la infección. Adicionalmente se observó que la interacción entre RPM1 (producto del gen de resistencia, R de la planta) y AvrRpm1 (factor de avirulencia, Avr del patógeno) es necesaria para la fusión de la membrana plasmática con el tonoplasto (Hara-Nishimura y Hatsugai 2011). Esta estrategia de defensa podría proveer a la planta un mecanismo para combatir patógenos

bacterianos intercelulares, que invaden por los estomas y proliferan en el espacio extracelular de las hojas (Hara-Nishimura y Hatsugai 2011).

### **2.3.1.3. Muerte celular programada mediada por la destrucción de la vacuola.**

El segundo tipo de la muerte celular mediada por la vacuola está asociado con la ruptura de la membrana vacuolar, resultando en la liberación de enzimas hidrolíticas en el citosol. Esta estrategia es eficiente contra infección de virus que proliferan en el citosol, ya que las enzimas vacuolares hidrolíticas como nucleasas y proteasas degradan los componentes virales. La destrucción de la vacuola lleva también a la muerte directa de la célula mediante la degradación de varios organelos incluyendo el núcleo. Este tipo de muerte es iniciado por la activación de la enzima de procesamiento vacuolar (VPE) que en condiciones normales se encuentra como un pro-péptido inactivo en el lumen de la vacuola (Hatsugai *et al.* 2004; Hara-Nishimura *et al.* 2005; Hatsugai *et al.* 2006). El silenciamiento de los genes VPE, suprime completamente la formación de la lesión ocasionada por la inducción de la respuesta de hipersensibilidad tras la infección de hojas con virus del mosaico de tabaco (TMV), así como el colapso vacuolar y la fragmentación del DNA, sin interferir con la producción de proteínas relacionadas con la defensa (proteínas PR) (Hara-Nishimura *et al.* 2005). La muerte celular dependiente de VPE es efectiva para la eliminación de los virus de la célula. Sin embargo también está involucrada en la muerte celular en *A. thaliana* inducida por la toxina fúngica fumonisina B1 (FB<sub>1</sub>) (Kuroyanagi *et al.* 2005). La MCP inducida por toxinas es una estrategia de algunos patógenos necrótrofos para la obtención de nutrientes de las células muertas. La toxina FB<sub>1</sub>, que es producida por los hongos patógenos como *Fusarium verticillioides* (anteriormente *moniliforme*), forma lesiones en las hojas de *Arabidopsis* e induce el colapso de la membrana de la vacuola (Kuroyanagi *et al.* 2005).

### **2.3.1.4. Enzima de procesamiento vacuolar.**

La VPE es una asparagil endopeptidasa (Hara-Nishimura *et al.* 1998; Hara-Nishimura 2003), que corta enlaces peptídicos en el C-terminal de los residuos de asparagina expuestos en la superficie molecular de proteínas precursoras para generar las proteínas maduras respectivas (Hara-Nishimura y Nishimura 1987; Hara-Nishimura *et al.* 1991; Hara-Nishimura *et al.* 1993). Sin embargo se ha demostrado que la enzima VPE también corta enlaces peptídicos en el C-terminal de residuos de ácido aspártico (Becker *et al.* 1995; Hiraiwa *et al.* 1999), ya que reconoce el ácido aspártico cuando es parte de la secuencia del sustrato sintético de caspasa-1, YVAD (Hatsugai *et al.* 2004). Adicionalmente, la enzima VPE, al igual que las caspasas, es una cisteín-proteasa, aunque no está relacionada con la familia de las caspasas o de las

metacaspasas, la enzima VPE y la caspasa-1 de mamíferos comparten varias propiedades enzimáticas. Los dos residuos de la díada catalítica de la enzima VPE, histidina y cisteína (Hiraiwa *et al.* 1999) son comparables a la His237 y a la Cys285 de la díada catalítica en la caspasa-1 de humano (Cohen 1997; Nicholson 1999). Tanto la enzima VPE como la caspasa-1 son sujetos a conversión y activación auto catalítica a partir de sus precursores inactivos (Hiraiwa *et al.* 1999; Hiraiwa *et al.* 1997; Kuroyanagi *et al.* 2002; Cohen 1997). La caspasa-1 en su forma inactiva se compone de dos subunidades de 20 kDa y 10 kDa, las cuales se derivan de un precursor inactivo de 45 kDa seguido de la remoción del N-terminal del pro-péptido y un péptido de unión (Cohen 1997; Raff 1998), por otro lado, las enzimas VPE son sintetizadas como precursores o preproteínas que son co-traduccionalmente convertidas en una proproteína con dos propéptidos, uno en el N-terminal y el otro en el C-terminal (Hiraiwa *et al.* 1999; Kuroyanagi *et al.* 2002), El precursor pro-proteico se auto activa catalíticamente por la remoción de los propéptidos del N-terminal y del C-terminal, ya que este último actúa como un dominio auto inhibitorio que enmascara el sitio activo (Kuroyanagi *et al.* 2002). Adicionalmente, el inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CHO, inhibe la actividad de la enzima VPE (Hatsugai *et al.* 2004).

El genoma de *Arabidopsis* tiene cuatro homólogos de VPE:  $\alpha$ VPE,  $\beta$ VPE,  $\gamma$ VPE y  $\delta$ VPE. Los tipos vegetativos,  $\alpha$ VPE y  $\gamma$ VPE son activados durante la diferenciación de elementos traqueales, durante la senescencia de las hojas y después del tratamiento con ácido salicílico (Hara-Nishimura y Maeshima 2000; Kinoshita *et al.* 1999). Mientras que el tipo  $\delta$ VPE es expresada específica y transitoriamente en dos capas de células en el recubrimiento de las semillas en un estadio temprano del desarrollo de las semillas (Nakaune 2005). Las enzimas VPE se localizan en vacuolas líticas de *Arabidopsis* (Kinoshita *et al.* 1999), son sintetizadas como precursores y son auto activadas catalíticamente bajo condiciones ácidas en la vacuola (Kuroyanagi *et al.* 2002).

### **2.3.2. Muerte celular programada mediada por bases de cadena larga.**

Las BCL además de su función como precursores metabólicos de los esfingolípidos complejos que integran las membranas celulares, actúan como moléculas señalizadoras que participan en vías de transducción de señales, por ejemplo, las BCL fosforiladas (BCL-P) están involucradas en el cierre de estomas mediado por la señalización de ácido abscísico (ABA) (Ng *et al.* 2001; Coursol *et al.* 2003, 2005; Townley *et al.* 2005; Worrall *et al.* 2008), mientras que las BCL no fosforiladas y ceramidas regulan la MCP (Shi *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008; Lachaud *et al.* 2010).

La MCP mediada por BCL ha sido estudiada en *Arabidopsis* mediante la aplicación de fumonisina B1 (FB<sub>1</sub>), una micotoxina producida por *Fusarium verticillioides*, que al inhibir a la enzima ceramida sintasa de la vía de síntesis de esfingolípidos ocasiona la acumulación del sustrato de esta enzima, las BCL. La MCP mediada por la acumulación de BCL ha sido demostrada mediante la cuantificación de BCL en plántulas expuestas a FB<sub>1</sub>, así como la fragmentación del DNA, la aplicación de BCL exógenas (Saucedo-García *et al.* 2011) y la mutación del gen de la subunidad LCB1 de la SPT, enzima clave de la síntesis de esfingolípidos (Gable *et al.* 2002; Shi *et al.* 2007).

Otros eventos que señalizan a la MCP mediada por BCL son la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Stone *et al.* 2000), el incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma y en el núcleo (Lachaud *et al.* 2010), la activación de una cascada de MAP cinasas, dentro de la que se ha identificado únicamente a la MAPK6 (Saucedo-García *et al.* 2011) y la activación de la enzima  $\gamma$ VPE (Kuroyanagi *et al.* 2005).

#### **2.4. El estrés de retículo endoplásmico.**

Otro suceso que lleva a la MCP en las plantas es el estrés de RE, un estado en el que en las células se acumulan proteínas desplegadas o plegadas erróneamente en el lumen del RE. La relación entre el estrés de RE y la muerte celular han sido establecidos por la demostración de que agentes que producen estrés de RE como tunicamicina o ditiotreitol inducen la manifestación de características de MCP en una variedad de plantas (Crosti, Malerba y Bianchetti, 2001; Zuppini, Navazio y Mariani, 2004). Seguimiento del tratamiento con tunicamicina en células vegetales, la cromatina muestra condensación y fragmentación dando reacciones positivas de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) por el corte entre sitios internucleosomales, una característica de la MCP. Adicionalmente Watanabe y Lam (2008) demostraron que chaperonas químicas como el ácido 4-fenilbutírico y el ácido tauroursodoxicólico, que reducen la carga de proteínas desplegadas atenúan los síntomas de la MCP en *Arabidopsis*.

Durante el proceso de plegamiento de las proteínas en el RE, proteínas con plegamiento incompleto, o erróneo, así como proteínas no plegadas pueden acumularse debido a diversos factores que alteran el ambiente dentro del RE, tales como el incremento en la síntesis de proteínas, o un incremento en la cantidad de proteínas desplegadas que excede a la capacidad de las proteínas chaperonas, alteraciones en el almacenamiento de Ca<sup>2+</sup> en el lumen del RE, estrés oxidativo o cambios en el ambiente redox del lumen del RE (Levine y Klionsky 2004).

El plegamiento erróneo de las proteínas ocurre aun cuando el estado nativo de una proteína generalmente representa el estado de menor energía libre. En el proceso de plegamiento, particularmente las proteínas de gran tamaño, pasan a través de intermediarios de plegamiento, en los cuales las unidades elementales de plegamiento, llamados “foldones”, (Englander *et al.* 2007; Lindberg y Oliveberg 2007) colapsan en formas no nativas. El paisaje o mapa energético del plegamiento de una proteína puede tener muchos montes y valles y proteínas en vías de adquirir el estado nativo pueden pasar a través o quedarse retenidas en una de muchas formas de plegamiento equivocadas, pero cinéticamente estables (Hartl y Hayer-Hartl 2009). Las características topológicas del paisaje energético del plegamiento de una proteína pueden dictar la estabilidad de un intermediario mal plegado o de las formas nativas (Bryngelson *et al.* 1995). En condiciones de estrés el plegamiento erróneo o incompleto puede ser favorecido, ocasionando la acumulación y agregación de péptidos mal plegados ocasionando estrés de RE. Sin embargo, las células asimismo poseen vías de transducción de señales que permiten el abatimiento de este estado de estrés y restaurar la homeostasis celular.

#### **2.4.1. La respuesta a proteínas desplegadas y los mecanismos que abaten el estado de estrés de RE.**

Las chaperonas moleculares necesarias para el plegamiento de las cadenas polipeptídicas que permite que las proteínas adquieran su conformación nativa están presentes constitutivamente en el RE, sin embargo, la traducción de los genes de las chaperonas moleculares puede ser inducida bajo circunstancias en las que el plegamiento de proteínas este comprometido y por lo tanto la demanda es superada por la capacidad de plegamiento, conduciendo a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el RE (estrés de RE).

En condiciones de estrés de RE, se induce la expresión de los genes de las proteínas que realizan el plegamiento, también conocido como sistema de control de calidad del RE (ERQC), como la CNX, CRT, PDI, BiP y del sistema de degradación asociado al RE (ERAD, sistema ubiquitin-proteasoma), esta respuesta se denomina respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y constituye una respuesta adaptativa cuyo objetivo es abatir este estado fisiológico. El mecanismo molecular de la respuesta UPR, fue estudiado primero en levaduras y mamíferos. La respuesta UPR en mamíferos comprende tres respuestas. La primer respuesta que se transduce ante el estrés de RE, esta mediada por el factor de transcripción ATF6 asociado a la membrana que censa el lumen del RE y se retranslocan al núcleo para activar la transcripción de genes. La segunda respuesta comprende a la proteína cinasa/ribonucleasa IRE1 (inositol-



requiring enzyme 1). Finalmente la tercera respuesta, comprende la proteína PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), que fosforila e inactiva al factor de inicio de la traducción eIF2a retardando la traducción de proteínas.

#### **2.4.2. La respuesta a proteínas desplegadas en plantas.**

En plantas, la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) comprende dos respuestas principales que evitan la agregación de péptidos desplegados en el lumen del RE. La primera respuesta está mediada por la proteína cinasa/ribonucleasa IRE1. La proteína IRE1 posee un dominio en el N-terminal que censa el lumen del RE y un dominio en el C-terminal que tiene actividad de cinasa y ribonucleasa que se localiza en la cara citoplasmática del RE. IRE1 percibe los polipéptidos hidrofóbicos y realiza el corte del mRNA que codifica a otro factor de transcripción bZIP60 (HAC1 en levadura, XBP1 en animales) responsable de los genes del ERQC, el corte que esta enzima realiza es un mecanismo no convencional, se realiza en el citosol y es totalmente distinto a que se realiza en los espliceosomas nucleares. En animales, también se ha observado que IRE1 lleva a la degradación de mRNA de proteínas de la vía de secreción, es un mecanismo denominado decaimiento regulado mediado por IRE1 (RIDD por su siglas en inglés) y se considera como una medida que ocasiona la reducción de las proteínas que residen en el lumen del RE. Recientemente, se ha observado que este mecanismo podría estar presente también en las plantas (Mishiba *et al.* 2013)

Adicional a la vía de señalización mediada por IRE1, las plantas y los animales poseen otras moléculas señalizadoras que actúan en paralelo a esta vía. En *Arabidopsis* bZIP17 y bZIP28 (y sus ortólogos en arroz bZIP39 y bZIP60) son factores de transcripción con un dominio básico de cremallera de leucinas (bZIP) que tienen un presunto dominio transmembranal (TMD) cercano al C-terminal (Che *et al.* 2010; Liu *et al.* 2007; Tajima *et al.* 2008). Ambos bZIP17 y bZIP28 son sintetizados como proteínas precursoras que se encuentran ancladas a la membrana del RE gracias al dominio TMD. En respuesta a estrés de RE estos factores de transcripción son escindidos por dos proteasas, S1P y S2P, que se encuentran en el Aparato de Golgi, liberando las porciones citológicas que incluyen el dominio bZIP de la membrana del RE para ser translocada al núcleo. La inducción de los genes de la respuesta UPR está mediada por elementos que actúan en cis en los elementos de los promotores de la respuesta a estrés de RE (ERSE) y el elemento de la respuesta UPR (UPRE) (Iwata *et al.* 2008, Iwata *et al.* 2010; Martínez y Chrispeels 2003; Oh *et al.* 2003). ERSE es reconocido por un complejo de factores de transcripción NF-Y (NF-YA, NF-YB y NF-YC) que actúa en conjunto con bZIP28 para el

reconocimiento del elemento en cis (Liu y Howell 2010). En respuesta a estrés de RE, bZIP28 e IRE1 son activados por la acumulación de proteínas desplegadas en el lumen del RE. bZIP28 y bZIP60 pueden heterodimerizarse, convergiendo ambas respuestas para activar la transcripción de los genes de respuesta a estrés de RE.

### **2.4.3. El estrés de retículo endoplásmico y la muerte celular programada.**

En mamíferos, la vía intrínseca (mitocondrial) de la apoptosis es la principal vía de muerte celular inducida por estrés de RE (Shen *et al.* 2005), en la que la permeabilización de la membrana externa mitocondrial mediada por BAX y BAK y la salida del citocromo c son el evento culminante hacia la MCP. En estas células, la familia de proteínas BCL-2 regula la vía intrínseca de la apoptosis controlando la integridad de la membrana externa mitocondrial (Chipuk *et al.* 2010). En respuesta al estrés de RE se activa la transcripción de proteínas BH3-only (que comparten homología con otros miembros de la familia BCL-2 solo en su dominio BH3) o son post-traduccionalmente activadas, esto ocasiona la inhibición de la actividad de proteínas protectoras mitocondriales como BCL-2, BCL-XL y MCL-1, llevando a la alteración del balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas.

Cuando las células de mamífero están sujetas a un estrés de RE irremediable, la señalización por la cinasa PERK induce a ATF4 que activa la transcripción del factor CHOP, el cual a su vez inhibe la expresión del gen de la proteína antiapoptótica BCL-2 y activa la transcripción de ERO1a, una oxidasa que causa daño por oxidación del RE (Marciniak *et al.* 2004). En condiciones de estrés de RE prolongado, las células de mamífero adicionalmente activan la vía IRE1-JNK. Esta reportado que la fosforilación de JNK activa a la proteína proapoptótica BIM e inhibe a la proteína BCL-2 (Shore *et al.* 2011). En consecuencia, es posible que la combinación de las vías CHOP e IRE1 lleven a las células a la apoptosis (Tabas *et al.* 2011). Adicionalmente, se ha reportado que en mamíferos la activación de la caspasa-12 también sucede durante el estrés de RE y que contribuye a la MCP (Nakagawa *et al.* 2000).

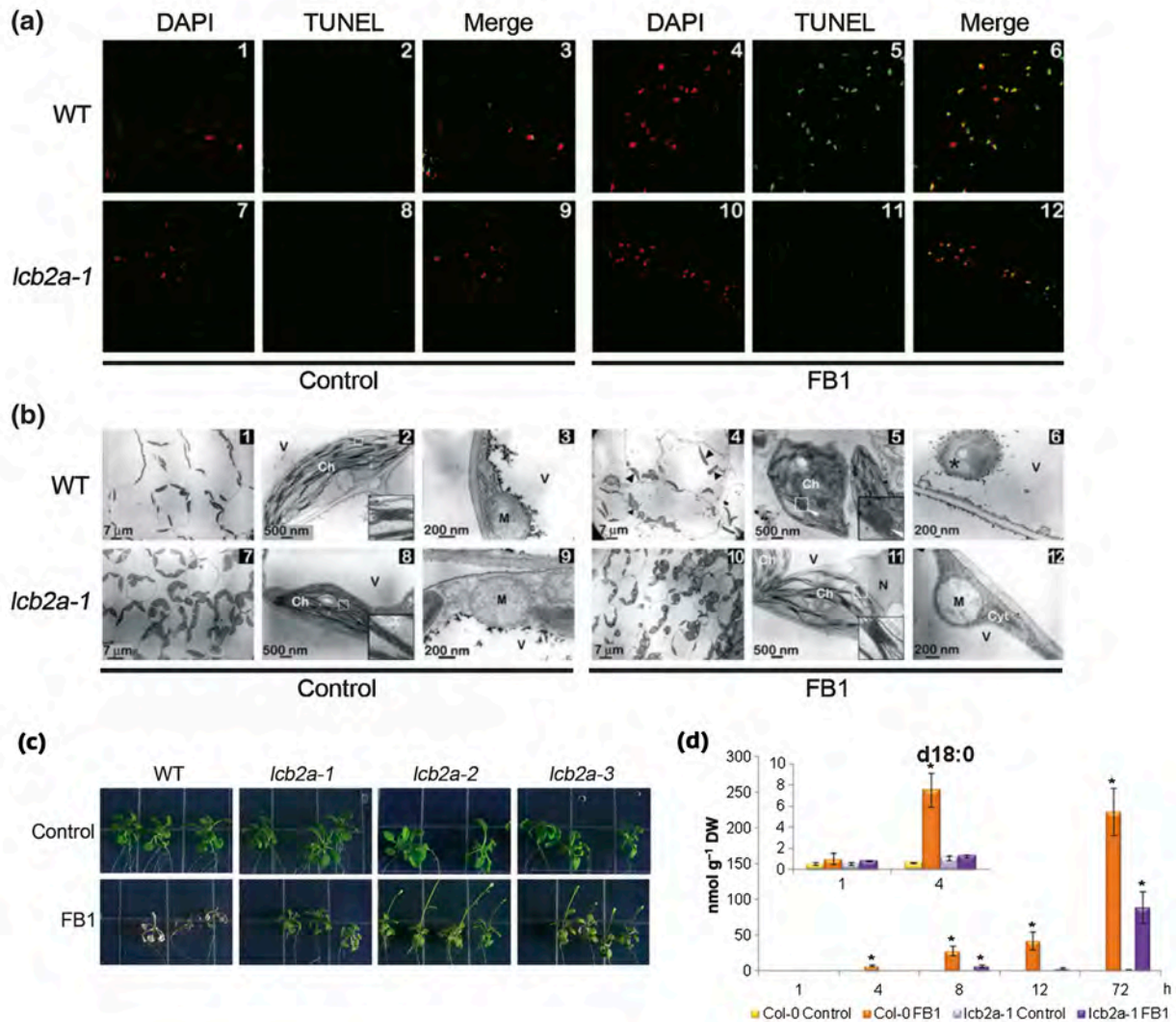
No obstante, ninguno de los miembros de la familia BCL-2 o componentes de la vía PERK-CHOP ha sido encontrada en plantas. Las células vegetales no tiene un equivalente morfológico de la apoptosis, en su lugar la muerte celular vacuolar es la vía de MCP que se activa en condiciones de estrés de RE (Qiang *et al.* 2012).

### 3. ANTECEDENTES INMEDIATOS.

Algunas de las evidencias experimentales que soportan la hipótesis de que las BCL pueden actuar como elementos de transducción de señales en una vía de MCP relacionada con el estrés de retículo endoplásmico, se presentan a continuación.

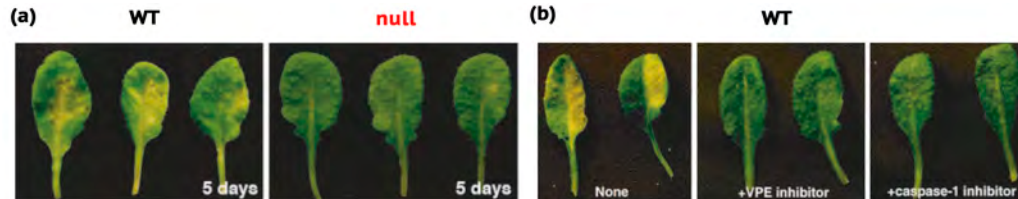
**El retículo endoplásmico como lugar de formación de las BCL que se acumulan para ser segundos mensajeros.** El retículo endoplásmico es el sitio de síntesis de BCL, las cuales son acumuladas de manera súbita como respuesta a un estímulo externo como la presencia de patógenos (Peer *et al.* 2010) o la exposición a FB<sub>1</sub> (Saucedo-García *et al.* 2011). Esta acumulación es parte de una vía de inducción de MCP en plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre. Adicionalmente, se ha observado que en estas condiciones se induce la activación de otras respuestas relacionadas con la defensa contra patógenos, como la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la síntesis de callosa y fitoalexinas, así como la expresión de proteínas relacionadas con patógenos (PR) (Stone *et al.* 2000).

**La MCP inducida por acumulación de BCL presenta rasgos fenotípicos distintivos.** La observación del fenotipo es un elemento importante para el estudio de las plantas y su fisiología, ya que permite evidenciar la importancia de algún gen en particular. Entre las evidencias que asociaron la acumulación de BCL con la MCP están la fragmentación del DNA en plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre tras la exposición a FB<sub>1</sub> (Figura A, Antecedentes). En estas condiciones se observaron cloroplastos redondeados e internalizados a la vacuola, indicando la pérdida de la integridad del tonoplasto, así como una remarcable desintegración de los tilacoides; comparativamente, la línea mutante en el gene de la subunidad LCB2A de la SPT que produce menos BCL (línea *lcb2a-1*), no presentó fragmentación de DNA ni cambios dramáticos en la organización de los tilacoides o en la integridad del tonoplasto (Figura A, Antecedentes). En relación a la MCP, se observó que las plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre manifestaron clorosis en las hojas tras la exposición a FB<sub>1</sub> (Figura A, Antecedentes), lo cual puede usarse como una herramienta de rápida identificación de la presencia de muerte, no obstante, no resulta un marcador de MCP. Con base en lo anterior y en relación a la línea mutante *lcb2a-1*, se observó que las plántulas de ésta línea no mostraron signos dramáticos de clorosis tras la exposición a FB<sub>1</sub>, lo cual correlacionó con una reacción negativa de TUNEL, evidenciando la relevancia de las BCL como transductores de una vía de MCP inducida por FB<sub>1</sub>. Adicionalmente, las BCL libres fueron cuantificadas mediante HPLC/ESI-MS/MS, encontrándose que la esfinganina (d18:0) fue la especie cuya proporción aumentó dramáticamente tras la exposición a FB<sub>1</sub> en plántulas del genotipo silvestre, en



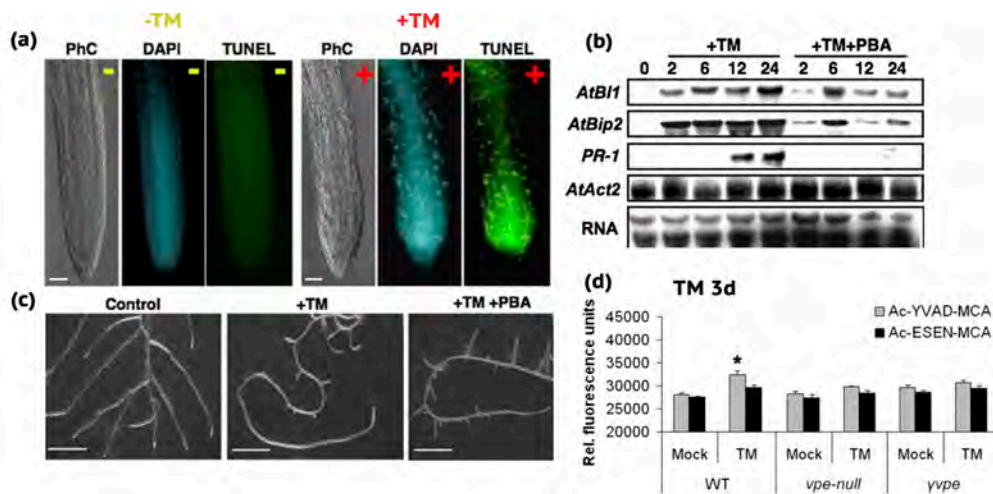
**Fig. A. La exposición a FB<sub>1</sub> induce MCP en plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre.** (a) Reacción de TUNEL. Se observó que tras la exposición a FB<sub>1</sub>, las plántulas de genotipo silvestre mostraron una mayor proporción de grupos 3'-OH libres en el DNA, indicando la fragmentación del DNA, una característica de la MCP. (b) Análisis ultraestructural de plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre y de la línea *lcb2a-1* expuestas a FB<sub>1</sub>. (c) La MCP se manifestó como pérdida de la pigmentación de las hojas (clorosis) tras la exposición a FB<sub>1</sub> de plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre, no obstante, esta característica no se observó en tres líneas de *A. thaliana* con silenciamiento en el gen de la subunidad LCB2A. (d) Determinación de esfingalina (d18:0) en plántulas de *A. thaliana* tras la exposición a FB<sub>1</sub>. Tomado de Saucedo-García *et al.* 2011.

contraste con las plántulas de la línea *lcb2a-1*, que mostraron un aumento muy menor (Figura A, Antecedentes). Por otra parte, se observó que la enzima vacuolar  $\gamma$ VPE, que tiene actividad tipo caspasa-1 es necesaria para la MCP mediada por la acumulación de BCL, ya que la mutación en el gen de la enzima  $\gamma$ VPE suprime la formación de las lesiones de MCP inducidas por FB<sub>1</sub> (Figura B, Antecedentes).



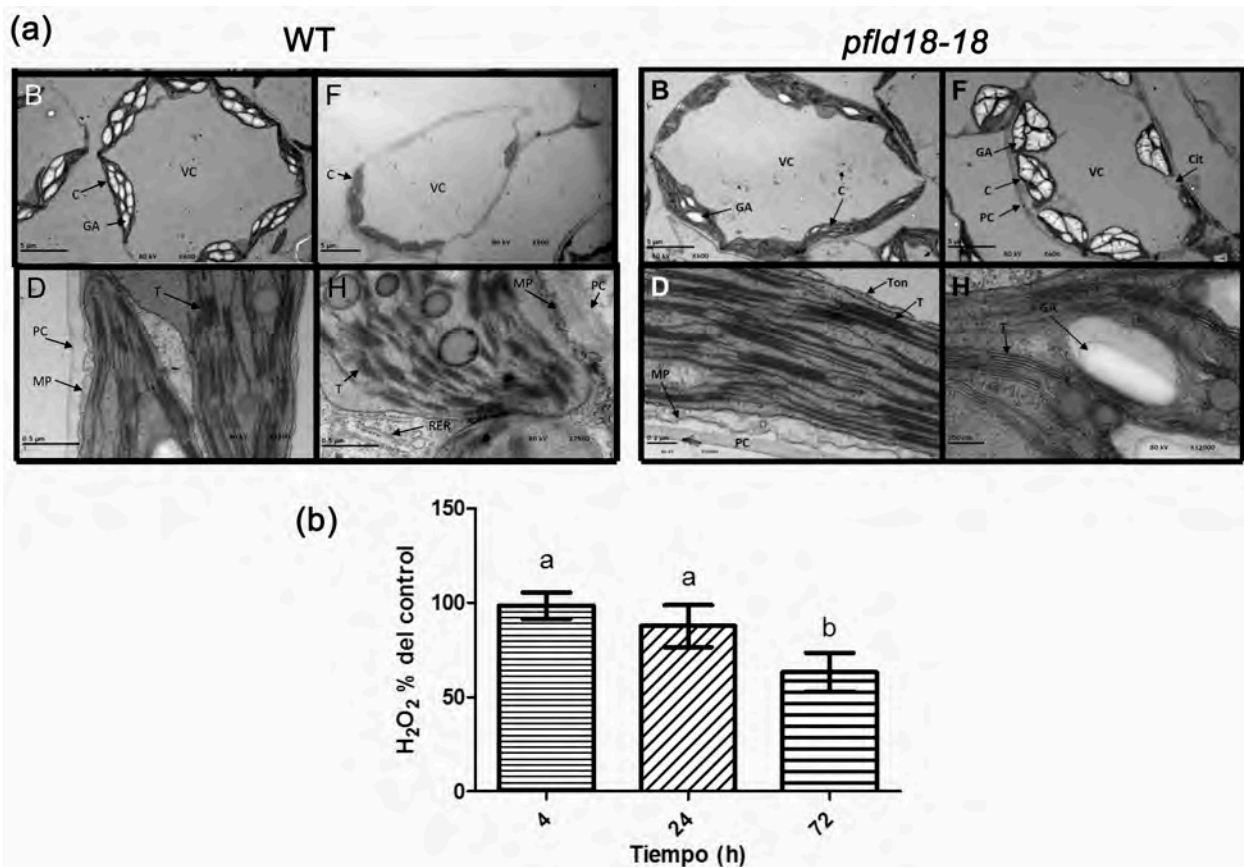
**Fig. B. La deficiencia de VPE suprime la formación de lesiones de MCP inducidas por FB<sub>1</sub>.** (a) Infiltración de FB<sub>1</sub> en plantas de *A. thaliana* de genotipo silvestre y en plantas de la línea mutante *vpe-null*. (b) Infiltración de FB<sub>1</sub> en plántulas de genotipo silvestre en ausencia o en presencia del inhibidor de VPE, Ac-ESEN-CHO, o del inhibidor de caspasa-1, biotin-YVAD-fmk. Tomado de Kuroyanagi *et al.* 2005.

**La MCP inducida por estrés de retículo endoplásmico presenta características comunes con la mediada por BCL.** La exposición a agentes como la TM ha permitido estudiar el estrés de RE en plantas. En *A. thaliana* se ha observado que la TM puede inducir la MCP, ya que al exponer raíces de genotipo silvestre a TM se ha observado que éstas presentan fragmentación del DNA (Figura C, Antecedentes), se activa la transcripción de genes como *BI-1*, *BIP2* (relacionados con el estrés de RE en animales) y *PR-1* (relacionado con la respuesta de defensa contra patógenos) (Figura C, Antecedentes). Además, éstas raíces presentan inhibición de su desarrollo (Figura C, Antecedentes, Watanabe y Lam 2008). Posteriormente, se observó que la MCP inducida por estrés de RE requiere de la enzima  $\gamma$ VPE, ya que las raíces de plántulas de la línea mutante *γvpe-1* y *vpe-null* expuestas a TM presentaron menor actividad de VPE y de caspasa-1 respecto a las raíces del genotipo silvestre (Qiang *et al.* 2012, Figura C, Antecedentes).



**Fig. C. La TM induce MCP en raíces de *A. thaliana*.** (a) Análisis microscópico de raíces de *A. thaliana* del genotipo silvestre tratadas con TM. Las células fueron contrastadas *in situ* con DAPI, seguido de los reactivos de la reacción de TUNEL, (PhC: imagen de contraste de fases). (b) Análisis de la expresión de los genes *BI-1* (Bax inhibitor-1), *Bip2* (Luminal-binding protein-2), *PR-1* (Pathogen-related protein-1) y *Act-2* (Actin) como control. Se expusieron raíces de *Arabidopsis* a TM en presencia o ausencia de PBA (4-fenil butirato de sodio, como chaperona química), el RNA total fue extraído y analizado por RNA gel blot con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P. La tinción de RNA con azul de metileno fue usado como control de cargado. (c) Fenotipo de la elongación de raíces laterales tras la exposición a TM en presencia o usencia de PBA. (d) Análisis de la actividad de VPE y tipo caspasa-1 en extractos de raíces de *A. thaliana* de genotipo silvestre y de las líneas mutantes *vpe-null* y *γvpe-1*.

Otra de las características de la MCP que se produce tras un estrés de RE es la generación de ERO (Qiang *et al.* 2012). En nuestro laboratorio se ha observado que también la producción de ERO está implicada en la MCP en presencia de patógenos o de FB1 (Rodríguez-Mejía 2006; González-Solís 2009; Tapia de Aquino 2012). Las plántulas de *A. thaliana* de la mutante *pfl18-18* presentaron menor daño en los cloroplastos después su exposición a FB1 50  $\mu$ M por 72 h en comparación con las del genotipo silvestre en estas condiciones (Figura D, Antecedentes). Después de realizar la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó que las plántulas de la línea mutante habían producido aproximadamente 30 % menos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 72 h que las plántulas del genotipo silvestre (Figura D, Antecedentes).



**Fig. D. Las plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfl18-18* producen menos ERO en el cloroplasto.** (a) Análisis de la ultraestructura celular de plántulas de genotipo silvestre y de la mutante *pfl18-18* expuestas a FB<sub>1</sub> por 72 h. Se observó que las células presentan menos cloroplastos, los cuales a su vez presentaron daño en la membrana tilacoidal comparado con el control. En la línea mutante se observó que las células presentan cloroplastos con abundantes gránulos de almidón y no presentan cambio dramático en la membrana tilacoidal respecto al de las plántulas control. (b) Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en homogenados de plántulas de la línea *pfl18-18*. Los resultados están expresados en % del control, considerando la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plántulas silvestres como control. Barras: Desv Estd de tres experimentos independientes. (Tapia de Aquino 2012).

#### 4. JUSTIFICACIÓN.

Los esfingolípidos son compuestos abundantes y esenciales en las membranas de las células vegetales y en nuestro grupo de trabajo es de nuestro particular interés estudiar su función en la fisiología de las plantas.

Como se ha descrito anteriormente, algunos estudios en *A. thaliana* han establecido a las BCL como un elemento de señalización en una vía de MCP, sin embargo se ha observado que pueden estar implicadas en la señalización de diversos tipos de estrés. Por ejemplo la acumulación de la BCL d18:1-P se ha relacionado con la señalización del cierre estomatal (Ng *et al.* 2001), o la formación de t18:0-P que se ha observado en la respuesta a bajas temperaturas (Cantrel *et al.* 2011; Dutilleul *et al.* 2012). Sin embargo, a pesar de los avances en la implicación de las BCL como elementos de señalización, las moléculas blanco de las BCL o el mecanismo que emplean son aún desconocidos, así como las señales que desencadenan directamente su síntesis y su acumulación. En general el entendimiento de la fisiología de las plantas en relación a los mecanismos de MCP y las vías de señalización que la desencadenan está lejos de ser completo.

Con base en los antecedentes descritos, el objetivo de este trabajo es aportar evidencias experimentales al entendimiento de una vía de MCP en la que las BCL han sido implicadas como elementos de señalización y explorar la posibilidad de que en esta MCP esté involucrado el estrés de retículo endoplásmico, que conduce también a una MCP recientemente descrita en plantas. Se abre la posibilidad de que se trate de una sola vía de MCP que implique ambos eventos: tanto la acumulación de BCL, como el estrés de RE, o bien que cada una sea una vía independiente, o bien que sean dos vías independientes en las que una comparte algún o algunos elementos de la otra. Resulta relevante establecer esta posibilidad considerando que en las plantas se han descrito varios caminos de programación de muerte celular. Además es importante entender otros mecanismos de muerte en plantas, ya que en las plantas no se han observado los elementos que comprenden la apoptosis celular descrita en animales.

La comprensión de los mecanismos mediante los cuales las plantas llegan a la MCP es fundamental para entender procesos fisiológicos como la senescencia, la formación de gametos y las respuestas frente a diferentes tipos de estrés ambiental, incluyendo las respuestas de defensa contra patógenos. A partir del conocimiento de la fisiología de las plantas puede lograrse el desarrollo de plantas de interés comercial resistentes a condiciones climáticas adversas, siendo éste un tópico de interés actual en el campo de la biología vegetal.

## 5. HIPÓTESIS.

El estrés de retículo endoplásmico es un evento que se presenta en la vía de muerte celular programada mediada por bases de cadena larga.

## 6. OBJETIVO GENERAL.

Determinar parámetros que se presentan en condiciones de estrés de retículo endoplásmico en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre y de las líneas mutantes *lcb2a-1* y *pfl18-18* expuestas a fumonisina B1 para determinar si en éstas condiciones sucede estrés de retículo endoplásmico.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar y comparar la magnitud y la temporalidad de aparición de las lesiones de muerte celular inducidas por la exposición a tunicamicina y fumonisina B1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre y de las líneas mutantes *lcb2a-1* y *pfl18-18*, realizando el registro fotográfico del fenotipo durante un curso de tiempo.
- Determinar y comparar los principales cambios morfológicos en la ultraestructura celular asociados a la exposición a tunicamicina y fumonisina B1 de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre y de la línea mutante *lcb2a-1* mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Determinar y comparar el efecto de la exposición a tunicamicina y fumonisina B1 en el desarrollo de las raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre, midiendo la longitud de la raíz principal y realizando el registro fotográfico del fenotipo de las raíces.
- Realizar la inmunodetección de la proteína luminal de unión (BiP) como marcador de estrés de retículo endoplásmico en muestras de fracción soluble de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre y de las líneas mutantes *lcb2a-1* y *pfl18-18* expuestas a tunicamicina y fumonisina B1.



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 8.1. Reactivos especiales.

#### a. Fumonisina B1.

Fumonisina B1 (FB<sub>1</sub>), Sigma Chemical Co. St Louis, MO. Se prepararon diluciones a partir de una solución stock de FB<sub>1</sub> 1 mM (disuelta en agua) para obtener las concentraciones finales deseadas.

#### b. Tunicamicina.

Tunicamicina de *Streptomyces sp.* (TM), Sigma-Aldrich Inc. St Louis, MO. Se preparó una solución stock de 10 mg/mL en DMSO, a partir de la cual se hicieron diluciones en agua desionizada para obtener las concentraciones finales deseadas.

### 8.2. Material biológico.

Se utilizaron plántulas de *A. thaliana* genotipo silvestre ecotipo Columbia-0 (Col-0) y de las líneas *lcb2a-1* y *pfld18-18* de 3 semanas de edad crecidas en medio Gamborg B-5/agar 1 % y sacarosa 1 % (Anexo I).

Nombre	Genotipo	Fenotipo	Referencia
<b>wt</b> (col-0)	Silvestre	Niveles normales de BCL y esfingolípidos complejos	Saucedo-García <i>et al.</i> 2011
<b><i>lcb2a-1</i></b>	Inserción de un transposón en el gen de la subunidad LCB2A de la serina palmitoiltransferasa (SPT)	Menor acumulación de BCL tras la exposición a FB <sub>1</sub> que la wt	Dietrich <i>et al.</i> 2008 Saucedo-García <i>et al.</i> 2011
<b><i>pfld18-18</i></b>	Inserción del gen de la flavodoxina	Menor producción de ERO en el cloroplasto que la wt	Tognetti <i>et al.</i> 2006

### 8.3. Germinación de semillas de *A. thaliana*.

Las semillas de *A. thaliana* de la línea silvestre se germinaron de acuerdo al siguiente procedimiento.

- 1) Colocar las semillas en un microtubo y agregar 1 mL de  $\text{NaHClO}_4$  al 20 % (estéril), 1  $\mu\text{L}$  de Tween 20 al 0.1 % y 3  $\mu\text{L}$  de microdyn comercial (solución de plata ionizada al 0.35 %). Agitar vigorosamente por 20 min.
- 2) Centrifugar y quitar el sobrenadante con una micropipeta y puntas estériles. Posteriormente, lavar las semillas agregando 1 mL de  $\text{NaHClO}_4$  al 20 % (estéril) y manteniendo en agitación por 10 min.
- 3) Centrifugar nuevamente por 10 s y eliminar el sobrenadante.
- 4) Enjuagar las semillas al menos 5 veces, agregando 1 mL de agua estéril, agitando durante 30 s, centrifugando 10 s y eliminando el sobrenadante con una micropipeta para cada vez, hasta eliminar completamente el  $\text{NaHClO}_4$  y el Tween 20.
- 5) Sembrar las semillas desinfectadas en cajas petri con 20 mL de medio de Gamborg's B-5 0.032 %/agar 1 %/ sacarosa 1 % estéril.
- 6) Mantener las cajas con las semillas en oscuridad y a 4 °C por 48 h para romper la latencia de las semillas.
- 7) Trasladar las cajas a una cámara de incubación a 22 °C con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad y crecerlas en posición vertical u horizontal por 3 semanas.

#### **8.4. Tratamiento de plántulas de *A. thaliana*.**

A las cajas petri con las plántulas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad crecidas en medio Gamborg B-5/agar 1 % y sacarosa 1 % se les aplicaron soluciones de DMSO 7 mM ,  $\text{FB}_1$  o TM a la concentraciones deseadas por aspersión como se describe en seguida.

- 1) Preparar una disolución a la concentración final requerida en agua desionizada estéril.
- 2) Agregar la solución a un frasco atomizador (con capacidad de 10 mL) estéril.
- 3) En área aséptica, asperjar las plántulas en la caja de petri a una distancia de 10-15 cm de la caja, la cantidad de 10 disparos (que corresponde a 1 mL de solución) por cada caja de plántulas.
- 4) Tapar la caja y exponerla a un fotoperiodo con luz continua a 22 °C durante el tiempo requerido.

### 8.5. Registro fotográfico del fenotipo.

Una vez realizado el tratamiento y la exposición a luz continua de las plántulas de *A. thaliana* a los tratamientos correspondientes, se realizó el registro del fenotipo como se describe a continuación.

- 1) Colocar la cámara de luz LED en la campana de flujo laminar.
- 2) Colocar la caja petri destapada con las plántulas de *A. thaliana*.
- 3) Las fotografías fueron tomadas con una cámara NIKON COOLPIX L120 en formato JPG.
- 4) El fenotipo también fue observado y documentado con una cámara Motic-100 adaptada a un microscopio de disección Zeiggen, las fotografías fueron almacenadas en formato TIFF.
- 5) El montaje de las imágenes digitales fue realizado en ImageJ 1.49e y Adobe Photoshop CS6 con las características de resolución y exposición originales.

### 8.6. Visualización de la ultraestructura celular por microscopía electrónica de transmisión.

Tras la exposición de plántulas de *A. thaliana* se realizó la toma de muestra de las plántulas como se describe a continuación.

- 1) Preparar una solución de glutaraldehído grado I al 3% en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7 y mantenerla en hielo.
- 2) Alícuotar la solución de glutaraldehído en frascos viales etiquetados de vidrio con 2 mL de solución cada uno.
- 3) Cortar cinco hojas de plántulas de cada caja con su respectivo tratamiento y sumergirlas en la solución de fijación de glutaraldehído contenida en el vial.

Posteriormente las muestras fueron llevadas a la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, donde fueron procesadas. Las muestras fueron lavadas, deshidratadas, infiltradas e incluidas en Epon fresco al 100%. Se observaron microcortes de 80 nm en un microscopio electrónico JEOL 1200 EXII operado a 60 kV.

### 8.7. Toma de muestra de los tejidos vegetales expuestos a los tratamientos.

Una vez realizada la aspersión de las plántulas de *A. thaliana* con los tratamientos a evaluar y transcurridos los tiempos indicados, se toma una muestra de la porción aérea de las plántulas. Las muestras se recolectaron como se describe a continuación.

- 1) Cortar los tallos y hojas de las plántulas de una caja petri previamente asperjada con el tratamiento con unas tijeras pequeñas y unas pinzas.
- 2) Colocar las muestras en tubos de microfuga prepesados y debidamente etiquetados.
- 3) Congelar las muestras en N<sub>2</sub> líquido hasta la obtención de la fracción soluble.

### 8.8. Obtención de la fracción soluble.

Para obtener la fracción soluble de las plántulas expuestas a los tratamientos de H<sub>2</sub>O, DMSO, FB<sub>1</sub> o TM se preparó el volumen amortiguador de homogeneización necesario, adicionando al amortiguador de homogeneización (previamente preparado) una mezcla de inhibidores (quimiostatina, leupeptina, PMSF, TPCK, TLCK-HCl), ditioneitol (DTT) y β-mercapto etanol el día del uso (Apéndice).

- 1) Preparar la cantidad de amortiguador de homogeneización necesaria (aproximadamente 2 mL por un gramo de tejido fresco) y mantenerlo en hielo durante todo el proceso.
- 2) Colocar en un mortero pequeño la muestra recolectada y previamente pesada (congelada y mantenida a -70 °C o recién obtenida). Agregar N<sub>2</sub> líquido y moler la muestra hasta obtener un polvo fino.
- 3) Colocar el polvo fino en un vaso de precipitados de 10 mL (en hielo) y adicionar amortiguador de homogeneización suficiente para que cubra todo el polvo sin exceder el volumen de homogeneización máximo de 2 mL por gramo de tejido.
- 4) Homogenizar la muestra contenida en el vaso con un homogenizador eléctrico TISSUE TEAROR 985-370 tipo 2 a una velocidad de 3.0 en dos periodos de 10 segundos con intervalo de 20 segundos entre cada uno, con el vaso siempre sumergido en hielo.
- 5) Filtrar el homogenado, pasándolo a través de tres capas de gasa previamente humedecida con agua bidestilada. Recibir el filtrado en otro vaso de precipitados de 10 mL (mantenido en hielo).

- 6) Exprimir la gasa presionando ligeramente con una espátula limpia.
- 7) Arrastrar el residuo del vaso en el que se hizo la homogeneización con 1 mL de amortiguador de homogeneización (sin exceder el volumen de homogeneización máximo de 2 mL por gramo de tejido) y pasarlo por la gasa en la que se realizó la filtración
- 8) Exprimir nuevamente la gasa presionando ligeramente con una espátula limpia.
- 9) Medir el volumen final del homogenado filtrado y tomar una muestra de 50  $\mu$ L en un microtubo para la determinación de proteína.
- 10) Colocar el homogenado filtrado en un tubo falcon de 12 mL con tapa y centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- 11) Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un segundo tubo falcon de 12 mL limpio y descartar el sedimento.
- 12) Medir el volumen del sobrenadante y tomar una muestra de 50  $\mu$ L en un microtubo para la determinación de proteína.
- 13) Alicuotar el sobrenadante final en microtubos con 70  $\mu$ L cada uno, congelar con N<sub>2</sub> líquido y guardar a -70 °C.

#### **8.9. Determinación de proteína de la fracción soluble por el método de Bradford.**

Se determinó la concentración total de proteína obtenida en la fracción soluble por el método de Bradford, realizando lo siguiente para cada muestra.

##### **Curva estándar de proteína.**

Para determinar la cantidad de proteína contenida en las fracciones solubles de las muestras vegetales se realizaron curvas estándar con una solución de BSA 1 mg/mL y el reactivo concentrado de Bradford PROTEIN ASSAY de BIO-RAD. Se realizó una curva estándar para cada día en que se hizo la determinación de proteína. Para cada curva se agregaron las cantidades de BSA, H<sub>2</sub>O y reactivo descritas en la tabla.

Tubo	H <sub>2</sub> O Volumen (μL)	BSA 1 mg/mL Volumen (μL)	Reactivo Volumen (μL)	Cantidad de proteína (μg)
1	800	---	200	0
2	800	2	200	2
3	800	4	200	4
4	800	6	200	6
5	800	8	200	8
6	800	10	200	10
7	800	12	200	12

### **Determinación de la proteína total de la fracción soluble de las muestras de plántulas tratadas con TM o FB<sub>1</sub>.**

- 1) Poner una alícuota del reactivo concentrado de Bradford en un matraz Erlenmeyer pequeño necesario para realizar 3 réplicas por cada muestra de fracción soluble y 3 blancos de amortiguador de homogeneización. Considerando que se requiere 200 μL de reactivo para cada replica.
- 2) Agregar 800 μL de agua a los tubos de ensaye de 13 x 100 para las muestras y los blancos de reactivo (previamente numerados).
- 3) Antes de la cuantificación de proteína en la fracción soluble, agregar las cantidades agua desionizada y de BSA 1 mg/mL en los tubos de ensaye para la curva estándar, sin agregar el reactivo.
- 4) En los tubos de ensaye de 13 x 100 con agua agregar las cantidades de 2, 3 y 4 μL de cada fracción soluble o amortiguador de homogeneización (blanco) para hacer la determinación de proteína total de cada fracción.
- 5) Finalmente, agregar 200 μL de reactivo concentrado de Bradford a cada tubo y agitar en vortex un par de segundos.
- 6) Dejar 5 min y leer la absorbancia a 595 nm. El color es estable por una hora.

### 8.10. Separación electroforética desnaturalizante (SDS-PAGE).

Las proteínas de la fracción soluble de las plántulas expuestas a los tratamientos fueron separadas electroforéticamente de acuerdo a la técnica de Schagger y von Jagow (1987). El procedimiento utilizado fue el siguiente.

#### 8.10.1. Preparación de geles de poliacrilamida.

- 1) Limpiar los vidrios con unas gotas de una solución de SDS al 3 %.
- 2) Colocar los vidrios en el soporte del aparato de electroforesis BIO-RAD.
- 3) Preparar el gel separador agregando los reactivos en el orden que se indica en la tabla y dejar polimerizar por 30 min a temperatura ambiente.
- 4) Preparar el gel concentrador agregando los reactivos como se indica en la tabla, colocar el peine y dejar polimerizar por 1 h a temperatura ambiente.

Reactivo	Concentración	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida/Bis-acrilamida	30% / 0.938%	2315 µL	330 µL
Amortiguador del gel	Tris-HCl 3M pH 8.9 /SDS 0.3%	2315 µL	620 µL
Glicerol	----	940 µL	----
H <sub>2</sub> O desionizada	----	1405 µ L	1530 µL
Persulfato de amonio	10 %	23.5 µL	23.5 µL
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	----	2.4 µL	2.4 µL

- 5) Remover el peine una vez polimerizado el gel.
- 6) Fijar las placas de vidrio con el gel en el soporte de la cámara de electroforesis.
- 7) Llenar la cámara del soporte con el gel con amortiguador del cátodo.
- 8) Cargar las muestras en el gel (previamente ajustado el volumen de las mismas con amortiguador de carga).
- 9) Llenar la cámara de electroforesis con amortiguador del ánodo.
- 10) Encender la fuente de poder y dejar correr el gel a 50 V por 30 min y luego incrementar a 100 V por 2 h.

### 8.10.2. Tinción de geles con azul de Coomassie.

- 1) Una vez concluida la separación, sacar el gel de los vidrios y colocarlo en un recipiente con 30 mL de solución de fijación (metanol 50% / ácido acético 10%) durante 2 h con agitación suave y constante.
- 2) Decantar la solución de fijación y añadir 30 mL de solución de azul de Coomassie (Brilliant Blue G250). Dejar en agitación suave por 4 h o toda la noche.
- 3) Decantar la solución de Coomassie y agregar 30 mL de solución de fijación (metanol 50% / ácido acético 10%). Dejar en agitación suave hasta que aparezcan las bandas.
- 4) Decantar la solución de fijación y agregar 30 mL de solución de glicerol 5 % para almacenar.

### 8.11. Western blot.

- 1) Una vez concluida la separación electroforética, remover el gel de las placas de vidrio y colocarlo en un recipiente de vidrio con 30 mL de solución amortiguadora de transferencia (Apéndice). Dejar en agitación constante de 15 a 30 min.
- 2) Ensamblar el cassette. Colocar una esponja y una hoja de papel filtro 3M previamente saturadas con amortiguador de transferencia, posteriormente colocar el gel y cubrirlo con una membrana de polivinilo difluoruro (PVDF), en seguida cubrir la membrana con una segunda hoja y una segunda esponja saturadas con amortiguador de transferencia. Finalmente cerrar el cassette.
- 3) Colocar el cassette dentro de la cámara de transferencia con el gel dirigido hacia el cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo.
- 4) Poner un agitador magnético en el fondo y cerrar la cámara, posteriormente colocar la cámara sobre la parrilla de agitación.
- 5) Encender la fuente de poder a 23 V y dejar transferir por 2 h y 30 min con agitación suave y constante.
- 6) Una vez finalizada la transferencia, sacar el cassette de la cámara y colocar la membrana de PVDF en un recipiente de vidrio con 30 mL de amortiguador TBS/tween 20 (Apéndice), con la superficie que estuvo en contacto con el gel hacia arriba.
- 7) Realizar dos lavados con 30 mL de TBS/tween 20 cada uno durante 5 y 10 min respectivamente con agitación suave y constante a temperatura ambiente.



- 8) Agregar 30 mL de solución bloqueadora (Leche Svelty 2% en TBS) y dejar en agitación suave y constante durante 1 h.
- 9) Decantar la solución bloqueadora y realizar dos lavados con TBS/tween 20 durante 5 y 10 min respectivamente con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- 10) Colocar la membrana en una bolsa de plástico y agregar la solución con el primer anticuerpo (anti-BiP, AGRISERA AS09481, dilución 1:2000 en solución de Leche 2% en TBS), sellar la bolsa y dejar en posición horizontal y en oscuridad durante toda la noche)
- 11) Sacar la membrana de la bolsa y colocarla en un recipiente de vidrio.
- 12) Realizar dos lavados con 30 mL de TBS/tween 20 cada uno durante 5 y 10 min respectivamente con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- 13) Agregar 10 mL de solución con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, Millipore AP132A, dilución 1:10000 en Leche al 2% en TBS) y dejar en agitación suave y constante por 3 h.
- 14) Realizar dos lavados con TBS/tween 20 durante 5 y 10 min respectivamente con agitación suave y constante a temperatura ambiente.
- 15) Realizar tres lavados, cada uno con 30 mL de TBS/tween 20 durante 10 min en agitación suave y constante.
- 16) Realizar un lavado con TBS durante 10 min con agitación suave y constante.
- 17) Agregar 30 mL de la solución de NBT/BCIP (Apéndice) para desarrollar color y dejar en agitación suave y constante durante 2 min.
- 18) Foto documentar la imagen de la membrana, dejar secar y guardarla en una bolsa.

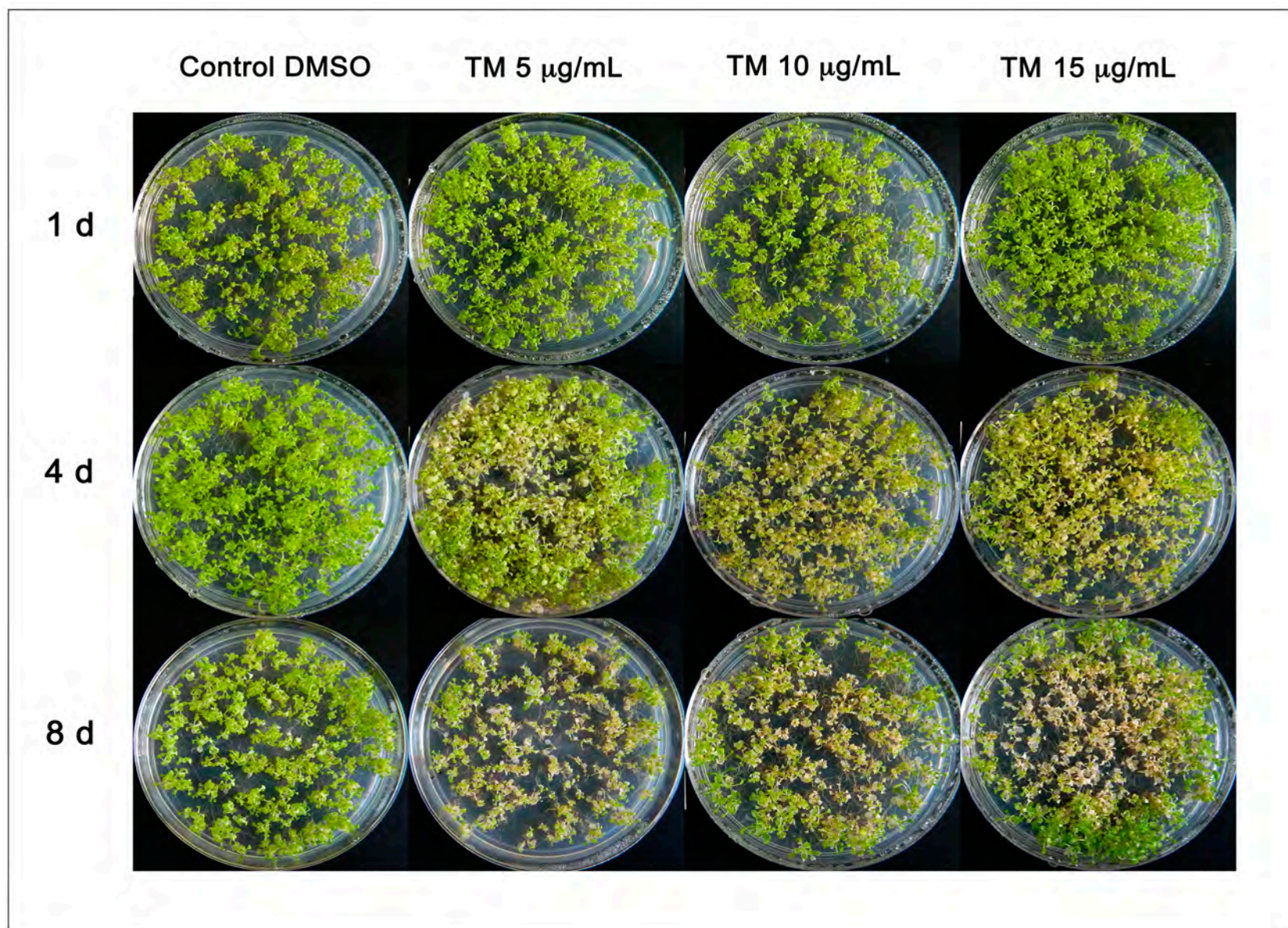
## 9. RESULTADOS.

### 9.1. Caracterización fenotípica del efecto del tratamiento con TM de plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre.

Para abordar la hipótesis de esta tesis era necesario tener un modelo en donde se observaran las características de MCP inducida por estrés de retículo endoplásmico, por lo cual se usó tunicamicina (TM) como inductor. Con el objetivo de conocer la magnitud y las características de las lesiones producidas tras la inducción de estrés de RE, se realizó la aplicación de diferentes concentraciones de tunicamicina a plántulas de 3 semanas de edad de *A. thaliana* del genotipo silvestre y se realizó el registro fotográfico del fenotipo de la porción aérea de las plántulas (Figura 1).

En la Figura 1 se presentan los fenotipos de la porción aérea a los 1, 4 y 8 días de tratamiento. Debido a que la tunicamicina se disolvió en DMSO, el tratamiento control consistió en exponer a las plantas a este disolvente. Para este experimento, los tratamientos correspondientes se aplicaron asperjando únicamente las plántulas dispuestas en el centro de la caja con el objetivo de evidenciar que la tunicamicina aplicada de esta forma es absorbida por las plántulas. Es importante mencionar, que la presencia de clorosis o pérdida de la pigmentación de las hojas no es un marcador de MCP, sin embargo en antecedentes experimentales realizados en nuestro laboratorio hemos observado que la MCP tras la exposición a FB<sub>1</sub> o TM se manifiesta como clorosis en las hojas de *Arabidopsis*, a partir de ésta observación se utilizó esta característica como herramienta de rápido diagnóstico de MCP.

Las plántulas con el tratamiento control no presentaron lesiones de muerte incluso después de 8 días de exposición. Transcurridas 24 h de exposición a los diferentes tratamientos, las plántulas no presentaron lesiones evidentes de muerte incluso en las plántulas expuestas a la mayor concentración de TM empleada (15 µg/ mL). Sin embargo, transcurridos 4 días de exposición, las plántulas tratadas con TM 5 µg/ mL ya presentaron señales de muerte. Estas lesiones se presentaron con mayor intensidad en las plántulas expuestas a las concentraciones de TM de 10 µg/ mL y 15 µg/ mL. Posteriormente, tras 8 días de exposición a TM, el número de plántulas con signos evidentes de clorosis aumentó incluso en los cultivos expuestos a la menor concentración de TM (5 µg/ mL), si bien, el efecto fue más evidente a la concentración de TM de 15 µg/ mL.



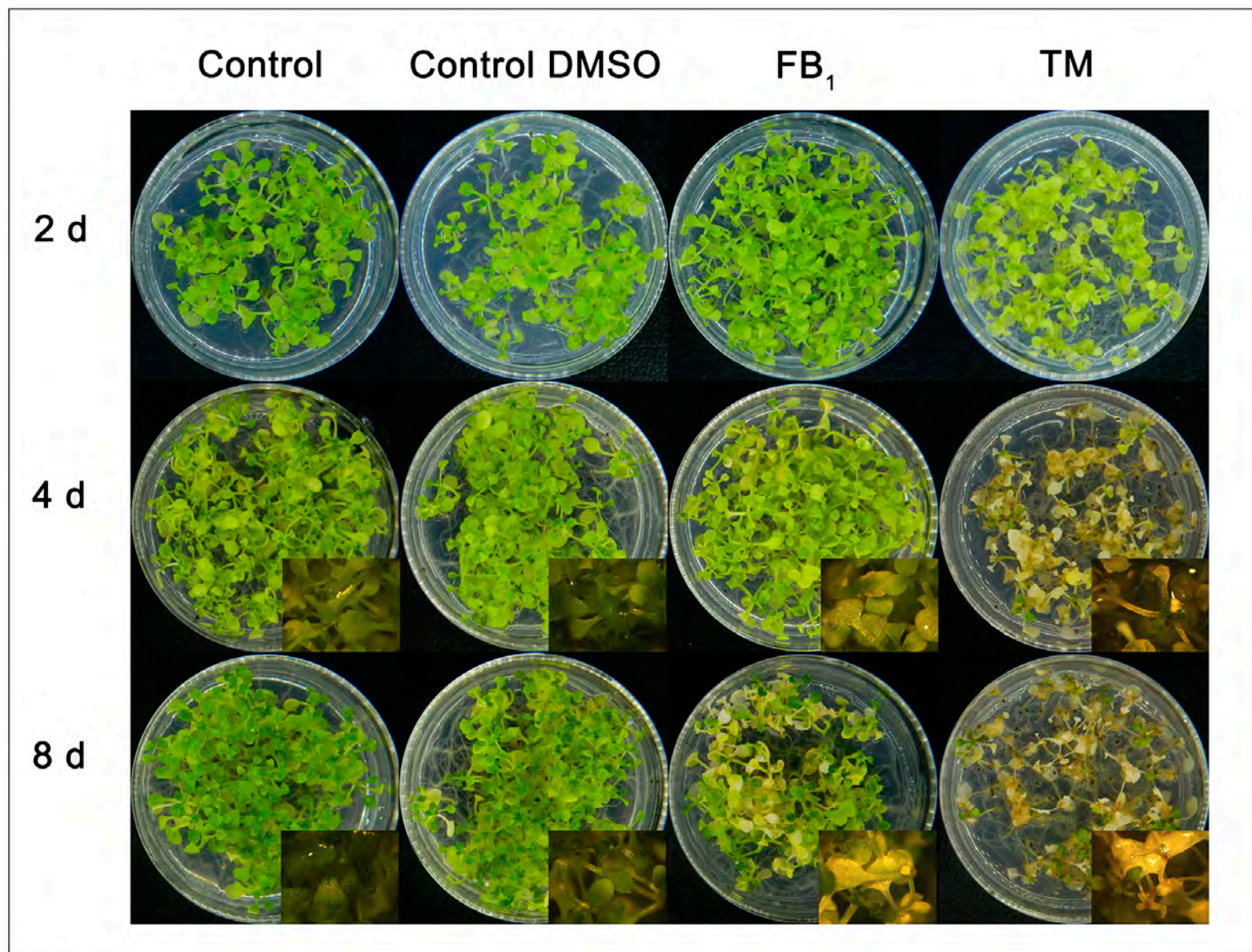
**Figura 1. Efecto de la TM en plántulas de genotipo silvestre de *A. thaliana*.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* wt de tres semanas de edad con una solución de DMSO 7 mM como control, según se detalla en Materiales y Métodos, o con una solución de TM de 5, 10 y 15  $\mu\text{g/mL}$  y con exposición a luz continua durante los tiempos indicados. Se muestran las fotografías representativas de un experimento con tres replicas. d: días de exposición.

## 9.2. Comparación fenotípica del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre.

Una vez observada la magnitud de las lesiones desarrolladas en las plántulas de *A. thaliana* expuestas a TM como inductor de MCP por estrés de RE en una amplia ventana de tiempo, se escogió una sola concentración de TM (5 µg/ mL) y se realizó el registro fenotípico del efecto de su exposición con el objetivo de compararlo con el efecto desarrollado por la inducción de la MCP mediada por BCL por exposición a FB<sub>1</sub> 10 µM en plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre (Figura 2).

En la Figura 2 se presenta el registro fotográfico del fenotipo observado tanto macroscópicamente como con mayor detalle con un microscopio adaptado a una cámara Motic para poder observar las características de las hojas de las plántulas. Las plántulas control fueron tratadas con H<sub>2</sub>O desionizada estéril y no presentaron lesiones en ninguno de los tiempos observados. Adicionalmente se trataron plántulas con una solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM, y que presentaron un fenotipo similar a las plántulas tratadas con H<sub>2</sub>O incluso después de 8 días de tratamiento.

Por otro lado, las plántulas con los tratamientos de FB<sub>1</sub> y TM no presentaron signos de clorosis transcurridos 2 días de tratamiento. Sin embargo, tras 4 días de exposición, las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub> presentaron signos de clorosis, los cuales fueron menos pronunciados que los observados en las hojas de las plántulas tratadas con TM. Este efecto, se magnificó y se hizo más evidente tras 8 días de exposición a FB<sub>1</sub> y lo mismo pasó con TM.



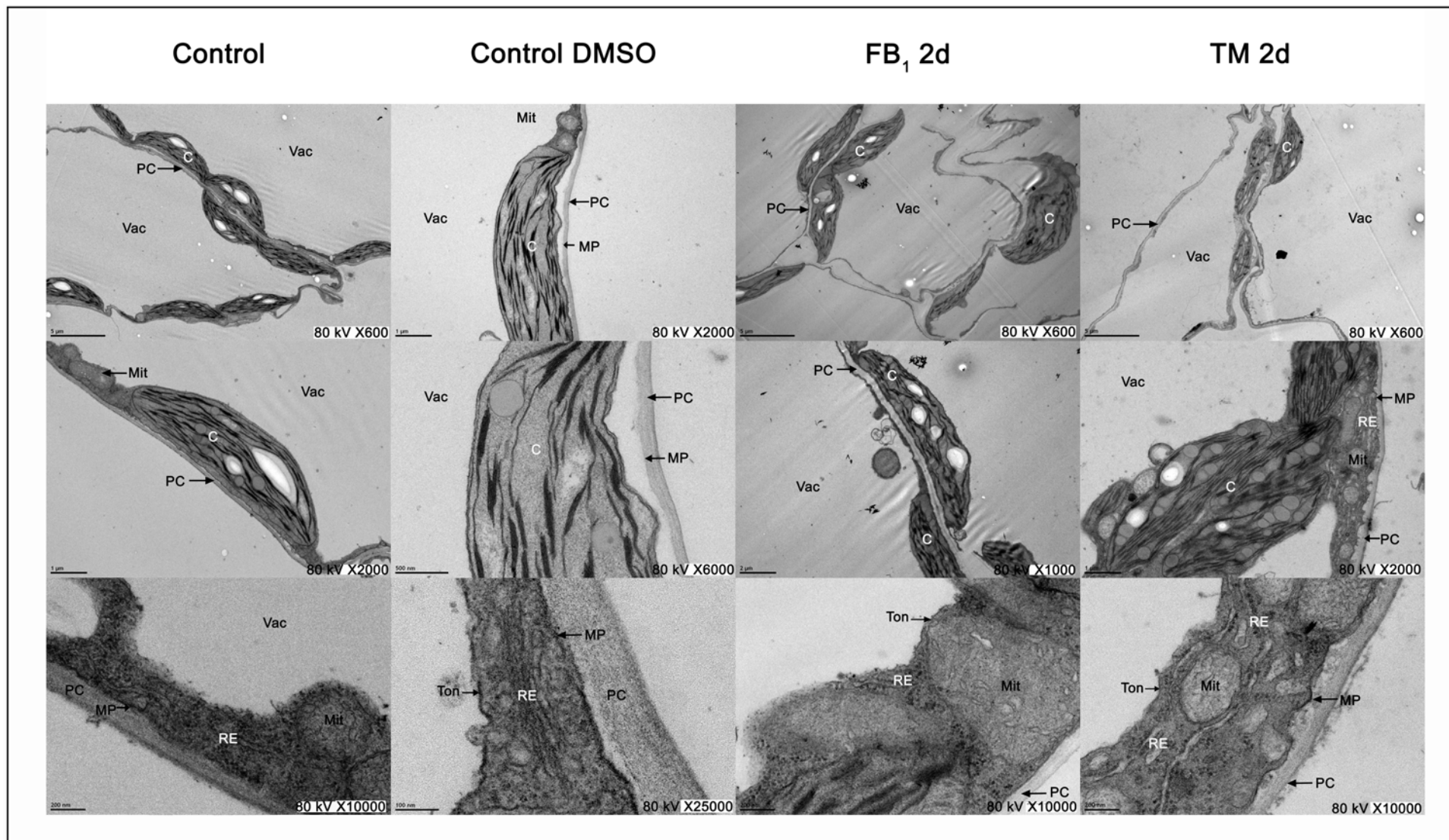
**Figura 2. Efecto de la TM en plántulas de genotipo silvestre de *A. thaliana*.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* wt de tres semanas de edad con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril, o con una solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM También se trataron plántulas con FB<sub>1</sub> 10 µM y TM 5 µg/mL con exposición a luz continua a los tiempos indicados. Se muestran las fotografías representativas de dos experimentos independientes con 3 a 5 réplicas cada uno. d: días de exposición.

### 9.3. Análisis del efecto de la exposición a TM o a FB<sub>1</sub> en la ultraestructura celular de plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre.

Una vez que se observó la magnitud y la temporalidad de las lesiones en el fenotipo de las plántulas de *A. thaliana* en vía de MCP inducida por la exposición a FB<sub>1</sub> y TM; se realizó el análisis ultraestructural de las plántulas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), con el objetivo de conocer el efecto y el progreso del daño celular en la morfología de los organelos celulares y comparar este cuadro con los efectos reportados en la literatura. Así se pudo disponer de más elementos para comparar los efectos de los dos compuestos y evaluarlos en función de la aparición de MCP.

En la Figura 3 se muestran las micrografías de MET de los microcortes de hojas de las plántulas tras 2 días de exposición a los tratamientos especificados y en tres aumentos diferentes. En la primera columna de imágenes, se observan las células con el tratamiento control que contienen abundantes cloroplastos típicos, algunos gránulos de almidón y membranas tilacoidales bien estructuradas que reflejan la integridad morfológica de la célula; así mismo, se distinguen mitocondrias y pared celular que se encuentran en condiciones normales, así como una porción de RE que no presenta hinchamiento y que se distingue como un sistema membranal con puntos electrodensos que corresponde a ribosomas adheridos. En la segunda columna se observan células con el tratamiento control de DMSO 7 mM; en esta condición, las células presentaron características morfológicas muy similares a las observadas en las células con el tratamiento control con H<sub>2</sub>O, en las que se observaron la membrana plasmática y el tonoplasto íntegros, ya que se apreciaron como membranas continuas y con características similares a las observadas en las células control, así como cloroplastos adyacentes a la membrana plasmática, indicando que la vacuola continúa ejerciendo presión de turgencia y por lo tanto no presenta ruptura. En los cloroplastos se observan membranas tilacoidales bien estructuradas con grana bien apilados y sin alteraciones morfológicas, como las características de células control. En la tercera columna se presentan las micrografías de las preparaciones de plántulas con el tratamiento de FB<sub>1</sub> y en las que se observaron células con menor cantidad de cloroplastos, los cuales, a su vez, presentaron alteraciones morfológicas, como pérdida de la forma ovalada y alargada clásica de los cloroplastos, así como alteración en la organización de los grana y en la membrana tilacoidal, ya que presentó abundantes ondulaciones. Por otro lado, la pared celular, la membrana plasmática y el retículo endoplásmico presentaron características similares a las características de estos organelos observadas en las células control. Sin embargo el tonoplasto presentó ruptura, ya que se

observaron zonas en la que esta membrana se visualizó como una línea discontinua; además, los cloroplastos adyacentes ya no presentaron su forma característica fusiforme o alargada. Finalmente, en la cuarta columna se presentan las micrografías de la preparación de plántulas tratadas con TM. Se observaron células que han perdido la forma poligonal clásica de las células vegetales debido a la pérdida de presión de turgencia, sugiriendo ruptura del tonoplasto. Se observó también la presencia de escasos cloroplastos que presentaron agregación y abundante formación de vesículas, sin embargo, las membranas tilacoidales no presentaron alteraciones en su estructura, ya que no se observan sinuosidades en la membrana. El lumen del retículo endoplásmico presentó un aumento de volumen. La membrana plasmática presentó abundantes sinuosidades y el tonoplasto presentó ruptura, ya que en los campos observados el tonoplasto presentó irregularidades en los sitios adyacentes a los cloroplastos y discontinuidad en múltiples puntos. Sin embargo la pared celular no presentó aumento en el grosor y las mitocondrias se observaron redondas y con una morfología muy similar a la de las mitocondrias observadas en las células control.



**Figura 3. Análisis ultraestructural de las plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre expuestas a  $FB_1$  o TM.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre de tres semanas de edad con  $H_2O$  desionizada y estéril como control, DMSO 7 mM (control del tratamiento con TM)  $FB_1$  10  $\mu$ M y TM 5  $\mu$ g/mL con exposición a luz continua durante 2 días. Se presentan las micrografías representativas de tres a cuatro diferentes campos para cada magnificación y preparación. C: cloroplasto, d: días, Mit: mitocondria, MP: membrana plasmática, PC: pared celular, RE: retículo endoplásmico Ton: tonoplasto y Vac: vacuola.



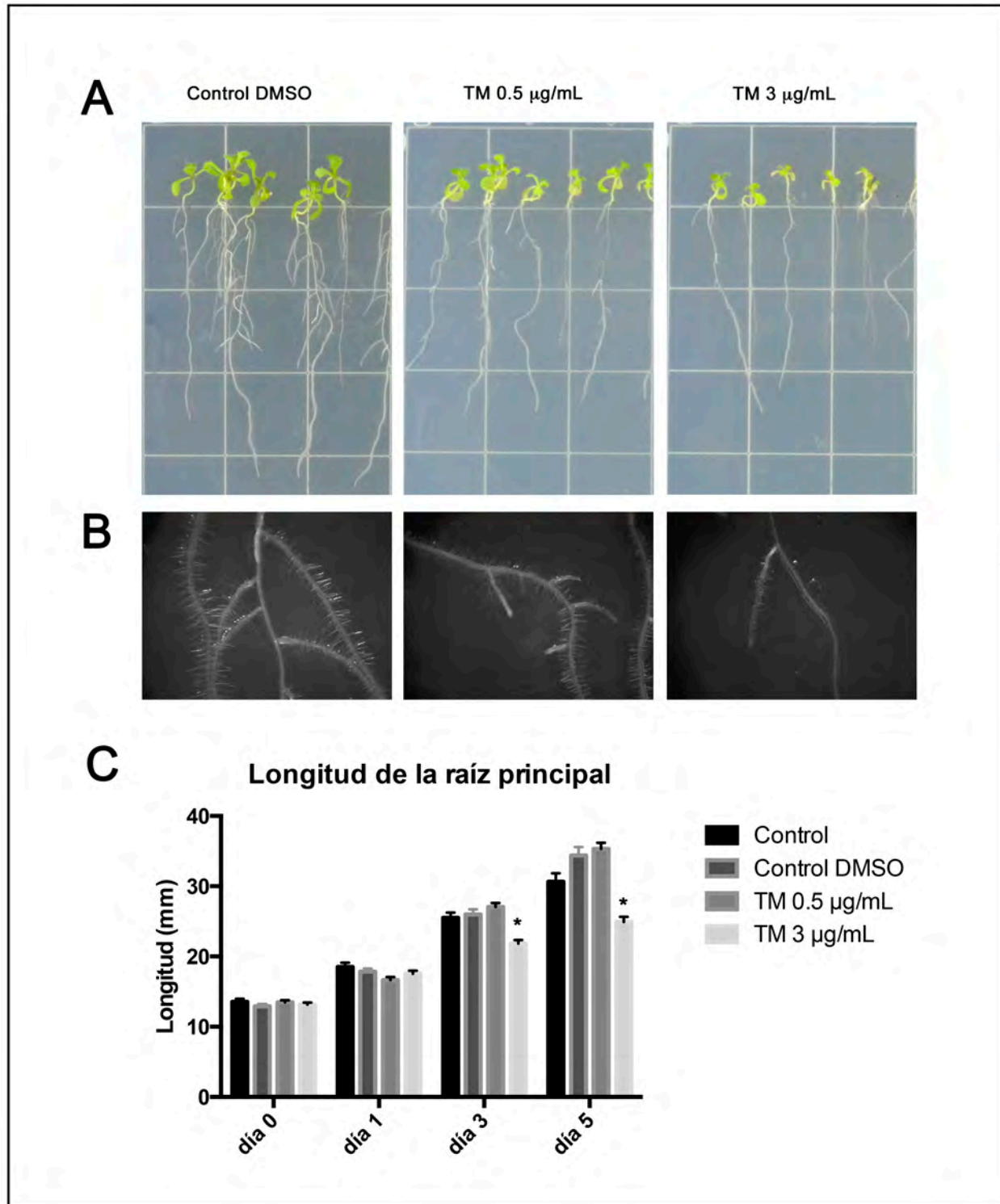
#### **9.4. Efecto del tratamiento con TM en el desarrollo de las raíces de plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre.**

La MCP inducida por estrés de RE en plantas fue caracterizada originalmente en raíces de *Arabidopsis*, en las que se observó que la TM ocasiona acumulación de especies reactivas de oxígeno, ruptura del tonoplasto y fragmentación de DNA, que se manifiesta en el fenotipo como retardo en el crecimiento de la raíz principal y la disminución de la cantidad y la longitud de las raíces secundarias y los pelos radiculares (Watanabe y Lam 2008). Con el objetivo de validar nuestro modelo de experimentación, se realizaron experimentos similares a los reportados en la literatura, en los que se trataron plántulas de *A. thaliana* de 5 días de edad del genotipo silvestre crecidas en posición vertical, a las que se les aplicó TM por aspersión y se determinó la longitud de la raíz principal transcurridos 1, 3 y 5 días de exposición, así como el registro fenotípico al quinto día de tratamiento.

En la Figura 4, panel A, se presenta el fenotipo de las plántulas tratadas con DMSO 7 mM, TM 0.5 µg/mL y TM 3 µg/mL tras 5 días de exposición. Como puede observarse, las plántulas del tratamiento control presentaron una porción aérea de mayor tamaño, así como abundantes raíces secundarias y de mayor longitud que las plántulas tratadas con TM.

En el panel B se presentan las micrografías tomadas con una cámara Motic adaptada a un microscopio estereoscópico. Las raíces con el tratamiento control presentaron abundantes pelos radiculares tanto en la raíz principal, como en las raíces secundarias, sin embargo las raíces tratadas con TM 0.5 µg/mL presentaron pelos radiculares menos abundantes y raíces secundarias de corta longitud con escasos pelos radiculares. Por otro lado las raíces tratadas con TM 3 µg/mL presentaron escasas raíces secundarias y carecen de pelos radiculares tanto en la raíz principal como en las raíces secundarias.

Finalmente en el panel C, se presenta la gráfica de la determinación de la longitud de la raíz principal de 60 raíces en cada tratamiento a través del tiempo. Las raíces del tratamiento control DMSO y con TM 0.5 µg/mL presentaron una longitud similar a las raíces del tratamiento control con H<sub>2</sub>O, incluso después de 5 días de exposición. Sin embargo, las raíces tratadas con TM 3 µg/mL presentaron una menor longitud respecto a las raíces control a los 3 y 5 días de exposición ( $P < 0.0001$  en ambos casos).



**Figura 4. Efecto de la TM en el desarrollo de las raíces de *A. thaliana* de genotipo silvestre.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre de cinco días de edad con  $\text{H}_2\text{O}$ , DMSO 7 mM y TM 0.5 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 5 días con exposición a luz continua. A) Fenotipo de las plántulas completas después de 5 días de exposición. B) Fenotipo de las raíces después de 5 días de exposición. C) Longitud de la raíz principal con ESM. 60 raíces de dos experimentos independientes. \* $P < 0.0001$ . Análisis estadístico ANOVA de dos vías: Graph Pad Prism versión 6.0.

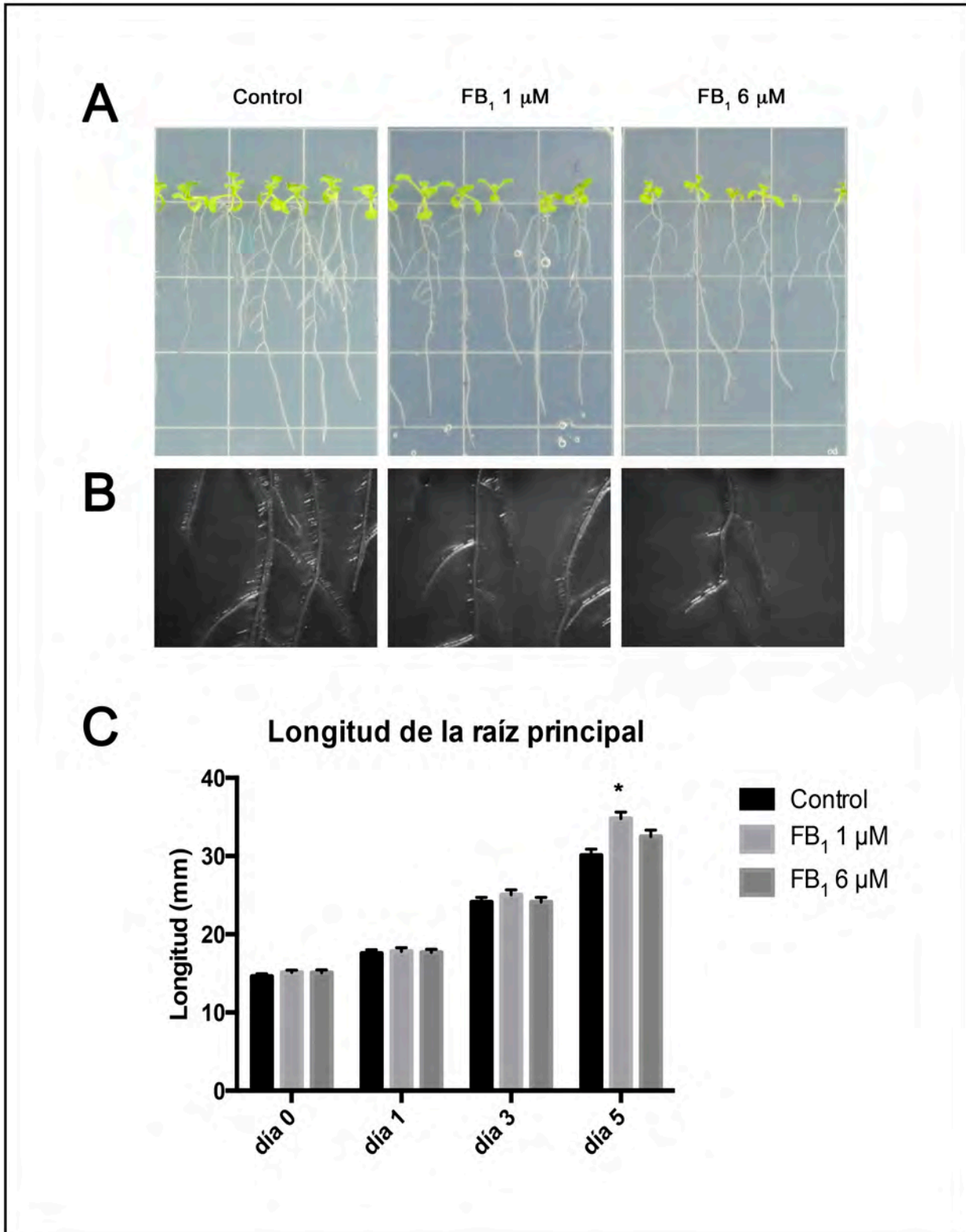
### 9.5. Efecto del tratamiento con FB<sub>1</sub> en el desarrollo de las raíces de plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre.

Con el objetivo de determinar si la exposición a FB<sub>1</sub> inhibe el desarrollo de las raíces de *Arabidopsis* como se ha visto en las raíces expuestas a TM, se realizó el experimento descrito en la sección anterior, pero ahora tratando con FB<sub>1</sub> las plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre de 5 días de edad crecidas en posición vertical, a las que se les aplicó por aspersion FB<sub>1</sub> a las concentraciones de 1 y 6  $\mu\text{M}$  y se determinó tanto la longitud de la raíz principal transcurridos 1, 3 y 5 días de exposición, como el registro fenotípico al quinto día de tratamiento.

En la Figura 5, panel A, en la primera columna, se presenta el fenotipo de las plántulas tratadas con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril como control tras 5 días de tratamiento. Se observan plántulas con abundantes raíces secundarias. En la segunda columna se presentan las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub> 1  $\mu\text{M}$ , las plántulas presentaron una porción aérea de tamaño similar a la porción aérea de las plántulas control, así como raíces principales de longitud similar a las raíces control. Sin embargo, las raíces secundarias de las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub> 1  $\mu\text{M}$  fueron menos abundantes y de menor longitud que las raíces secundarias de las plántulas control. En la tercera columna, las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub> 6  $\mu\text{M}$  presentaron una porción aérea más pequeña que la de las plántulas control. Las raíces presentaron menos raíces secundarias y de menor longitud, sin embargo la longitud de la raíz principal fue similar a la longitud de las raíces control.

En el panel B se presentan los fenotipos de las raíces tomadas con la cámara Motic conectada a un microscopio estereoscópico. En este acercamiento se observó que las raíces control presentaron abundantes pelos radiculares tanto en la raíz principal como en las raíces secundarias. En contraste, las raíces tratadas con FB<sub>1</sub> 1  $\mu\text{M}$  presentaron menor cantidad de pelos radiculares tanto en la raíz principal como en las raíces secundarias en comparación con las raíces control. Por otro lado, las raíces tratadas con FB<sub>1</sub> 6  $\mu\text{M}$  presentaron raíces secundarias más cortas y no presentaron pelos radiculares en la raíz principal y en las raíces secundarias.

Por último, en el panel C, se presenta la gráfica de la determinación de la longitud de la raíz principal por tratamiento por día de exposición y en la que se observó que la longitud de la raíz principal fue similar en las raíces de las plántulas tratadas con H<sub>2</sub>O, FB<sub>1</sub> 1  $\mu\text{M}$  o FB<sub>1</sub> 6  $\mu\text{M}$  a los 0, 1 y 3 días de tratamiento. No obstante, el análisis estadístico mostró que la longitud de las raíces principales tratadas con FB<sub>1</sub> 1  $\mu\text{M}$  fue significativamente mayor ( $P < 0.0001$ ) que las raíces tratadas con H<sub>2</sub>O o FB<sub>1</sub> 6  $\mu\text{M}$  tras 5 días de exposición.



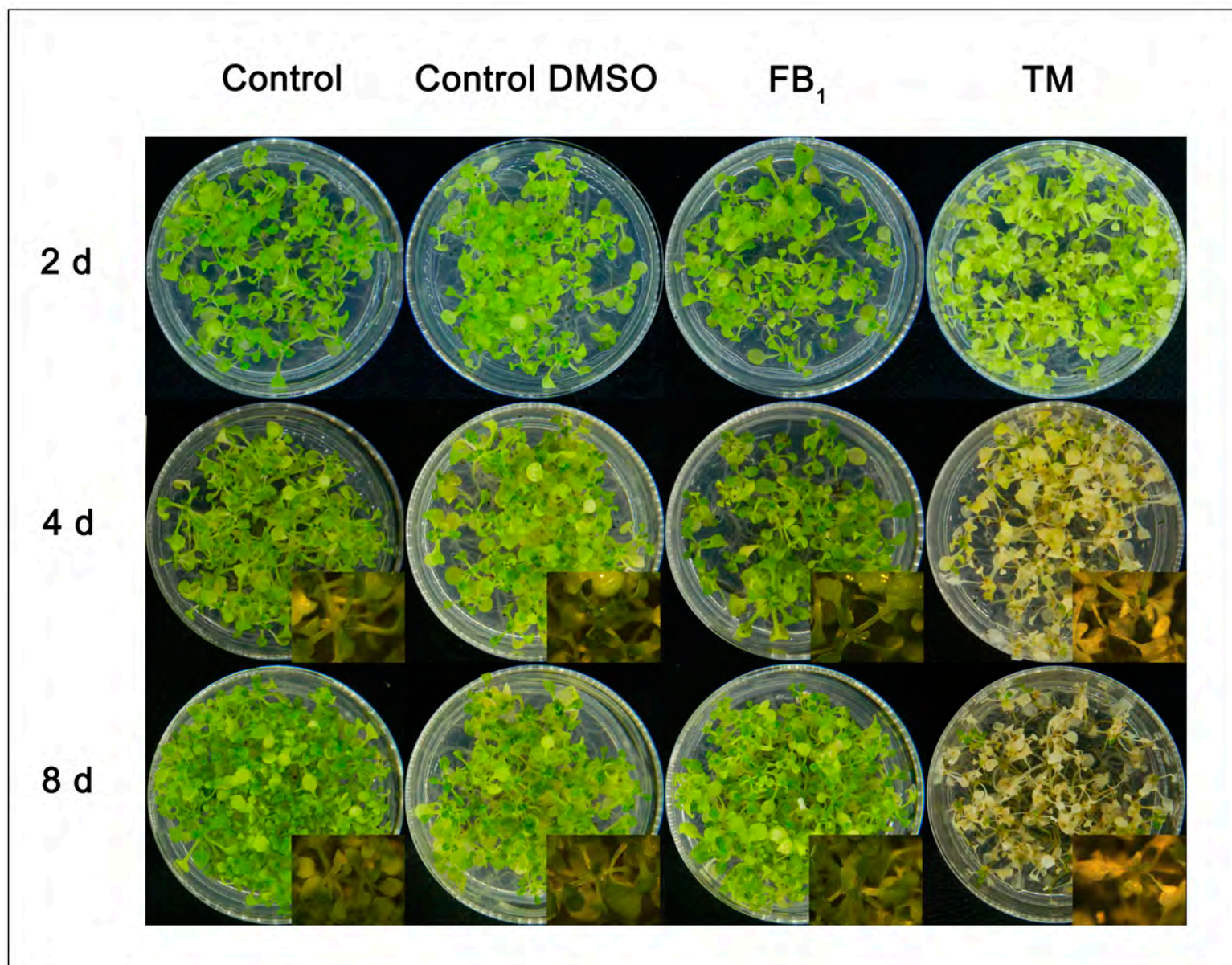
**Figura 5. Efecto de la exposición de FB1 en el desarrollo de las raíces de *A. thaliana* de genotipo silvestre.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre de cinco días de edad con  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FB}_1$  1 y 6  $\mu\text{M}$  con exposición a luz continua. A) Fenotipo B) Fenotipo de las raíces C) Longitud de la raíz principal con ESM. 60 raíces de dos experimentos independientes. \* $P < 0.0001$  Análisis estadístico ANOVA de dos vías: GraphPadPrism versión 6.0.

### 9.6. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo de plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1*.

La participación de las BCL como segundos mensajeros en la vía de MCP inducida por FB<sub>1</sub> fue reportada por Saucedo-García *et al.* (2011). En este trabajo, las plántulas de *Arabidopsis* de la línea *lcb2a-1*, que no expresan la subunidad LCB2a de la serinapalmitoiltransferasa (SPT) y por consiguiente producen menos BCL; presentaron un fenotipo de resistencia al tratamiento con FB<sub>1</sub>.

Habiendo determinado el efecto de TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo de la porción aérea de las plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre se realizaron los experimentos equivalentes con plántulas de *Arabidopsis* de la línea *lcb2a-1* con el objetivo de conocer si la TM, al igual que la FB<sub>1</sub> era insuficiente para inducir MCP en esta línea mutante, sugiriendo, en este caso, que las BCL podrían actuar como segundos mensajeros en la vía de MCP inducida por estrés de RE. En la Figura 6 se presenta el registro fotográfico del fenotipo observado macroscópica y microscópicamente y documentado con la cámara Motic. Las plántulas control fueron tratadas con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril y no presentaron lesiones a ninguno de los tiempos observados. Adicionalmente, se trataron plántulas con una solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM, mismas que presentaron un fenotipo similar al de las plántulas tratadas con H<sub>2</sub>O inclusive después de 8 días de tratamiento.

Por otro lado, las plántulas con el tratamiento de FB<sub>1</sub> presentaron características similares a las plántulas con los tratamientos control, aun transcurridos 8 días de tratamiento. Sin embargo, las plántulas tratadas con TM, presentaron signos de clorosis a los 4 días posteriores a la exposición. Así mismo, este efecto se hizo más evidente transcurridos 8 días de exposición a TM.



**Figura 6. Efectos fenotípicos comparativos del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1*.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* *lcb2a-1* de tres semanas de edad con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril, solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM, FB<sub>1</sub> 10 µM y TM 5 µg/mL con exposición a luz continua a los tiempos indicados. Se muestran las fotografías representativas de un experimento con 5 réplicas. d: días de exposición.

### 9.7. Análisis del efecto en la ultraestructura celular de la exposición a TM o a FB<sub>1</sub> en plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1*.

Tras determinar el fenotipo de las plántulas de *Arabidopsis* de la línea *lcb2a-1* en presencia de FB<sub>1</sub> y TM, se realizó el análisis ultraestructural de las plántulas correspondientes con el objetivo de conocer el efecto en la morfología de los organelos celulares en estas condiciones y corroborar el fenotipo observado a nivel macroscópico, así como observar el progreso del daño celular ocasionado por el tratamiento con TM en esta línea mutante y compararlo con el observado en las plántulas de genotipo silvestre.

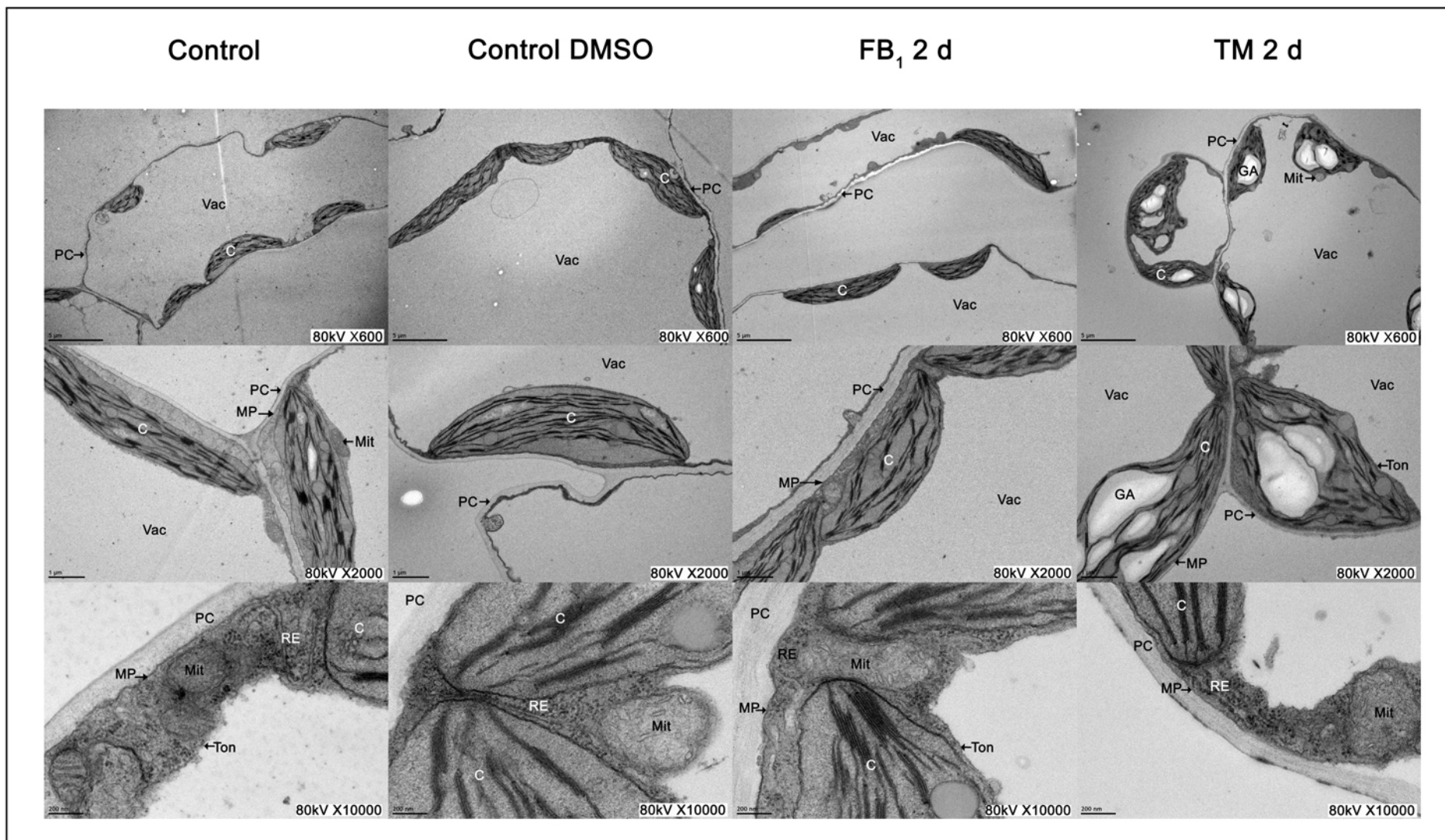
En la Figura 7 se muestran las micrografías de MET de las plántulas de la línea *lcb2a-1* tras 2 días de exposición a FB<sub>1</sub> y TM, así como los tratamientos control. En la primera columna, en las células con el tratamiento control con H<sub>2</sub>O se observaron células con cloroplastos alargados y ovalados, con escasas vesículas y gránulos de almidón, así como membranas tilacoidales continuas y sin ondulaciones, así mismo, se distinguieron mitocondrias redondas y ovaladas y con apariencia similar a las mitocondrias de las células de plántulas de genotipo silvestre, así como membrana plasmática continua y sin ondulaciones. El RE presentó una apariencia similar al de las células de genotipo silvestre, se observaron formaciones como líneas onduladas con puntos electrodensos que corresponden a ribosomas adheridos.

En la segunda columna, las células con el tratamiento control con DMSO 7 mM presentaron características morfológicas muy similares a las observadas en las células con el tratamiento control con H<sub>2</sub>O. Se observaron células poligonales con cloroplastos alargados y ondulados con escasas vesículas y gránulos de almidón, cuyas membranas tilacoidales se observaron íntegras, ya que no presentaron ondulaciones. Por otro lado el tonoplasto no presentó ruptura, ya que las células preservaron su forma poligonal y los cloroplastos se observaron adyacentes a la pared celular, lo que es consecuencia de la presión de turgencia ejercida por la vacuola al encontrarse íntegra.

En la tercera columna, las células con el tratamiento de FB<sub>1</sub> presentaron forma poligonal muy similar a las células control con H<sub>2</sub>O y DMSO, así como menor cantidad de cloroplastos, que se localizan adyacentes a la membrana plasmática, indicando la existencia de presión de turgencia y sugiriendo integridad del tonoplasto y la vacuola. Los cloroplastos fueron similares a los de las células control, ya que presentaron forma alargada y ovalada y sin gránulos de almidón. Las membranas tilacoidales no presentaron alteraciones morfológicas, ya que se observaron como líneas continuas y sin ondulaciones y con apariencia similar a las membranas tilacoidales de cloroplastos de las células control. Por otro lado, la pared celular mostró un

aumento en el grosor de la pared celular, como se ha observado anteriormente en plántulas del genotipo silvestre tratadas con FB<sub>1</sub> (Tapia de Aquino, 2012). La membrana plasmática no presentó ondulaciones y el retículo endoplásmico no evidenció incremento de volumen en el lumen, indicando la ausencia de alteraciones morfológicas y por lo tanto la ausencia de daño celular a nivel de ultraestructura. Finalmente en la cuarta columna, se observa que las células tratadas con TM presentaron la forma poligonal clásica de las células vegetales en condiciones control y presentaron abundantes cloroplastos adyacentes a la membrana plasmática debido a la presión de turgencia de la vacuola, sugiriendo que en estas células la vacuola no presentó ruptura; sin embargo los cloroplastos de estas células perdieron su forma alargada y presentaron abundantes gránulos de almidón de gran tamaño. No obstante, a pesar de las alteraciones en cuanto a aumento de tamaño de esos cloroplastos, una magnificación de 10000x reveló que únicamente las membranas tilacoidales de los cloroplastos con una alteración severa en la forma del cloroplasto presentaron alteración en su estructura, ya que las membranas de los grana no se apreciaron como líneas rectas, sino como líneas difusas y curvadas, mientras que la mayoría de los cloroplastos no presentaron daño en la membrana tilacoidal, distinguiéndose claramente líneas continuas y sin ondulaciones. Por otro lado, el lumen del RE presentó un considerable aumento de volumen comparado con el RE de las células control. En contraste, la membrana plasmática no presentó alteración en su morfología, ya que se observa como una línea recta, no difusa y sin ondulaciones que se localiza adyacente a la pared celular, como se apreció en las células control. Por otro lado, las mitocondrias no presentaron cambios morfológicos apreciables a nivel de ultraestructura, ya que tanto en las células tratadas con TM como en las células control se observaron mitocondrias con la morfología clásica ovalada y redonda en las que se aprecia claramente la membrana interna mitocondrial. Finalmente, la pared celular, al compararla con la de las células control no presentó aumento de grosor o algún otro cambio en su morfología a nivel de ultraestructura.





**Figura 7. Análisis ultraestructural de las plántulas de *A. thaliana* de línea *lcb2a-1* expuestas a  $FB_1$  y TM.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de línea *lcb2a-1* de tres semanas de edad con  $H_2O$  desionizada y estéril como control, DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM,  $FB_1$  10  $\mu$ M y TM 5  $\mu$ g/mL con exposición a luz continua durante 2 días. Se presentan las micrografías representativas de tres a cuatro diferentes campos para cada magnificación y preparación. C: cloroplasto, d: días, GA: granulos de almidón, Mit: mitocondria, MP: membrana plasmática, PC: pared celular, RE: retículo endoplásmico Ton: tonoplasto y Vac: vacuola.

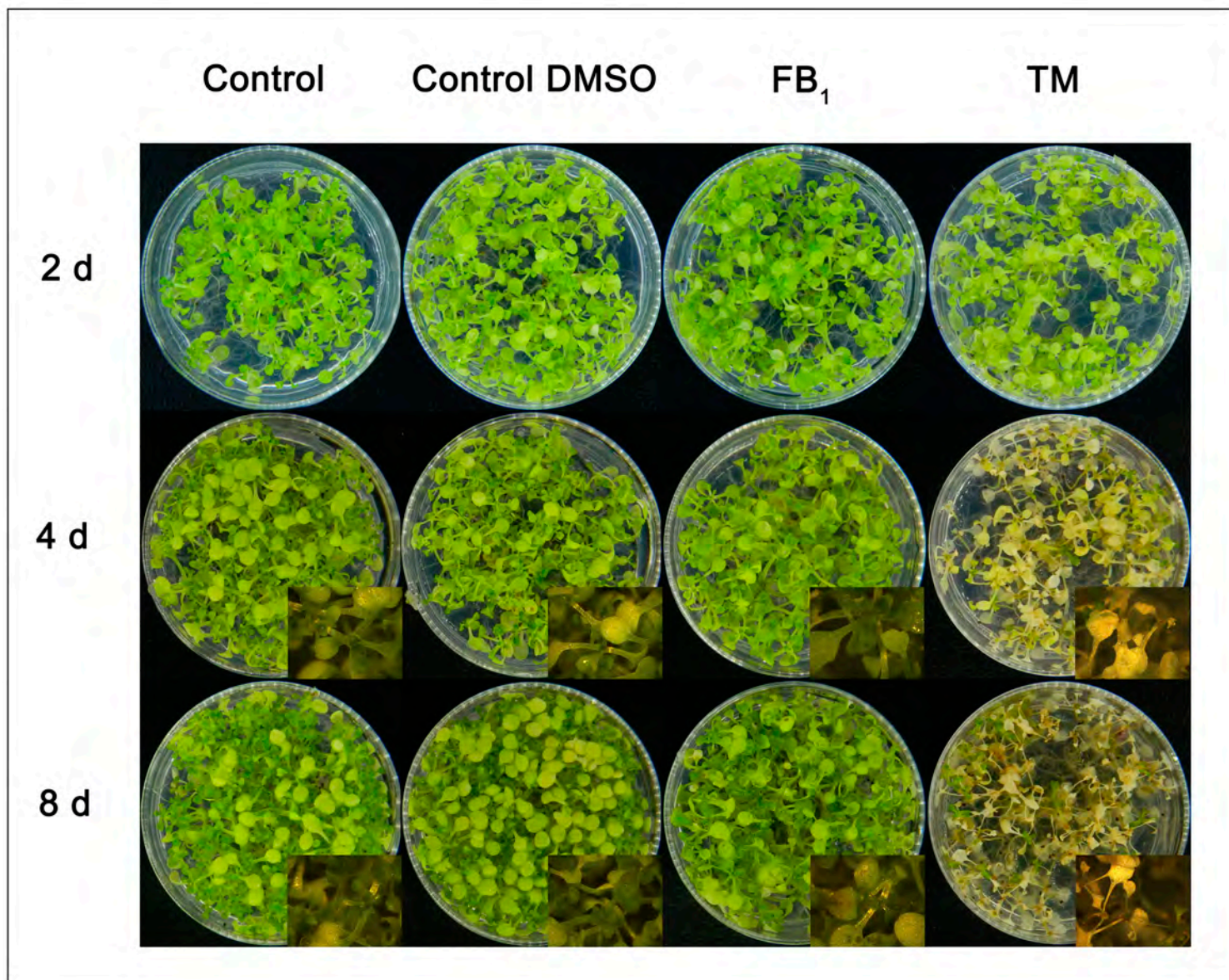
### 9.8. Comparación del efecto de los tratamientos con TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo de plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfld18-18*.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas de corta vida media que pueden actuar como segundos mensajeros y se producen en diferentes sitios dentro de la célula. La señalización mediada por ERO en las plantas es muy compleja y depende de las interacciones con otras proteínas y moléculas señalizadoras como el óxido nítrico, lípidos señalizadores y fitohormonas (Gechev y Hille, 2005). En el cloroplasto, las ERO se producen en los fotosistemas I y II y por la transferencia de electrones a moléculas de oxígeno molecular por la actividad de la ferredoxina (Fdx) y en otros sitios de la cadena fotosintética. Por otro lado, las ERO están involucradas en la vía de MCP mediada por BCL (Stone *et al.* 2000; González-Solís 2009).

La mutante de *A. thaliana pfld 18-18* expresa a la proteína bacteriana flavodoxina (Fld), una proteína acarreadora de electrones, que participa en diferentes vías que involucran reacciones de óxido-reducción en bacterias. Se observó que la expresión de Fld en el cloroplasto genera plantas con mayor resistencia a diferentes tipos de estrés y menor producción de ERO. Se ha sugerido que la proteína Fld en el cloroplasto podría sustituir las funciones de la Fdx en condiciones de estrés oxidativo, con el fin de mejorar la eficiencia de las reacciones de transferencia de electrones en éstas condiciones y evitar la formación de ERO, como se ha observado en bacterias (Zurbriggen *et al.* 2008).

Con el objetivo de comparar el efecto de los tratamientos con FB<sub>1</sub> y TM en el fenotipo de plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfld18-18* y determinar si las ERO son esenciales para la MCP inducida por estrés de RE, se realizó el tratamiento de plántulas de tres semanas de edad con FB<sub>1</sub> o TM y se registró el fenotipo hasta los 8 días de exposición.

En la Figura 8 se presenta el registro fotográfico del fenotipo observado macroscópica y microscópicamente. Las plántulas control fueron tratadas con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril y no presentaron lesiones a ninguno de los tiempos observados. Adicionalmente se trataron plántulas con una solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM, que presentaron un fenotipo similar al de las plántulas tratadas con H<sub>2</sub>O incluso después de 8 días de tratamiento. Por otro lado, las plántulas con el tratamiento de FB<sub>1</sub> no presentaron clorosis y las características manifestadas fueron similares a las mostradas por las plántulas con los tratamientos control tras 8 días de exposición. En contraste, las plántulas tratadas con TM, presentaron signos de clorosis desde los 4 días de exposición.



**Figura 8. Efectos fenotípicos comparativos de los tratamientos con TM y FB<sub>1</sub> en plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfd18-18*.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfd18-18* de tres semanas de edad con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril o con una solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento de TM, FB<sub>1</sub> 10 µM y TM 5 µg/mL; las plántulas fueron expuestas a luz continua a los tiempos indicados. Se muestran las fotografías representativas de un experimento con 5 réplicas. d: días de exposición.

### 9.9. Determinación de la expresión de la proteína luminal de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.

La proteína luminal de unión (BiP) es una proteína chaperona cuya expresión es inducida en respuesta a la acumulación de péptidos desplegados en el lumen del RE como parte de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). En consecuencia, la expresión de esta proteína se ha considerado un marcador canónico de estrés de RE.

Con el fin de conocer si la MCP mediada por BCL está mediada también por estrés de RE, se trataron plántulas de *A. thaliana* de genotipo silvestre con FB<sub>1</sub> y con TM y se determinó por inmunodetección la expresión de BiP en la fracción soluble obtenida de la parte aérea de las plántulas expuestas.

En la Figura 9 se presentan las fotografías de los patrones electroforéticos y las inmunoréplicas representativas de dos experimentos independientes, así como los niveles de expresión de BiP graficados y expresados en % en relación al control para cada tiempo y tratamiento.

Para este experimento, se realizó el tratamiento de plántulas de *A. thaliana* con TM o DMSO como control y con FB<sub>1</sub> o H<sub>2</sub>O durante 8, 12, 24 o 48 h con exposición a luz continua; transcurridos los tiempos correspondientes, se cosechó la porción aérea de las plántulas y se obtuvo la fracción soluble como se describe en Materiales y Métodos. Con el objetivo de realizar un control de cargado de proteína en los geles, se realizó la separación electroforética y tinción con Coomassie de los geles de acrilamida-SDS, para lo cual se realizó la determinación de proteína por el método de Bradford y se cargó en cada carril 10 mg de proteína total de cada muestra de fracción soluble. En los paneles A y B se presentan los patrones electroforéticos de la fracción soluble obtenida de las plántulas tratadas con TM o DMSO (panel A) y con FB<sub>1</sub> o H<sub>2</sub>O (panel B).

En el panel A, en el carril 1 se presenta el estándar de peso molecular (BenchMark de Invitrogen), en el carril 2 y 3 se cargó la fracción soluble de las muestras tratada con DMSO (control) y TM, respectivamente, tras 8 h de tratamiento con exposición a luz continua, es decir para cada tiempo de tratamiento con TM o FB<sub>1</sub> se realizó una muestra control con el mismo tiempo de exposición a luz continua, esto resulta relevante, ya que la exposición a luz continua *per se* tiene efectos en la fotosíntesis y la formación de ERO (Buchanan 2000), por lo que fue necesario realizar un tratamiento control para cada tiempo de exposición.

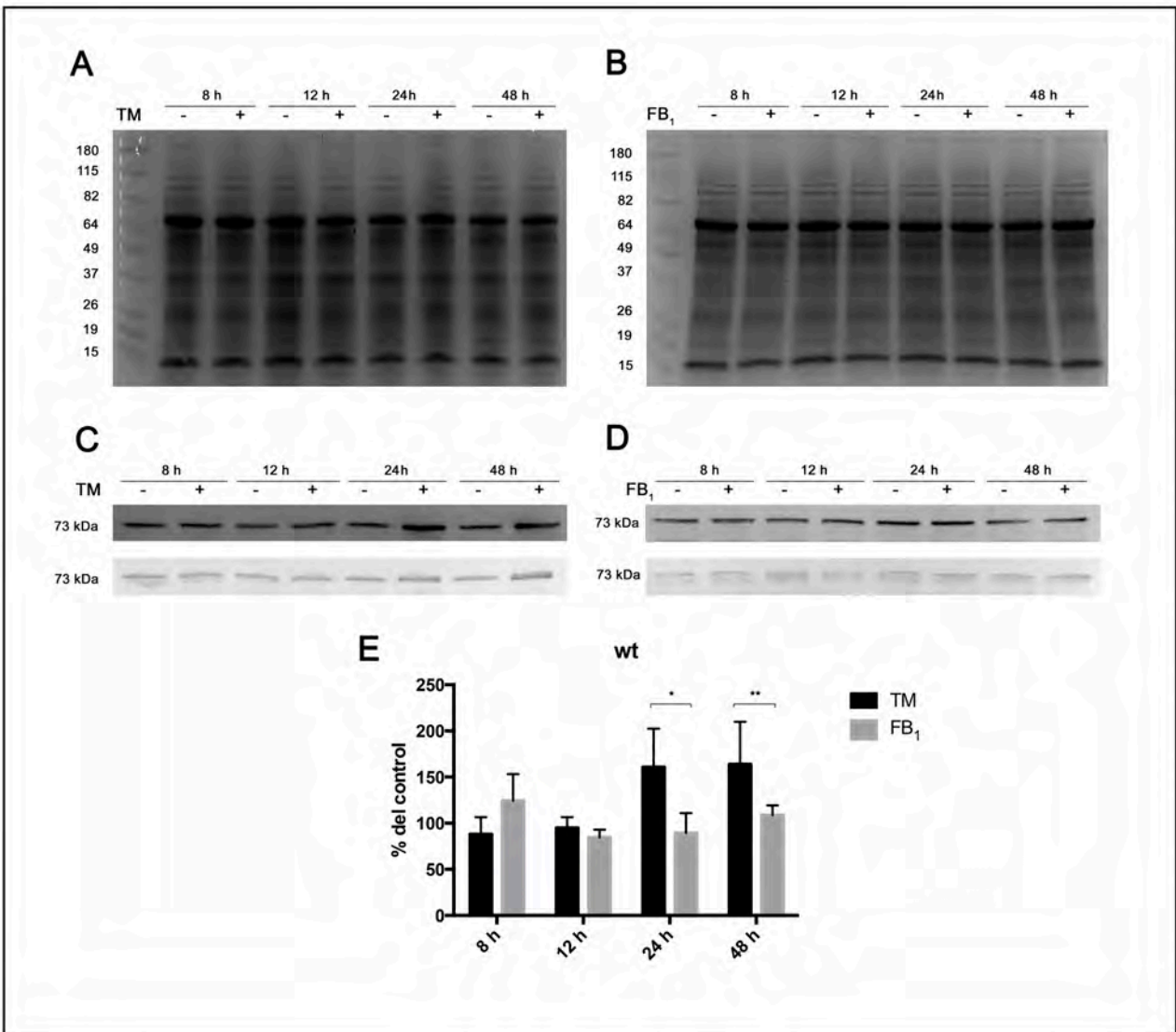
Para verificar que la concentración de proteína de cada muestra de fracción soluble determinada por el método de Bradford y por consiguiente la cantidad de proteína cargada en el gel fuera la misma, se realizó la tinción del gel con azul de Coomassie con el fin de determinar visualmente que la intensidad de todas las bandas de cada carril fuera muy similar entre las bandas correspondientes a los mismos pesos moleculares en los carriles subsecuentes. Como puede observarse, la intensidad de las bandas fue muy similar en cada una de los carriles en ambos geles, incluso en las bandas de mayor masa molecular.

En el panel C se presentan dos inmunorélicas representativas de cada experimento de exposición de plántulas a TM. Se muestra la banda de 73 kDa que corresponde a la proteína BiP. Como puede observarse, tras 8 y 12 h de tratamiento con TM, la intensidad de esta banda no mostró incremento significativo respecto a sus tratamientos control. Sin embargo tras 24 y 48 h de exposición a TM se observó un incremento significativo en la intensidad de la banda de 73 kDa correspondiente a la proteína BiP.

En el panel D se presentan las inmunorélicas de la fracción soluble de las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub>. Como se observa, la intensidad de la banda de 73 kDa de las muestras tratadas con FB<sub>1</sub> durante 8, 12, 24 y 48 h fue similar respecto a la de las muestras control, es decir, la expresión de BiP no fue inducida por el tratamiento con FB<sub>1</sub>, incluso transcurridas 48 h de exposición.

Finalmente, en el panel E se muestra la gráfica del análisis densitométrico de las imágenes digitales de cuatro blots correspondientes a dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno. La intensidad de las bandas correspondientes a los tratamientos con TM o FB<sub>1</sub> fueron expresadas en % respecto al control, considerando como 100 % a la intensidad de la banda de la fracción soluble de las plántulas sin tratamiento y con el mismo tiempo de exposición a luz continua (tratamiento control). Como se observa en la gráfica, al comparar el perfil de expresión de BiP inducido por el tratamiento con FB<sub>1</sub> con el perfil de expresión de BiP inducido por TM, la expresión de BiP fue similar hasta las 12 h de exposición a los inhibidores respectivos ( $P > 0.005$ ). Sin embargo transcurridas 24 y 48 h de exposición, la expresión de BiP se incrementó aproximadamente 60% tras la inducción con TM respecto a su tratamiento control (DMSO). Para el caso de FB<sub>1</sub>, la expresión de BiP se incrementó aproximadamente 20% a las 8 h, pero fue similar respecto a su tratamiento control (H<sub>2</sub>O) a las 12, 24 y 48 h. Finalmente, el análisis estadístico de ambos perfiles de expresión de BiP mostró una clara

diferencia significativa con TM a las 24 y 48 h ( $P= 0.0041$  y  $P=0.0321$  respectivamente). Es decir, TM incrementó aproximadamente 60% la expresión de BiP tras 24 h de exposición a TM a nivel de cantidad de proteína presente en la fracción soluble de plántulas de *Arabidopsis*, mientras que la acumulación de BCL inducida por  $FB_1$  indujo una expresión de BiP de aproximadamente 20 % a las 8 h de exposición.



**Figura 9. Expresión de BiP en plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre expuestas a TM y  $FB_1$ .** Se trataron plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre de tres semanas de edad con  $H_2O$  desionizada y estéril, solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM,  $FB_1$  10  $\mu M$  y TM 5  $\mu g/mL$  con exposición a luz continua a los tiempos indicados. A y B) Patrones electroforéticos, C y D) Inmuno-réplicas E) Gráfica del análisis densitométrico expresado en % del control de cada tratamiento con DS. Se muestran las fotografías representativas de dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno. h: horas de exposición. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con comparación de medias. \* $P=0.0041$ , \*\* $P=0.0321$ .

### 9.10. Determinación de la expresión de la proteína luminal de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1* expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.

Tras realizar el análisis del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo y en la ultraestructura en las plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1*, se realizaron los experimentos de determinación de la expresión de BiP en plántulas expuestas a estos tratamientos con el objetivo de obtener más evidencias moleculares acerca del efecto de resistencia a nivel fenotípico y ultraestructural de la línea *lcb2a-1* al tratamiento con FB<sub>1</sub> (Saucedo-García *et al.* 2011) y conocer el efecto de la TM en la expresión de BiP y el estrés de RE en esta línea. La comparación de la expresión de BiP en las plántulas de la línea mutante con respecto a las del genotipo silvestre serviría para conocer si la deficiencia en la producción de BCL tiene un efecto en la transducción de la MCP inducida por estrés de RE.

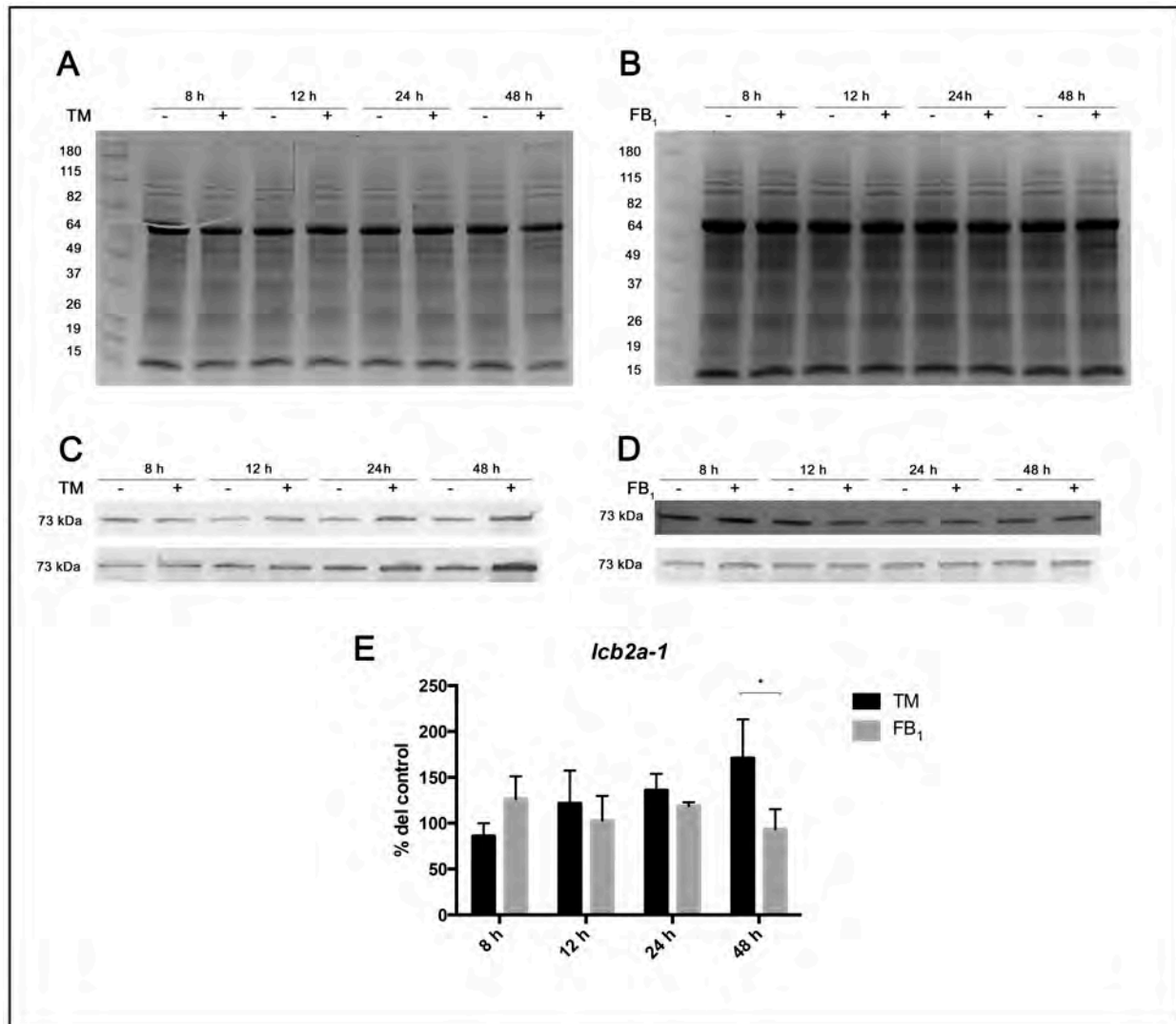
En la Figura 9, en el panel A y B se muestran los patrones electroforéticos de la fracción soluble de las plántulas de la línea *lcb2a-1* expuestas a TM y FB<sub>1</sub>. Como puede observarse, la intensidad de las bandas de mayor peso molecular y de todo el patrón electroforético en general es muy similar en cada carril de ambos geles independientemente del tratamiento y los tiempos de exposición.

En el panel C, se muestran dos inmunoréplicas representativas de los dos experimentos de exposición a TM. Se comparó la intensidad de la banda de 73 kDa que corresponde a la proteína BiP de las muestras tratadas con TM respecto al tratamiento control y se observó que la expresión de BiP fue similar en ambos tratamientos tras 8 h de exposición; no obstante, la expresión de BiP se incrementó aproximadamente 20, 35 y 70 % tras 12, 24 y 48 h de exposición a TM respectivamente.

Por otro lado, en el panel D, las inmunoréplicas de la fracción soluble de las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub> mostraron un incremento de la expresión de BiP de aproximadamente 26 % a las 8 h y del 18 % a las 24 h de exposición, mientras que a las 12 y 48 h la expresión de BiP fue similar en las plántulas tratadas con FB<sub>1</sub> y el tratamiento control.

Finalmente en el panel E, se presenta la gráfica del análisis densitométrico de las imágenes digitales de los blots y el análisis estadístico con comparación de medias entre el tratamiento con TM y FB<sub>1</sub>. Tras comparar el perfil de expresión de BiP inducido por FB<sub>1</sub>

respecto al inducido por TM, se observó que la expresión de BiP fue similar en las plántulas de la línea *lcb2a-1* tratadas con FB<sub>1</sub> y TM a las 8, 12 y 24 h de exposición, ya que no mostraron diferencia significativa ( $P < 0.005$ ). Sin embargo, tras 48 h de exposición, la expresión de BiP inducida por TM fue significativamente mayor ( $P = 0.0013$ ) al de FB<sub>1</sub>.



**Figura 9. Expresión de BiP como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1* expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1* de tres semanas de edad con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril, solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento con TM, FB<sub>1</sub> 10  $\mu$ M y TM 5  $\mu$ g/mL con exposición a luz continua a los tiempos indicados. A y B) Patrones electroforéticos, C y D) Inmuno réplicas E) Gráfica del análisis densitométrico expresado en % del control de cada tratamiento con DS. Se muestran las fotografías representativas de dos experimentos independientes con dos replicas cada uno. h: horas de exposición. Análisis densitométrico: ImageJ 1.49e. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con comparación de medias. \* $P = 0.0013$ .



### 9.11. Determinación de la expresión de la proteína luminal de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfl18-18* expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.

Después de realizar el análisis del efecto del tratamiento con TM en el fenotipo y en la ultraestructura en las plántulas de *A. thaliana* de la línea *pfl18-18*, se realizaron los experimentos de determinación de la expresión de BiP en plántulas expuestas a TM y FB<sub>1</sub> con el objetivo de conocer el efecto de la disminución en la producción de ERO del cloroplasto en la inducción de estrés de RE y analizar la relevancia funcional de éstas moléculas en la transducción de señales de las vías de MCP.

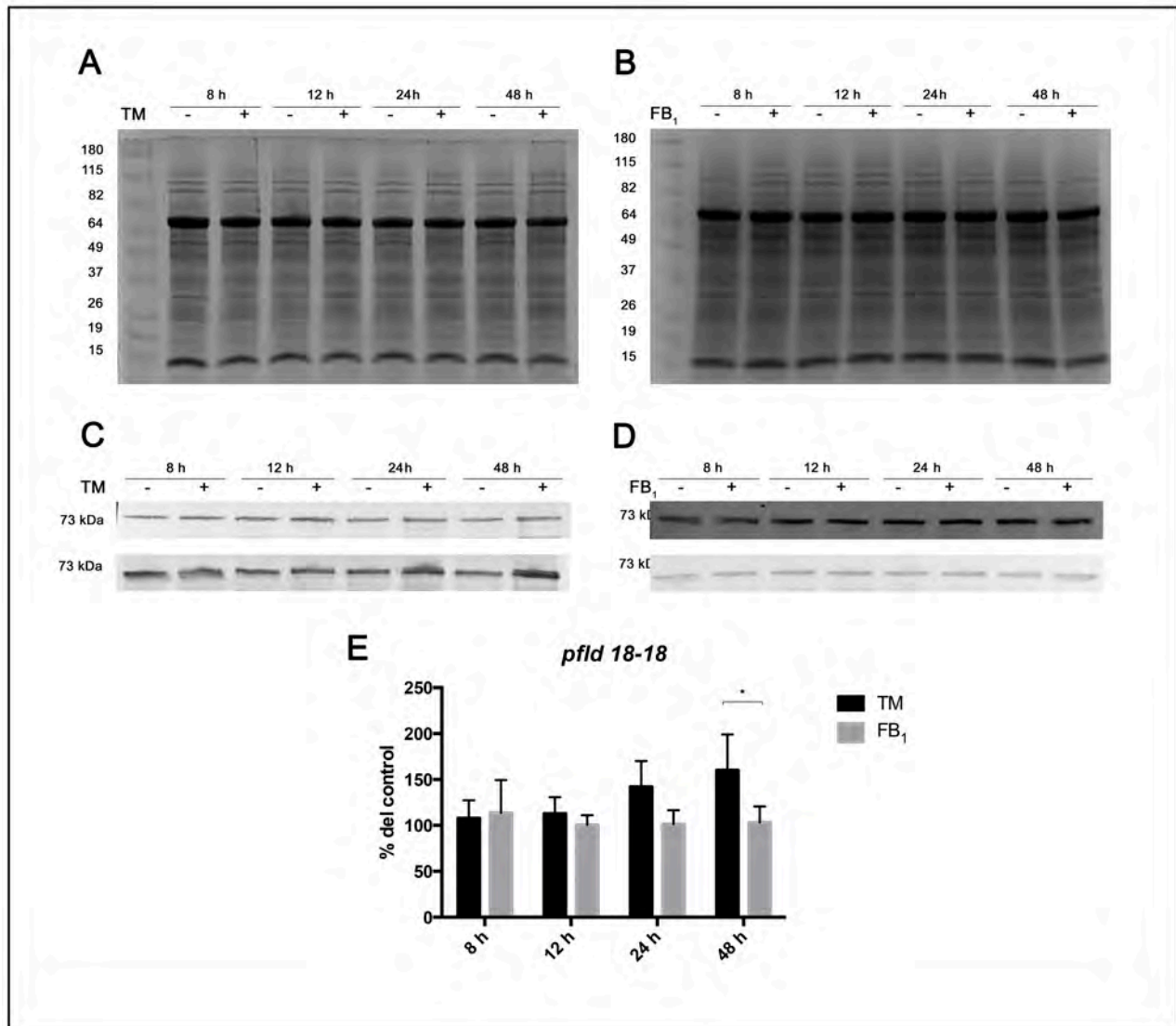
En la Figura 10, en el panel A y B se muestran los patrones electroforéticos de la fracción soluble de las plántulas de la línea *pfl18-18* expuestas a TM y FB<sub>1</sub> tras 8, 12, 24 y 48 h de exposición. Tras realizar la separación electroforética de la fracción soluble de las plántulas de *A. thaliana*, se observó que el patrón de las bandas, así como la intensidad de las bandas del mismo peso molecular en cada carril fue muy similar entre sí, indicando que el proceso de obtención de la fracción soluble fue consistente en cada muestra de plántulas y que la determinación de las concentraciones de proteína total de cada muestra son confiables para la realización de las inmunoréplicas.

En el panel C se presentan las inmunoréplicas representativas de dos experimentos de exposición a TM de la línea *pfl18-18*. Analizando la intensidad de las bandas de 73 kDa correspondientes a BiP en cada carril, se encontró que las plántulas expuestas a TM mostraron un incremento en la expresión de BiP de aproximadamente 7, 11, 40 y 60 % a las 8, 12, 24 y 48 h respectivamente.

Por otro lado, en el panel D, se muestran las inmunoréplicas de la fracción soluble de las plántulas expuestas a FB<sub>1</sub>. Tras realizar el análisis densitométrico correspondiente, se observó que el tratamiento con FB<sub>1</sub> indujo un aumento en la expresión de BiP de aproximadamente 13% a las 8 h respecto a su tratamiento control, sin embargo, transcurridas 12, 24 y 48 h de exposición a FB<sub>1</sub> no se observó incremento en la expresión de BiP.

Finalmente en el panel E, se presenta la gráfica del análisis densitométrico y el análisis estadístico de cuatro inmunoréplicas correspondientes a dos experimentos independientes para cada uno de los tratamientos. Como se observa en la gráfica E, la expresión de BiP en las plántulas con el tratamiento de TM no mostró diferencias significativas respecto a las plántulas

tratadas con  $FB_1$  tras 8, 12 y 24 h de exposición, sin embargo, transcurridas 48 h, la expresión de BiP fue significativamente mayor en las plántulas tratadas con TM (60 %) respecto a las tratadas con  $FB_1$  ( $P=0.0328$ ).



**Figura 10. Expresión de BiP en plántulas de *A. thaliana* de la línea *pld18-18* expuestas a TM y  $FB_1$ .** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de la línea *pld18-18* de tres semanas de edad con  $H_2O$  desionizada y estéril, solución de DMSO 7 mM como control del tratamiento de TM,  $FB_1$  10  $\mu M$  y TM 5  $\mu g/mL$  con exposición a luz continua a los tiempos indicados. A y B) Patrones electroforéticos, C y D) Inmuno réplicas E) Gráfica del análisis densitométrico expresado en % del control de cada tratamiento con DS. Se muestran las fotografías representativas de dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno. h: horas de exposición. Análisis densitométrico: ImageJ 1.49e. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con comparación de medias. \* $P=0.0328$ .

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1. Caracterización fenotípica del efecto del tratamiento con TM de plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre.

La vía de MCP inducida por estrés de RE fue reportada recientemente en *A. thaliana* y algunos de sus transductores ya han sido identificados (Liu *et al.* 2007a; Iwata *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2013). Estos hallazgos fueron reportados inicialmente en raíces de *A. thaliana*, sin embargo en nuestro laboratorio hemos optado por la porción aérea de *A. thaliana* como sistema de estudio porque los efectos de la MCP inducida por acumulación de BCL los hemos caracterizado en la parte aérea (Saucedo-García *et al.* 2011). En el registro del fenotipo se observó que la MCP inducida por estrés de RE puede ser estudiada también en la porción aérea de plántulas de tres semanas de edad, ya que las plántulas de *Arabidopsis* presentaron un fenotipo de MCP tras la aspersion de TM. Por otro lado, este experimento nos permitió determinar que la concentración de TM 5 µg/mL era apropiada para su aplicación en la porción aérea de las plántulas, ya que las lesiones en el fenotipo fueron observables hasta los 4 días post-aplicación, así como la ausencia de lesiones transcurridas 24 h de tratamiento.

En la literatura, la MCP inducida por TM fue reportada y caracterizada por primera vez en el 2006 en raíces de *Arabidopsis* (Watanabe y Lam 2008), describiéndose la fragmentación de DNA, acumulación de ERO y disminución de la actividad de esterasas como eventos de la MCP inducida por TM. En el mismo reporte, el efecto de la TM en el fenotipo de la porción aérea de *Arabidopsis* únicamente fue descrito como clorosis en plántulas de 8 días de edad cultivadas en medio líquido y tratadas con TM 0.5 µg/mL por 3 días.

Comparando la temporalidad de la aparición de las lesiones en el reporte anterior con el registro fenotípico de nuestro sistema de plántulas, pudimos observar que la concentración necesaria para observar un efecto fenotípico con magnitud similar fue diez veces mayor en nuestro sistema, por lo que es posible que dichas variaciones se deban a la edad de las plántulas, sugiriendo que plántulas más jóvenes podrían ser más susceptibles a la TM. Considerando que las plántulas en desarrollo llevan a cabo una síntesis de proteínas más activa que puede implicar glicosilaciones, la inhibición de la glicosilación del extremo N-terminal de las proteínas por la TM podría ser la razón por la que las plántulas más jóvenes sean más susceptibles y por lo tanto requieran una menor concentración de TM para desarrollar signos de MCP por estrés de RE.

Con base en las observaciones anteriores, la aplicación de TM en la porción aérea de *Arabidopsis* representa un buen sistema para el estudio de la MCP por estrés de RE.

### **10.2. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo y en la ultraestructura de plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre.**

Las vías de señalización que llevan a la MCP en plantas están aún poco entendidas y estudiadas, sin embargo se han identificado algunos elementos esenciales para la ejecución de la MCP. La enzima  $\gamma$ VPE es una proteasa con actividad tipo caspasa-1 que se activa auto-escindiendo su N-terminal en condiciones de pH 5.5 en la vacuola. Este evento, relacionado con la ruptura del tonoplasto, lleva a la célula a la MCP denominada de tipo vacuolar (Hatsugai *et al.* 2004).

Por otro lado, la MCP mediada por BCL (tratamiento con FB<sub>1</sub>) se ha relacionado como parte de una respuesta de defensa contra patógenos avirulentos (Peer *et al.* 2010), mientras que la MCP que se presenta en el estrés de RE (tratamiento con TM) es una medida para contener con el estrés de RE que se desencadena tras la acumulación de proteínas desplegadas en el lumen del RE. Sin embargo, aunque la vía de MCP mediada por BCL, así como la inducida por estrés de RE se desarrollan en contextos diferentes, ambas vías requieren de la activación de  $\gamma$ VPE para ejecutar la muerte celular (Hatsugai *et al.* 2004; Kuroyanagi *et al.* 2005; Qiang *et al.* 2012), sugiriendo que por lo menos podría haber un evento de señalización común entre ambas vías que incluyera la activación de la enzima  $\gamma$ VPE y el curso de la muerte celular.

Integrando las observaciones tanto a nivel fenotípico, como a nivel de ultraestructura logramos observar para ambas vías de MCP, que aunque los signos de clorosis fueron visibles hasta los 4 días post-inducción, a nivel de ultraestructura el progreso de la muerte celular ya era significativo desde los 2 días post-inducción.

A nivel ultraestructural, las plántulas de genotipo silvestre expuestas a FB<sub>1</sub> mostraron alteraciones relevantes en la morfología de los cloroplastos y exhibieron daño considerable en la membrana tilacoidal; estas observaciones fueron consistentes con las reportadas por Saucedo-García *et al.* (2011); en donde se reportaron cloroplastos redondeados e internalizados a los 3 días post-inducción. Adicionalmente, observaciones previas en la

ultraestructura de células de la línea mutante *pfl1 18-18* expuestas a FB<sub>1</sub> mostraron una notable resistencia al tratamiento con FB<sub>1</sub> (Tapia de Aquino 2012). En conjunto, éstas observaciones, así como la presencia de clorosis a nivel de fenotipo son relevantes ya que éstos signos están relacionados con la producción de ERO por los fotosistemas y la degradación de la clorofila en el cloroplasto (Abbas *et al.* 1992; So-Yon *et al.* 2007; Zurbriggen *et al.* 2009; Mur *et al.* 2010) y revelan la importancia de las ERO en el desarrollo de la muerte celular.

En el caso del efecto de la TM en el fenotipo, la clorosis que se presentó en las plántulas fue más pronunciada que la que se observó en las plántulas con el tratamiento de FB<sub>1</sub> desde los 4 días. A nivel de ultraestructura, el daño en la morfología de la célula también fue mayor con TM que con FB<sub>1</sub>. Sin embargo, los cambios en la morfología de los cloroplastos resultó sumamente peculiar, ya que los cloroplastos no solo se observaron redondeados e internalizados, sino que presentaron agregación y abundante formación de vesículas en su interior. Por una parte, esta agregación de los cloroplastos evidencia la pérdida de la integridad del tonoplasto, ya que la vacuola es el organelo que ejerce la presión de turgencia en el interior de la célula, propiedad que en condiciones normales, ocasiona que los cloroplastos se encuentren adyacentes a la membrana plasmática y la pared celular. No obstante, la abundante formación de vesículas en presencia de TM es un fenómeno no reportado. Finalmente, a diferencia de las células tratadas con FB<sub>1</sub>, las células en presencia de TM presentaron hinchamiento del lumen del RE, suceso que coincide con lo observado en raíces de *Arabidopsis* en estado de estrés de RE previamente reportado (Qiang *et al.* 2012). Adicionalmente, en este reporte, se incluyó una mutante, *dad1*, deficiente en una subunidad de la transferasa de oligosacárido DAD1 del complejo OST que realiza la glicosilación del extremo N-terminal (Kelleher y Gilmore, 2006). Esta mutante mostró hipersensibilidad al tratamiento con TM, presentando hinchamiento exacerbado del lumen del RE en comparación con las raíces wt en presencia de TM. Esto podría ser explicado por una acumulación excesiva de proteínas desplegadas en el lumen del RE de la mutante. En el caso de la FB<sub>1</sub>, aparentemente la acumulación de las BCL no promueve un hinchamiento en el RE.

Con base en estas observaciones, podemos concluir que a nivel fenotípico, en la porción aérea de *Arabidopsis*, la MCP inducida por estrés de RE, así como la MCP mediada por BCL presenta lesiones con las mismas características, sin embargo su magnitud es mayor en la MCP inducida por estrés de RE, evidenciando la importancia del aumento en la síntesis y plegamiento de proteínas en el RE en comparación con el incremento en la síntesis de esfingolípidos en las plántulas de *Arabidopsis*, el cual aparentemente no tiene impacto en la

morfología del RE. Adicionalmente, el análisis de la ultraestructura de las células en presencia de TM, nos permitió observar efectos no reportados en la morfología de los cloroplastos, dando lugar a nuevas interrogantes entre la síntesis de proteínas en el RE y el desarrollo y funcionamiento del cloroplasto.

### **10.3. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en el desarrollo de las raíces de plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre.**

La MCP inducida por estrés de RE en raíces de *Arabidopsis* fue publicada en 2008 (Watanabe y Lam). En este trabajo se demostró que la TM induce MCP por estrés de RE en las raíces de *Arabidopsis*, observándose como inhibición del crecimiento de las raíces principal y secundarias y disminución en la cantidad de pelos radiculares a nivel de fenotipo. Tras realizar los experimentos equivalentes a los publicados por Watanabe y Lam (2008) en esta tesis, se observaron resultados consistentes con los reportados. Con base en lo anterior podemos afirmar que nuestro sistema de experimentación, así como el método de aplicación de TM y FB<sub>1</sub>, es adecuado para el estudio y la comparación de ambos modelos de MCP, aun cuando el medio de cultivo y la aplicación del tratamiento de TM difieran en nuestro sistema de *Arabidopsis*.

Sabiendo que la TM induce una MCP inducida por estrés de RE en las raíces de *Arabidopsis* que se manifiesta como inhibición del desarrollo de las raíces, se realizaron los experimentos equivalentes con FB<sub>1</sub>. Al comparar el efecto de la MCP inducida por estrés de RE con la MCP mediada por BCL en este sistema de raíces de *Arabidopsis*, se observó que la MCP mediada por BCL también inhibió el desarrollo de las raíces de *Arabidopsis*, no obstante, el efecto fue diferente, ya que no se observó inhibición del desarrollo de la raíz principal, únicamente se observó una disminución en la cantidad y la longitud de las raíces secundarias y pelos radiculares. Lo anterior es consistente con las observaciones relacionadas con la menor magnitud de las lesiones tanto a nivel fenotípico como a nivel de ultraestructura de la MCP mediada por BCL en comparación con la inducida por estrés de RE.

En la literatura existen algunos reportes en los que se describen algunos de los efectos de la FB<sub>1</sub> en plantas. En embriones de maíz (*Zea mays* L.), el efecto de la FB<sub>1</sub> en la elongación de las raíces se manifestó como una inhibición del 50% de la elongación a 40 µM de FB<sub>1</sub>, atribuyéndose a una inhibición incompetitiva de la toxina sobre la ATPasa de H<sup>+</sup> de la

membrana plasmática, sobre la cual se reportó una inhibición de la actividad del 15% con FB<sub>1</sub> 10 μM y del 30% con FB<sub>1</sub> 40 μM (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005). La ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática es una enzima fundamental para la elongación celular, ya que el transporte de protones hacia el apoplasto es necesario para la relajación de la pared celular y la elongación de las células vegetales. En relación con nuestras observaciones en nuestro sistema de raíces de *Arabidopsis*, la máxima concentración de FB<sub>1</sub> empleada fue de 6 μM y no se observó inhibición en el crecimiento de la raíz principal, por lo que es probable que la concentración de FB<sub>1</sub> fuera insuficiente para que la inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> tuviera un efecto en la elongación de las raíces principales de las plántulas de *Arabidopsis*.

Por otro lado, un reporte publicado recientemente demostró en raíces de *Arabidopsis* que la inhibición de las ceramidas sintasas (esfinganina *N*-acetiltransferasas) tiene efecto en la formación de raíces secundarias de *Arabidopsis* (Markham *et al.* 2011). En este reporte, se estudiaron los genes *LOH1* (*At3g25540*) y *LOH3* (*At1g13580*) de *Arabidopsis* que codifican para dos ceramidas sintasas con afinidad hacia ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, C>18), cuya mutación (líneas *loh1-1*, *loh3-1*) o su inhibición con FB<sub>1</sub> a concentraciones de 0.1 a 1 μM (germinación en presencia de FB<sub>1</sub> por 9 días, o FB<sub>1</sub> 2.5 μM por 16 h) interfiere con la formación de los gradientes de auxinas responsables de la formación de raíces secundarias. La disminución de VLCFA en las mutantes o por el tratamiento de FB<sub>1</sub>, la disminución en el transporte de auxinas, así como la formación de agregados de las proteínas transportadoras de auxinas AUX1 y PIN1 en endosomas tardíos de la red del trans Golgi fueron propuestos como causa de la inhibición de la formación de raíces secundarias. Sin embargo, en este trabajo se presentaron experimentos en los que se probó que la concentración de FB<sub>1</sub> empleada no afectaba la viabilidad de las células, descartando a la MCP como el efecto responsable de la inhibición de la formación de raíces secundarias. Con base en lo anterior y en relación a nuestro sistema de tratamiento de raíces de *Arabidopsis*, es probable que el efecto en la disminución de las raíces secundarias y de pelos radiculares que se observó en nuestro sistema sí sea atribuido a la inducción de la MCP por acumulación de BCL inducida por la concentración (más alta) de FB<sub>1</sub> empleada; sin embargo, experimentos que demuestren la inducción de la MCP en estas condiciones son necesarios para descartar la inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> y la inhibición del transporte de auxinas como las causas de la inhibición del desarrollo de las raíces secundarias de *Arabidopsis*. Evidencias obtenidas a través de metodologías como la reacción de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) para la determinación de la fragmentación del DNA, o el flujo de electrolitos como evidencia de muerte

celular, así como la tinción con DAB para la observación de la formación de ERO serían apropiadas para tal objetivo.

#### **10.4. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo y en la ultraestructura de plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1*.**

La línea mutante de *Arabidopsis lcb2a-1* (SALK\_061472) es una mutante con un T-DNA de inserción en el gen *LCB2a* (*At5g23680*) que codifica para la subunidad LCB2a de la SPT, la primera enzima en la biosíntesis de esfingolípidos. La enzima SPT se compone de una subunidad LCB1 (*At4g36480*) y una subunidad LCB2; la cual puede ser la versión LCB2a o la LCB2b (*At3g48780*), que son funcionalmente redundantes (Dietrich *et al.* 2008).

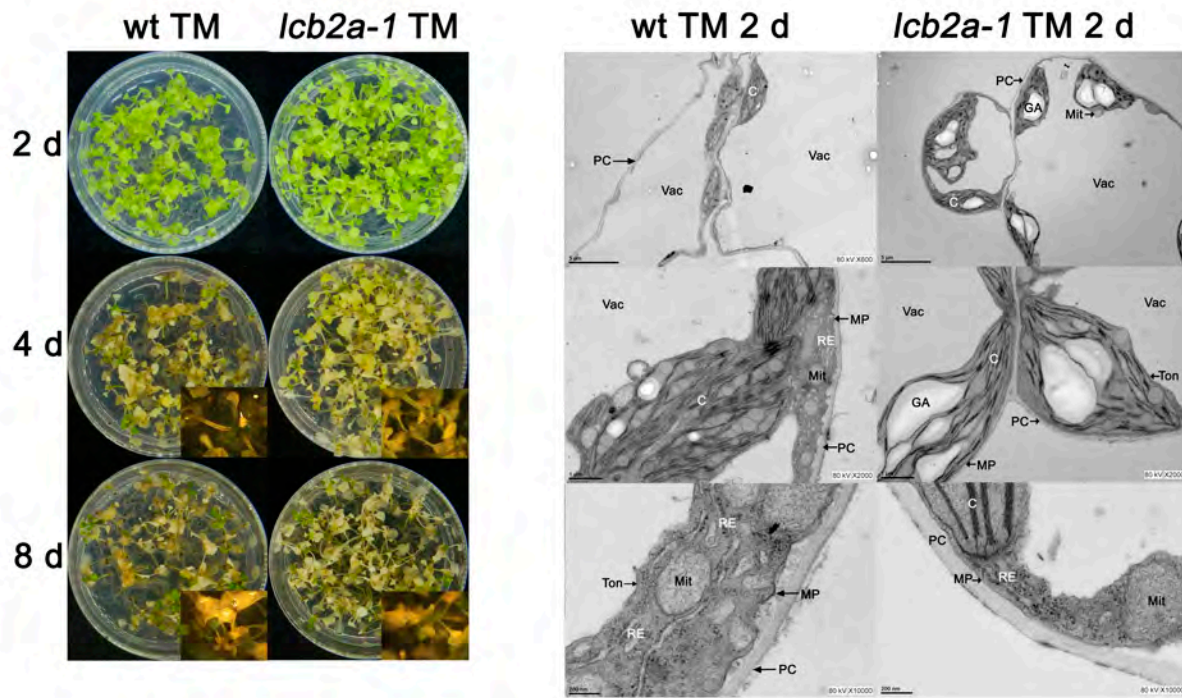
Saucedo-García *et al.* (2011) demostraron que la acumulación de BCL, en particular la esfinganina (d18:0) inducen la MCP, ya que la mutante *lcb2a-1* presentó un fenotipo de resistencia al tratamiento con FB<sub>1</sub>, que se observó como la aparición de signos menores de clorosis a nivel de fenotipo que las plántulas del genotipo silvestre. La resistencia de esta mutante se relacionó con una menor acumulación de BCL, en particular de esfinganina (d18:0) en presencia de FB<sub>1</sub>, así como una reacción negativa de TUNEL y una menor alteración en la morfología de los cloroplastos en comparación con las plántulas del genotipo silvestre. En relación a nuestros experimentos, nuestras observaciones corresponden a lo reportado, ya que las plántulas de la línea mutante *lcb2a-1* sí presentaron resistencia a la exposición a FB<sub>1</sub>, tanto a nivel de fenotipo, como de ultraestructura. Para saber si las BCL actuaban como segundos mensajeros en la MCP inducida por estrés de RE, se trataron plántulas de la línea *lcb2a-1* esperando que las plántulas presentaran un fenotipo de resistencia al tratamiento con TM similar al de la FB<sub>1</sub>.

Comparando únicamente el efecto en el fenotipo y la ultraestructura de las células de las plántulas del genotipo silvestre tratadas con TM con los mismos parámetros en las plántulas de la línea *lcb2a-1* tratadas con TM (Figura 11), encontramos que a nivel de fenotipo, las plántulas de la línea *lcb2a-1* presentaron una clorosis ligeramente menos severa que las plántulas de la línea silvestre, así como mayor turgencia en las hojas desde los 4 días post-inducción, sin embargo, al comparar el efecto de la TM en la ultraestructura de las células del genotipo silvestre contra las de la línea mutante *lcb2a-1* observamos que las células de la línea mutante *lcb2a-1* presentaron menos alteraciones celulares: más cloroplastos, con una forma redondeada en comparación con la forma alargada típica de las células silvestres, sugiriendo que el tonoplasto aún se encontraba íntegro a los 2 días de tratamiento con TM. Los cloroplastos de las células de la línea *lcb2a-1* no estaban agregados y aunque presentaban



alteraciones en su morfología general, las membranas tilacoidales presentaban menos alteraciones que las membranas tilacoidales de los cloroplastos de las células silvestres tratadas con TM. Finalmente, el RE presentó hinchamiento tanto en las células del genotipo silvestre como en las de la línea mutante *lcb2a-1* tratadas con TM, evidenciando el estado de estrés de RE en las células.

□



**Figura 11. Comparación del efecto de la TM en el fenotipo y la ultraestructura de las plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre y la línea mutante *lcb2a-1*.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de las líneas wt y *lcb2a-1* de tres semanas de edad con TM 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con exposición a luz continua durante los tiempos especificados. Se presentan el registro fotográfico del fenotipo y las micrografías representativas de tres a cuatro diferentes campos para cada magnificación y preparación. C: cloroplasto, d: días, Mit: mitocondria, PC: pared celular, RE: retículo endoplásmico Ton: tonoplasto y Vac: vacuola,

Con base en los resultados anteriores, podemos afirmar que las plántulas de la línea *lcb2a-1* presentaron a nivel de fenotipo y ultraestructura indicios de resistencia a los 2 días de exposición a TM, sin embargo, transcurridos 4 días de exposición, las plántulas presentaron clorosis como signo de muerte celular, es decir, es probable que las BCL sí sean importantes para la vía de señalización de MCP por estrés de RE, pero que para que las BCL entren en juego se requiere un estado de estrés de RE más prolongado y severo, activando así otros eventos o vías de transducción de señales que aseguren la MCP de las células afectadas.

Por otro lado, ensayos que comprueben la funcionalidad de los cloroplastos como eficiencia de la fotosíntesis, así como ensayos que determinen la viabilidad de las células de la línea *lcb2a-1* o que descarten la MCP de las células en presencia de TM son necesarios para demostrar la resistencia de la mutante *lcb2a-1* al tratamiento con TM.

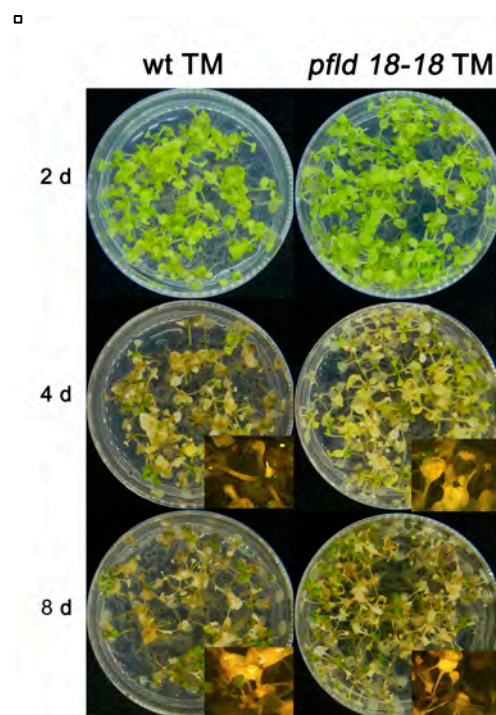
### **10.5. Comparación del efecto del tratamiento con TM y FB<sub>1</sub> en el fenotipo de plántulas de *A. thaliana* de la línea *pflid 18-18*.**

La línea de *Arabidopsis pflid 18-18* es una línea transgénica que expresa a la proteína bacteriana acarreadora de electrones flavodoxina (Fid) en el cloroplasto, y que en condiciones de estrés restaura la homeostasis redox, interactuando productivamente con rutas dependientes de Fdx como la transferencia de electrones directa a la ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR) para la fotoreducción del NADP<sup>+</sup>, o activando reductivamente enzimas mediante la tioredoxina (Trx) vía la Fdx–Trx reductasa (FTR) (Tognetti *et al.* 2006). Como consecuencia, la expresión de Fid en plantas evita la formación de ERO en el cloroplasto que se generan espontáneamente durante el proceso fotosintético. Lo anterior resulta en un fenotipo de tolerancia al estrés oxidativo, ambiental (sequia, altas intensidades de luz, calor, bajas temperaturas, radiación UV) y por deficiencia de Fe (Tognetti *et al.* 2006; Zurbriggen *et al.* 2007).

Las ERO que se producen en el cloroplasto son moléculas importantes en la vía de transducción de señales de la MCP mediada por BCL, ya que la línea de *Arabidopsis pflid 18-18*, presenta un fenotipo de resistencia al tratamiento con FB<sub>1</sub> a nivel de fenotipo y de ultraestructura (Tapia de Aquino 2012). Para saber si las ERO del cloroplasto eran importantes también para la vía de MCP inducida por estrés de RE, se trataron plántulas de la línea *pflid18-18* con TM con el objetivo de determinar a través del fenotipo, si las plántulas presentaban resistencia al tratamiento con TM.

Al comparar el efecto de la TM en el fenotipo de las plántulas del genotipo silvestre con el de las plántulas de la línea *pflid 18-18* (Figura 12) encontramos que las plántulas de la línea *pflid 18-18* presentaron signos de clorosis menos severos, así como una mayor turgencia en las hojas respecto a las plántulas del genotipo silvestre tras 4 días de exposición a TM y luz continua. Sin embargo transcurridos 8 días de exposición a TM, ambas líneas mostraban signos de clorosis y muerte celular muy severos. Las observaciones anteriores son insuficientes para determinar si la línea *pflid 18-18* presenta fenotipo de resistencia, por lo que es necesario

realizar los experimentos de análisis ultraestructural, así como ensayos de viabilidad de las células y eficiencia de la fotosíntesis en las plántulas de esta línea en presencia de TM.



**Figura 12. Comparación del efecto de la TM en el fenotipo de plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre y la línea *pflid 18-18*.** Se trataron plántulas de *A. thaliana* de las líneas wt y *pflid 18-18* de tres semanas de edad con TM 5 µg/mL con exposición a luz continua durante los tiempos especificados. Se presentan el registro fotográfico del fenotipo a los tiempos indicados.

Si bien la línea *pflid18-18* no mostró resistencia al tratamiento con TM a nivel de fenotipo, la formación y acumulación de ERO ya ha sido reportada como un evento importante durante el proceso de MCP inducido por estrés de RE (Watanabe y Lam 2008).

Por otro lado, el registro del fenotipo de las plántulas como resultado de una mutación es muy útil para determinar a grandes rasgos la importancia de la mutación en cuestión para la fisiología de las plantas. En algunos casos, la deficiencia de alguna biomolécula tiene efectos radicales en la viabilidad de la planta, sin embargo, los seres vivos en general han desarrollado mecanismos para que haya funciones redundantes que permitan la supervivencia del organismo aún en condiciones desfavorables. Otra estrategia es que las respuestas que se requieren ante cierto estímulo sean ejecutadas aún en ausencia de ciertos elementos de la vía. En relación a la mutante *pflid18-18* tratada con TM, las plántulas producen menos ERO en el

cloroplasto, sin embargo en las células vegetales, existen otros sitios que dan lugar a la formación de ERO, por lo que es posible que estas ERO permitan la transducción de señales o en su caso el estrés oxidante necesario que permita que la vía de MCP inducida por estrés de RE sea ejecutada aún en ausencia de las ERO que se forman en el cloroplasto. Algunos sitios que dan lugar a la formación de ERO son la mitocondria, así como los peroxisomas, que contienen las enzimas de la vía de oxidación de los ácidos grasos; adicionalmente, las ERO también pueden ser productos de enzimas como la NADPH oxidasa de la membrana plasmática o la xantina oxidasa, entre otras (Smirnov 2005).

#### **10.6. Determinación de la expresión de la proteína de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.**

La proteína de unión (BiP) es una proteína chaperona presente en el lumen del RE y miembro de la familia HSP70. *At-BiP3* es el principal gen de BiP, ya que su expresión es muy altamente inducida en términos del número de veces de incremento por exposición a TM y DTT en plántulas (Martínez y Chrispeels 2003; Liu *et al.* 2007; Iwata *et al.* 2008) o por condiciones de estrés abiótico (Iwata y Koizumi 2005; Tajima y Koizumi 2006; Liu y Howell 2010).

Algunos reportes han demostrado que la función de BiP es fundamental para la señalización del estrés de RE. En *Nicotiana tabacum* (tabaco), la sobreexpresión de BiP resultó en plantas resistentes a la inhibición de la germinación por TM y al estrés por sequía (Alvim *et al.* 2001). Así mismo, su sobreexpresión en plantas *Glycine max* (soya) resultó en plantas resistentes a sequía y estrés osmótico (Valente *et al.* 2009). Por el contrario, mutantes con pérdida de función de *BiP2* fueron deficientes en la secreción de proteínas PR1 (proteínas relacionadas a patógenos) en la respuesta a ácido salicílico y resultaron más susceptibles a la infección por *Pseudomonas syringae* (Wang *et al.*, 2005), evidenciando así el papel de BiP como factor limitante en el plegamiento de proteínas de secreción en condiciones de estrés de RE. Finalmente, Srivastava *et al.* (2013) demostraron que la proteína BiP es el principal regulador de la proteína bZIP28, uno de los factores de transcripción más importantes que activa la transcripción de los genes de la respuesta UPR. bZIP28 en condiciones normales se encuentra en la membrana del RE, sin embargo, se transloca al núcleo en respuesta a la acumulación de péptidos desplegados en el RE. En este reporte, se demostró que BiP se une al C-terminal de bZIP28 reteniendo a la proteína en el RE, sin embargo en condiciones de estrés de RE, BiP se disocia de bZIP28 permitiendo su translocación al Golgi y posteriormente al núcleo.

En la literatura, el estudio de la MCP inducida por estrés de RE en plantas (principalmente en *Arabidopsis*) ha sido estudiado mediante la aplicación de agentes como el DTT y la TM, que se consideran como un tratamiento de control positivo de estrés de RE debido a que ocasiona la acumulación de péptidos desplegados en el RE mediante la inhibición de la glicosilación del extremo N-terminal de las proteínas en traducción y que se realiza en el RE; el blanco de la TM es la enzima UDP-*N*-acetilglucosamina: dolicol fosfato *N*-acetil glucosamina-1-P transferasa (Pattison y Amtmann 2009). La evaluación del estrés de RE se ha realizado mediante la determinación de la transcripción de los genes de las proteínas de la vía de transducción de señales de estrés de RE, considerando la inducción de la expresión de ciertos genes como marcadores o indicadores de un estado positivo de estrés de RE en las células, genes tales como *bZIP17*, *bZIP28*, *bZIP60*, *IRE1a* e *IRE1b*, *Bi-1*, así como los genes marcadores de la respuesta UPR como *sPDI* (disulfuro isomerasa), *BiP3*, *CNX2* (calnexina), *CRT* (calreticulina), *CAM* (calmodulina) y *SKP1* (componente de SCF (for SKP1-Cullin-F box protein) del complejo ubiquitina ligasa que ubiquitina las proteínas para su degradación (Watanabe y Lam 2008; Deng *et al.* 2011; Qiang *et al.* 2011; Ye *et al.* 2011).

En el presente trabajo se determinó la expresión de BiP como marcador de estrés de RE mediante inmunodetección en Western blot de la proteína en la fracción soluble de plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre y de las líneas mutantes *lcb2a-1* y *pfl18-18* tratadas con FB<sub>1</sub> y TM y se comparó respecto a sus tratamientos control. Se utilizaron anticuerpos homólogos policlonales anti BiP disponibles comercialmente (Agrisera AB: AS09 481).

Los resultados de los experimentos de la determinación de BiP en las plántulas del genotipo silvestre indicaron que la expresión de la proteína BiP se incrementaba en las plántulas silvestres tratadas con TM, concordando con lo reportado en la literatura y que permitió validar el tratamiento con TM en nuestro sistema de plántulas como tratamiento-control positivo de estrés de RE. Con base en lo anterior, se realizó la comparación del perfil de expresión de BiP tras el tratamiento con TM con el perfil de expresión de BiP tras el tratamiento con FB<sub>1</sub>. Las réplicas de los experimentos independientes fueron tratadas estadísticamente (ANOVA de dos vías con comparación de medias). Los resultados obtenidos sugieren que la vía de MCP mediada por la acumulación de BCL podría incluir un estrés de RE durante las primeras 8 h de inducción de la acumulación de BCL, por lo que este evento podría ser relevante para la señalización temprana de la MCP mediada por BCL, sin embargo no es necesario para su ejecución final. Es posible que un ensayo más sensible que permita determinar diferencias más sutiles en los niveles de expresión de BiP, como la determinación

de la expresión a nivel de mRNA de BiP (u otros marcadores como bZIP60) durante las primeras 8 h de inducción de acumulación de BCL podría resolver esta hipótesis. Por otro lado, la cuantificación de BCL libres, en particular la de esfinganina (d18:0), cuyo aumento se ha relacionado con la MCP mediada por BCL (Saucedo-García *et al.* 2011) en las plántulas bajo estrés de RE mediante cromatografía de líquidos (HPLC ESI-MS / MS, Markham & Jaworski, 2007) daría una evidencia contundente para determinar si ambas vías de MCP, tanto la inducida por estrés de RE como la mediada por BCL, están relacionadas entre sí y si ambos procesos, tanto la acumulación de BCL, como la acumulación de proteínas no plegadas, ocurren simultáneamente en el RE, llevando a las células a la MCP.

La determinación de la expresión de BiP a nivel de cantidad de proteína en conjunto con el análisis ultraestructural y el registro del fenotipo en plántulas del genotipo silvestre nos permitieron analizar la temporalidad en la que se manifiestan los signos de MCP inducida por estrés de RE. A nivel de expresión de BiP pudimos observar que el estrés de RE inducido por TM activó la respuesta UPR y ésta se manifestó a las 24 h de exposición, incrementando la cantidad de BiP en un 60% aproximadamente. Simultáneamente, a nivel de ultraestructura, los cambios en la morfología de los cloroplastos progresaron dentro de las primeras 48 h, presentando a este tiempo cambios drásticos en su morfología y adicionalmente se encontró la ruptura del tonoplasto, indicando que el progreso de la MCP que sucede a nivel celular ya es irreversible aun cuando la ausencia de clorosis no revele el progreso de la muerte en el nivel de fenotipo, lo cual se presentó como inhibición del desarrollo de las raíces a los 3 días y la aparición de clorosis en la porción aérea a los 4 días.

#### **10.7. Determinación de la expresión de la proteína de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* de la línea *lcb2a-1* expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.**

Con el objetivo de verificar el efecto de la TM en el fenotipo y la ultraestructura de las plántulas de las líneas *lcb2a-1* y determinar si las BCL actuaban como segundos mensajeros de la MCP inducidas por estrés de RE, se realizó la determinación de la expresión de BiP como marcador de estrés de RE en esta línea.

Se encontró que en las plántulas del genotipo silvestre la TM indujo un incremento de la expresión de BiP del 60% a las 24 h, mientras que en la línea *lcb2a-1*, éste incremento fue de sólo 35% a este tiempo de exposición. Estas observaciones podrían indicar que la acumulación

de BCL sí puede ser un elemento en la transducción de señales de la MCP inducida por estrés de RE, al menos en las primeras horas de la inducción de estrés de RE, ya que la reducida síntesis de BCL que caracteriza a la mutante *lcb2a-1* (Saucedo-García *et al.* 2011) puede ser responsable de la menor inducción de la expresión de BiP mostrada por esta mutante tras 24 h de exposición a TM. Lo anterior podría relacionarse con las observaciones del análisis ultraestructural de la línea *lcb2a-1*, que mostraron que éstas células presentaban menos alteraciones en la morfología tras el tratamiento con TM que las células silvestres, ya que al producirse menos BCL en la mutante *lcb2a-1*, es posible que la transducción del estrés de RE hacia la MCP fuera deficiente, ocasionando una menor inducción en la expresión de BiP, manifestada como una menor alteración en la morfología de las células y un fenotipo de resistencia a la TM durante las primeras 24 h de exposición a TM. Sin embargo, a tiempos posteriores, la transducción de la MCP podría involucrar otros eventos de señalización distintos a las BCL que aseguren la ejecución de la MCP.

Es decir, la acumulación de BCL podría ser un elemento necesario para la transducción de la señal de estrés de RE y la inducción de la expresión de BiP, evidenciando un papel señalizador de las BCL como segundos mensajeros de la MCP.

#### **10.8. Determinación de la expresión de la proteína de unión como marcador de estrés de RE en plántulas de *A. thaliana* de la línea *pflid18-18* expuestas a TM y FB<sub>1</sub>.**

La acumulación de ERO es un evento de señalización que es ubicuo ante los diferentes tipos de estrés que llevan a la MCP. La acumulación de ERO se ha observado en la MCP inducida por patógenos bacterianos como *Pseudomonas syringae* (Peer *et al.* 2011), sequía (Duan *et al.* 2010), FB<sub>1</sub> (Stone *et al.* 2000) y TM (Qiang *et al.* 2012). Adicionalmente, se ha observado que plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Arabidopsis* que expresan flavodoxina en los cloroplastos y producen menos ERO, son resistentes a algunos de estos tipos de estrés, indicando que la producción de ERO es una señal necesaria para la transducción y la manifestación de la MCP.

Con el objetivo de verificar el efecto de la TM en el fenotipo de las plántulas de la línea *pflid18-18* y determinar si las ERO del cloroplasto eran moléculas necesarias para la transducción de la señal de MCP inducida por estrés de RE, se realizó la determinación de la expresión de BiP como marcador de estrés de RE. Con base en el análisis densitométrico y estadístico y comparando la inducción de la expresión de BiP por el tratamiento con TM en las

plántulas del genotipo silvestre a las 24 h (60 %) respecto a la línea mutante *pfl18-18* (40 %), se observó que en la línea mutante la expresión de BiP fue menor que en las plántulas de genotipo silvestre, lo cual sugirió que las ERO son necesarias para la transducción de la señal de estrés de RE y la respuesta UPR. Por otro lado, considerando que la ERO son moléculas oxidantes, la menor producción de ERO por la mutante *pfl18-18* (Tapia de Aquino 2012) podría ocasionar una menor acumulación de proteínas no plegadas en el RE, produciendo un estado de estrés de RE menos severo y por lo tanto una menor expresión de BiP en la mutante *pfl18-18*.

### **10.9. Señalización de la muerte celular programada en *Arabidopsis thaliana*.**

La MCP en plantas es una respuesta frente a varios tipos de estrés ambiental o que puede ser un mecanismo de infección o de defensa contra algunos microorganismos patógenos y simbioses. En estas condiciones, se han identificado algunos eventos moleculares como eventos de señalización de estas vías de MCP consideradas diferentes entre sí, sin embargo, ya que algunos de estos eventos de señalización relacionados con la MCP resultan comunes entre las diferentes vías de MCP descritas en la literatura es posible que en realidad comprendan una vía general de MCP que puede ser inducida por diversos estímulos

Referente a lo anterior, la activación de la enzima de procesamiento vacular  $\gamma$ VPE y la ruptura del tonoplasto son eventos fundamentales que llevan a la degradación de los componentes celulares y la ejecución de la muerte celular (van Doorn, 2011). Se ha reportado que tanto la MCP inducida por estrés de RE, como la vía de muerte mediada por BCL son dependientes de la activación de  $\gamma$ VPE, ya que mutantes de *A. thaliana* nulas en la expresión de esta enzima son resistentes a la MCP inducida por BCL (Kuroyanagi *et al.* 2005) y estrés de RE (Qiang *et al.* 2012). Adicionalmente, la activación de  $\gamma$ VPE mediada por MPK6 ha sido reportada recientemente (Li *et al.* 2012), lo que resulta relevante, ya que la activación de la cinasa MPK6 es otro evento de señalización de la vía de muerte mediada por BCL (Saucedo-García *et al.* 2011) y otras respuestas a estrés biótico en las plantas que finalizan en MCP (Romeis *et al.* 1999, 2001; Zhang y Klessig 2001). Las evidencias anteriores, indican que, aun cuando la inducción de MCP difiera dependiendo de las señales de estrés, posiblemente la MCP en plantas sea una vía general de MCP que esté unificada y que converge en la ruptura del tonoplasto, de manera análoga a lo que sucede en la vía intrínseca (mitocondrial) de la apoptosis en mamíferos, en la que la salida del citocromo c de la mitocondria es el evento culminante hacia la MCP.



## 11. RESÚMEN DE RESULTADOS

- Las plántulas del genotipo silvestre presentaron lesiones de muerte más severas y más tempranamente con el tratamiento con TM que con el tratamiento de FB<sub>1</sub>, tanto a nivel de fenotipo como de ultraestructura.
- Las plántulas del genotipo silvestre expuestas a TM presentaron inhibición en el desarrollo de la raíz principal, las raíces secundarias y pelos radiculares.
- Las plántulas expuestas a FB<sub>1</sub> presentaron inhibición menos severa que con TM y solo en el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares.
- Las plántulas del genotipo silvestre expuestas a TM presentaron un incremento de 1.5 veces en la expresión de la proteína BiP a las 24 y 48 h con respecto al tratamiento control.
- Los parámetros analizados con el tratamiento de TM en nuestro sistema de plántulas de *A. thaliana* coinciden con lo reportado en la literatura, lo cual valida que el tratamiento con TM pueda ser considerado como control positivo de estrés de RE y que nuestro sistema permite evaluar la comparación de la MCP inducida por FB<sub>1</sub> y por TM.
- Las plántulas del genotipo silvestre expuestas a FB<sub>1</sub> no presentaron incremento de expresión de la proteína BiP respecto al tratamiento control.
- Las plántulas de la línea *lcb2a-1* que producen menos BCL presentaron resistencia a la exposición a TM a nivel de fenotipo, ultraestructura y expresión de BiP respecto a las del genotipo silvestre.
- El resultado anterior sugiere que el estrés de RE puede estar involucrado en la MCP mediada por acumulación de BCL.
- Las plántulas de la línea *pfl18-18* que producen menos ERO en el cloroplasto presentaron resistencia al tratamiento con TM al observarse menor daño en el fenotipo y menor expresión de BiP respecto a las del genotipo silvestre.

## 12. CONCLUSIÓN

Con base en los parámetros analizados de estrés de RE encontramos que la acumulación de BCL fue incapaz de inducir estrés de RE, sin embargo se observaron indicios de que la acumulación de BCL es un elemento necesario para la vía de MCP mediada por estrés de RE.

### 13. PERSPECTIVAS

- Confirmar que la acumulación de BCL es innecesaria para la inducción de estrés de RE por exposición a FB1, determinando la expresión de otros marcadores de estrés de RE a nivel de transcrito en plántulas de genotipo silvestre tratadas con FB1.
- Confirmar la resistencia de las plántulas de la línea *lcb2a-1* a la exposición a TM, determinando parámetros característicos de MCP como la fragmentación de DNA genómico mediante la realización de ensayos de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) para confirmar que la menor producción de BCL está relacionada con un menor estrés de RE y la atenuación observada de MCP.
- Determinar si las BCL, en particular la esfinganina, (Saucedo-García et al. 2011) se produce en condiciones de estrés de RE, cuantificándolas mediante cromatografía de líquidos (HPLC ESI-MS / MS, Markham & Jaworski, 2007) en muestras de plántulas tratadas con TM, para verificar que la acumulación de BCL sucede cuando hay estrés de RE.
- Confirmar la resistencia de las plántulas de la línea *pfl1 18-18a* a la exposición a TM, realizando el análisis ultraestructural y el ensayo de TUNEL en plántulas expuestas a TM para verificar que la menor producción de ERO en el cloroplasto está relacionada con la atenuación de MCP y la menor presencia de daño en el fenotipo.

## 14. APÉNDICE

### **Solución amortiguadora de homogeneización.**

620 mM Sorbitol

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

15 mM Ácido ascórbico

3 mM EDTA

1mM KCl

0.8 % Polivinilpirrolidona

0.2 % BSA

Al momento de usar agregar al amortiguador de homogeneización.

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

Mezcla de inhibidores de proteasas en relación 115  $\mu$ L /5 mL de amortiguador

$\beta$ -mercaptoetanol en relación 4.9  $\mu$ L /5 mL de amortiguador

### **Mezcla de inhibidores de proteasas**

0.01 mM Quimiostatina

0.01 mM Leupeptina

0.1 mM Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF)

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

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

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

### **Solución amortiguadora de transferencia de proteínas**

15 mM amortiguador de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) pH 6.8

20 % Metanol

0.05 % SDS

### **Amortiguador TBS pH 9.5**

1 mM Trizma base

100 mM NaCl

5 mM  $\text{MgCl}_2$

### **Solución para desarrollar color en el ensayo de Western**

Agregar 100 mL de una mezcla 1:1 la solución de NBT con la solución de BCIP en 10 mL de amortiguador TBS al momento de usar.

**NBT:** 30 mg/ mL de NBT en dimetilformamida al 70%.

**BCIP:** 15 mg/mL BCIP en dimetilformamida concentrada.

## 15. REFERENCIAS

Abbas HK, Paul RN, Boyette CD, Duke S y Vesonder RF (1992) Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can J Bot.* 70: 1824-1833.

Agrios GN (1997) Plant Pathology 4a ed. *Academic Press*. San Diego, EUA.

Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC y Fontes EPB (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.* 126: 1042–1054.

Anderson JV, Li QB, Haskell DW y Guy CL (1994) Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.* 104: 1359–1370.

Axtell MJ, Staskawicz BJ (2003) Initiation of RPS2-specied disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell.* 112: 369–377.

Baumann O y Walz B (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 205: 149–214.

Becker C, Shutov AD, Nong VH, Senyuk VI, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen NC, Muntz K (1995) Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B, an asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Eur J Biochem.* 228: 456-462.

Bromley PE, Li YO, Murphy SM, Sumner CM y Lynch DV (2003) Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 417: 219–226.

Bryngelson JD, Onuchic JN, Socci ND y Wolynes PG (1995) Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* 21: 167–195.

Buchanan BB, Gruissem W y Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, Maryland

Cantrel C, Vazquez T, Puyaubert J, Reze N, Lesch M, Kaiser WM, Dutilleul C, Guillas I, Zachowski A, Baudouin E (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 189:415-427.

- Carter HE y Koob JL (1969) Sphingolipids in bean leaves (*Phaseolus vulgaris*). *J Lipid Res* 10: 363–369.
- Carter HE, Gigg RH, Law JH, Nakayama T y Weber E (1958) Biochemistry of the sphingolipides. Structure of phytoglycolipide. *J Biol Chem* 233: 1309–1314.
- Carter HE, Hendry RA, Nojima S y Stanacev NZ (1960) The isolation and structure of cerebrosides from wheat flour. *Biochim Biophys Acta*. 45: 402–404.
- Cerioti A, Duranti M y Bollini R (1998) Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *J Exp Bot*. 49: 1091–1103.
- Che P, Bussell JD, Zhou W, Estavillo GM, Pogson BJ, Smith SM (2010). Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in *Arabidopsis*. *Sci Signal*.
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM y Cahoon EB (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*. 12: 3576–3593.
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG y Cahoon EB (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 20: 1862–1878
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell*. 37: 299–310.
- Cohen GM (1997) Caspase: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 326: 1-16.
- Coleman CE, Lopes MA, Gillikin JW, Boston RS y Larkins BA (1995) A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant floury 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 6828–6831.
- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*. 423: 651-654.
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S (2005) *Arabidopsis* sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol*. 137: 724-737.

- Craig A, Ewan R, Mesmar J, Gudipati V y Sadanandom A (2009) E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J Exp Bot.* 60: 1123–1132.
- Crosti P, Malerba M y Bianchetti R (2001) Tunicamycin and brefeldin A induce in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. *Protoplasma.* 216: 31–38.
- De Brito OM y Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456: 605–610.
- De-Brito OM y Scorrano L (2010) An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J.* 29: 2715–2723.
- Deng Y, Humbert S, Liu JX, Srivastava R, Rothstein SJ, Howell SH (2011) Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 7247–52.
- Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM y Cahoon EB (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* 54: 284–298.
- Dixon DP, Van Lith M, Edwards R y Benham A (2003) Cloning and initial characterization of the *Arabidopsis thaliana* endoplasmic reticulum oxidoreductins. *Antioxid Redox Signal.* 5: 389–396.
- Dreher K, Callis J. (2007) Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot.* 99: 787–822.
- Duan Y, Wensheng Z, Bao L, Youning W, Kexue L, Sodmergen, Chunyu H, Yizhang Z y Xia L (2010) An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytologist.* 186: 681–695.
- Dutilleul C, Benhassaine-Kesri G, Demandre C, Reze N, Launay A, Pelletier S, Renou JP, Zachowski A, Baudouin E, Guillas I (2012) Phytosphingosine-phosphate is a signal for *AtMPK6* activation and *Arabidopsis* response to chilling. *New Phytol.* 194:181-191.
- Englander SW, Mayne L y Krishna MM (2007) Protein folding and misfolding: Mechanism and principles. *Q Rev Biophys.* 40: 287–326.
- Figueiredo JEF, Cascardo JCM, Carolino SMB, Alvim FC y Fontes EPB (1997) Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. *Plant Physiol.* 9: 103–110.

- Flynn GC, Chappell TG y Rothman JE (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*. 245: 385–390.
- Flynn GC, Pohl J, Flocco MT y Rothman JE (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*. 353: 726–730.
- Friedman JR y Voeltz GK (2011) The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends in Cell Biology*. 21: 709-717.
- Gable K, Han G, Monaghan E, Bacikova D, Natarajan M, Williams R, Dunn TM (2002) Mutations in the yeast *LCB1* and *LCB2* genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem*. 277: 10194–10200.
- Gao H, Brandizzi F, Benning C y Larkin RM (2008) A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 16398–16403.
- Gechev TS y Hille J (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol*. 168: 17–20.
- Gething MJ (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev. Biol*. 10: 465–472.
- González-Solis A (2009) La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la respuesta de hipersensibilidad mediada por las bases esfingoideas en *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Goodman RN, Novacky AJ (1994) The hypersensitive response reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. *American Phytopathological Society Press*.
- Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 525–545.
- Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S (2008) STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current Biology CB*. 18: 177–82.

- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramirez J. Sánchez-Nieto S, Plasncia J, Gavilanes-Ruiz M (2005) Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*. 221: 589–596.
- Hammond C, Braakman I y Helenius A (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 913–917.
- Hara-Hishimura I, Takeuchi Y, Inoue K (1993) Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. *Plant J*. 4: 793-800.
- Hara-Nishimura I (2003) Asparaginyl endopeptidase. *In Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press. 846-849.
- Hara-Nishimura I y Maeshima M (2000) Vacuolar processing enzymes and aquaporins. vacuolar compartments in plants. *Sheffield Academic Press: London, UK*. 20–42.
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nakaune S, Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol*. 8: 404–408.
- Hara-Nishimura I, Inoue K, Nishimura M (1991) A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett*. 294: 89-93.
- Hara-Nishimura I, Kinoshita T, Hiraiwa N, Nishimura M (1998) Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *J Plant Physiol*. 152: 668-674.
- Hara-Nishimura I, Nishimura M (1987) Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*. 85: 440-445.
- Hara-Nishimura y Hatsugai N (2011) The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Diff*. 18: 1298–1304.
- Hartl FU y Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol*. 16: 574–581.
- Haschke HP, Kaiser G, Martinoia E, Hammer U, Teucher T, Dorne AJ y Heinz E (1990) Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO<sub>2</sub>-fixation mechanisms. *Botanica Acta*. 103: 32–38.



- Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, Kondo M, Fuji K, Ogasawara K (2009) A novel membrane-fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Gene Dev.* 23: 2496–2506.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2006) A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis.* 11: 905–911.
- Hatsugai N, M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science.* 305: 855-858.
- Helenius A y Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 73: 1019–1049.
- Hetzer, M.W. *et al.* (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 347–380.
- Hillig I, Leipelt M, Ott C, Zahringer U, Warnecke D y Heinz E (2003) Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 553: 365–369.
- Hillig I, Leipelt M, Ott C, Zahringer U, Warnecke D y Heinz E (2003) Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 553: 365–369.
- Hiraiwa N, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1999) Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Lett.* 447: 213-216.
- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell.* 122: 85–95.
- Hoh B, Hinz G, Jeong BK y Robinson DG (1995) Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J Cell Sci* 108: 299–310.
- Hubbard SC y Ivatt RJ (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 50: 555–583.
- Imai H, Yamamoto K, Shibahara A, Miyatani S y Nakayama T (2000) Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids.* 35: 233–236.

- Iwasawa R, Mahul-Mellier A-LL, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S (2011) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* 30: 556–568.
- Iwata Y (2010) Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. *Plant Biotechnol.* 27: 161–171.
- Iwata Y y Koizumi N (2005) An *Arabidopsis* transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 5280–5285.
- Iwata Y, Fedoroff NV y Koizumi N (2008) *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell.* 20: 3107–3121.
- Jelitto-Van Dooren EP, Vidal S y Denecke J (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress. A novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell.* 11: 1935–1944.
- Kaul K y Lester RL (1975) Characterization of inositol-containing phosphor sphingolipids from tobacco leaves: isolation and identification of two novel, major lipids: N-acetyl glucosamido glucuronidoi nositol phosphorylceramide and glucosamidoglucuronidoinositol phosphoryl ceramide. *Plant Physiol.* 55: 120–129.
- Kelleher DJ y Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16: 47R–62R.
- Kim PK (2006) The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol.* 173: 521–532.
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* 19: 43–53.
- Kleizen B y Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 16: 343–349.
- Koiwa H, Li F, McCully MG, Mendoza I, Koizumi N, Manabe Y, Nakagawa Y y Zhu J (2003) The STT3a subunit isoform of the *Arabidopsis* oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell.* 15: 2273–2284.

Kornfeld R y Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54: 631–664.

Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science.* 325: 477–481.

Kuroyanagi M, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell Physiol.* 43: 143–151.

Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M y Hara-Nishimura I. (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 280: 32914–32920.

Lachaud C, Da Silva D, Cotelle V, Thuleau P, Xiong TC, Jauneau A, Brière C, Graziana A, Bellec Y, Faure JD, Ranjeva R y Mazars C (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium.* 47: 92–100.

Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet M, Lessire R, Hartmann MA y Moreau P (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology*, 43: 461–472.

Lev S (2010) Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 739–750.

Levine B y Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanism and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 6: 463-477.

Levine TP, Wiggins CA y Munro S (2000) Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 11: 2267–2281.

Li Z, Yue H y Xing D (2012) MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 195: 85–96.

Lindberg MO y Oliveberg M (2007). Malleability of protein folding pathways: A simple reason for complex behaviour. *Curr Opin Struct Biol.* 17: 21–29.

Liu JX y Howell SH (2010) bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 22: 782–796.

Liu JX, Srivastava R, Che P y Howell SH (2007). An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor bZIP28. *Plant Cell*. 19: 4111–4119.

Lynch DV y Dunn TM (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol*. 161: 677–702.

Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*. 112: 379–389.

Mackey D, Holt III BF, Wiig A, Dangl JL. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*. 108: 743–754.

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomri S, Novoa ZY (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 18: 3066-77.

Markham JE y Jaworski JG (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 21: 1304–1314.

Markham JE, Li J, Cahoon EB y Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*. 281: 22684–22694.

Markham JE, Lynch DV, Napier JA, Dunn TM y Cahoon EB (2013) Plant sphingolipids: function follows form. *Curr Opin Plant Biol*. 16: 350–357.

Markham JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hematy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-Jeunemaitre B and Faure JD (2011) Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23: 2362–2378.

Martínez IM y Chrispeels MJ (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in

*Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*. 15: 561–576.

Mishiba K, Nagashima Y, Suzukia E, Hayashia N, Ogata Y, Shimadab Y y Koizumi N (2013) Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the *Arabidopsis* unfolded protein response. *PNAS*. 110: 5713–5718.

Mur LAJ, Aubry S, Mondhe M, Kingston-Smith A, Gallagher J, Timms-Taravella E, James C, Papp I, Hörtensteiner S, Thomas H and Ougham H (2010) Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 188: 161–174.

Nakagawa T (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 403, 98–103.

Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M (2005) A vacuolar processing enzyme,  $\delta$ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell*. 17: 876–887.

Navazio L, Miuzzo M, Royle L, Baldan B, Varotto S, Merry AH, Harvey DJ (2002) Monitoring endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic of a plant calreticulin by protein glycosylation analysis. *Biochemistry*. 41: 14141–14149.

Ng CK, Carr K, Mcainsh MR, Powell B y Hetherington AM (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 410: 596–599.

Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 6: 1028-1042.

Okita TW y Rogers JC (1996) Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 327–350.

Paris N, Stanley M, Jones RL y Rogers JC (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 85:563–572.

Pattison RJ y Amtmann A (2009) N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends Plant Sci*. 14: 92–99.

Peer M, Bach M, Mueller M y Waller F (2011) Free sphingobases induce RBOHD-dependent reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Lett*. 585: 3006–3010.

- Peer M, Stegmann M, Mueller MJ y Waller F (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 584: 4053–4056.
- Qiang X, Zechmann B, Reitz MU, Kogel KH y Schäfera P (2012) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell.* 24: 794–809.
- Raff M (1998) Cell suicide for beginners. *Nature*, 396: 119-122.
- Raychaudhuri S y Prinz WA (2008) Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 15785–15790.
- Ridge RW, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE (1999) Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol.* 40: 1253–61.
- Rodríguez-Mejía P (2006) Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, compuestos esfingoideos y respuesta a patógenos en células vegetales. Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.
- Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V, Raikhel NV (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7389–7394.
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20: 5556–5567.
- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H y Jones JD (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11: 273–287.
- Ruddock LW y Molinari M (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J. Cell Sci.* 119: 4373–4380.
- Ruiz-Canada C, Kelleher DJ y Gilmore R (2009) Cotranslational and post-translational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136: 272–283.
- Sastry PS y Kates M (1964) Lipid components of leaves. Galactolipids, cerebroside, and lecithin of runner-bean leaves. *Biochemistry.* 3: 1271–1280.

- Saucedo-García M, Guevara-García A, Gonzalez-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana S, Markham JE, Lozano-Rosas MG, Dietrich CR, Ramos-Vega M, Cahoon EB y Gavilanes-Ruiz M (2011) MPK6, sphinganine and the *LCB2a* gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 19: 943–957.
- Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, Voss C, Walter P (2009) Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol*. 187: 525–536.
- Sevier CS y Kaiser CA (2006) Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol Biol Cell*. 17: 2256–2266.
- Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R (2005) Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*. 25: 921–32.
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun Ya y Zuo J (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res*. 17: 1030–1040.
- Shore GC, Papa FR, Oakes SA (2011) Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*. 23: 143–49.
- Smirnoff N (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants, *Blackwell Publishing, UK*.
- So-Yon P, Jae-Woong Y, Jong-Sung P, Jinjie L, Soo-Cheul Y, Na-Yeoun L, Sang-Kyu L, Seok-Won J, Hak SS, Hee-Jong K, Jong-Seong J, Youn-II P y Nam-Chon P (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* 19: 1649–1664.
- Spang A (2009) On vesicle formation and tethering in the ER–Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol*. 21: 531–536.
- Sperling P, Franke S, Lüthje S y Heinz E (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem*. 43: 1031–1038.
- Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG y Howell SH (2013) BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25: 1416–1429.

Staehelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* 11: 1151-1165.

Stone JM, Heard JE, Asai T y Ausubel FM (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell.* 12: 1811–1822.

Tabas I y Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 13: 184-90.

Tajima H y Koizumi N (2006) Induction of BiP by sugar independent of a cis-element for the unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 926–930.

Tamura K, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I y Imai H (2001) Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 42: 1274–1281.

Tapia de Aquino (2012) Cuantificación y efecto en la ultraestructura del cloroplasto de especies reactivas de oxígeno inducidas por un aumento de bases esfingoides en plantas. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Tognetti VB, Palatnik JF, Fillat MF, Melzer M, Hajirezaei MR, Valle EM y Carrillo N (2006) Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco plants confers broad range stress tolerance. *Plant Cell.* 18: 2035–2050.

Townley HE, McDonald K, Jenkins GI, Knight MR y Leaver CJ (2005) Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem.* 386: 161–166.

Valente MA, Faria JAQA, Soares-Ramos JR, Reis PA, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MA, Fietto LG, Loureiro ME, Aragão FJ y Fontes EP (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot.* 60: 533–546.

van Door WG y Woltering EJ (2005) Many ways to 3024 exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.* 10:117–122.



- van Doorn WG, Beer EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B y Bozhkov PV (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Diff.* 18: 1241–1246
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 135–162.
- Verhoek B, Haas R, Wrage K, Linscheid M y Heinz E (1983) Lipids and enzymatic activities in vacuolar membranes isolated via protoplasts from oat primary leaves. *Z Naturforsch*, 38c, 770–777.
- Vitale A y Denecke J (1999). The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell.* 11: 615–628.
- Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3: 944-950.
- Wang D, Weaver, ND, Kesarwani M y Dong X (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science.* 308: 1036–1040.
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV y Xiao S (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3163–3179.
- Watanabe N, Lam E (2008) BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 283: 3200–10.
- Wei J, Gaut JR y Hendershot LM (1995) In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J Biol Chem.* 270: 26677–26682.
- West M, Zurek N, Hoenger A, Voeltz GK (2011) A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol.* 193: 333–46.
- Wink M (1993) The plant vacuole: a multifunctional compartment. *J. Exp. Bot.* 44 (Supp.): 231–246.

Worrall D, Liang YK, Alvarez S, Holroyd GH, Spiegel S, Panagopoulos M, Gray JE y Hetherington AM (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J.* 56: 64–72.

Yamada K, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2005) A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiol Plant*, 123: 369–375.

Yoshida S y Uemura M (1986) Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol.* 82: 807–812

Zhang SQ, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6: 520–527.

Zuppini A, Navazio L y Mariani P (2004) Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *J Cell Sci.* 117: 2591–98.

Zurbriggen MD, Tognetti VB y Carrillo N (2007) Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. *IUBMB Life.* 59: 355 – 360.

Zurbriggen MD, Tognetti VB, Fillat MF, Hajirezaei MR, Valle EM y Carrillo N (2008) Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends Biotechnol.* 26: 531-537.