



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ EN LA LÍNEA MUTANTE *mpk3* EN
CONDICIONES DE ACLIMATACIÓN AL FRÍO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

I.Q. ILIAN GIORDANO PONCE PINEDA

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. MARINA GAVILANES RUÍZ

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MOHAMMED EL HAFIDI

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2018.



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. María Soledad Funes Argüello**

VOCAL: **Dra. Sobeida Sánchez Nieto**

VOCAL: **Dr. Eleazar Martínez Barajas**

VOCAL: **Dr. Ángel Arturo Guevara García**

SECRETARIO: **Dra. Rosario Vera Estrella**

Sitio en donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica
Facultad de Química, UNAM**

ASESOR: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

SUSTENTANTE: _____
I.Q. Ilian Giordano Ponce Pineda

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, USA) por en análisis esfingolipidómico de las muestras membranales.

Al Dr. Arturo Guevara García (Instituto de Biotecnología, UNAM) por haber proporcionado las semillas de *Arabidopsis thaliana* de la línea *mpk3* para este trabajo.

Al Dr. José de Jesús García Trejo (Facultad de Química, UNAM) por su participación dentro del comité tutorial.

Al Dr. Mohammed El-Hafidi Bentlakder (Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez) por su asesoría dentro del comité tutorial.

A la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo (Facultad de Química, UNAM) por la obtención de las vesículas de membrana plasmática usadas en este trabajo de tesis.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra (Facultad de Química, UNAM) por su apoyo técnico en el cultivo de las plantas usadas.

A la M. en C. Laura Carmona Salazar (Facultad de Química, UNAM) por su apoyo técnico.

El I.Q. Ilian Giordano Ponce Pineda realizó esta tesis de Maestría gracias a una beca de CONACYT (Registro No. 741285) y recibió una beca de conclusión del proyecto de CONACYT 238368.

Ilian Giordano Ponce Pineda recibió apoyo del Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir a un congreso internacional.

Esta tesis se realizó gracias al financiamiento de los proyectos PAPIIT IN222815 e IN220618, de la DGAPA, UNAM, PAIP 5000 9115 de la Facultad de Química, UNAM y CB-2014-01, 238368 del CONACYT.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
1. El estrés ambiental en las plantas	3
1.1. Estrés por frío en las plantas.....	3
1.2 Percepción y señalización durante el estrés por frío.....	4
1.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	5
1.2.2. Cascadas de MAP cinasas.....	7
1.2.3. Regulación de los genes de respuesta a frío	9
1.2.4. La membrana plasmática en la respuesta a las bajas temperaturas.....	9
2. La ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	10
2.1. Estructura y funcionamiento de la ATPasa de H ⁺	11
2.2. Papel fisiológico de la ATPasa de H ⁺	13
2.3. Regulación de la actividad de la ATPasa de H ⁺	14
2.3.1. Regulación por isoformas	14
2.3.2. Regulación por el carboxilo terminal.....	15
2.3.3. Regulación por la interacción con una proteína 14-3-3.....	15
2.3.4. Regulación por fosforilación	16
2.3.5. Regulación por lípidos membranales	17
ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
1. Objetivo general.....	20
2. Objetivos particulares.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Diseño experimental.....	21
2. Material biológico.....	22
3. Crecimiento de plantas	22
4. Tratamiento de no aclimatación (NA) y de aclimatación (AC)	23

5.	Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática	23
5.1.	Obtención de la fracción microsomal.....	23
5.2.	Obtención de vesículas de membrana plasmática.....	23
6.	Determinación de la proteína por el método de Lowry	23
7.	Determinación de fosfato inorgánico.....	24
8.	Determinación de hidrólisis de ATP.....	24
9.	Determinación de la actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato para el análisis cinético	25
10.	Separación de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	26
11.	Tinción de geles con azul de Coomassie	28
12.	Secado de geles	28
13.	Detección de proteínas por Inmunodetección.....	28
14.	Determinación de la composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática.....	29
15.	Proteólisis controlada de vesículas de membrana.....	30
16.	Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS.....		31
1.	Determinación del efecto de la aclimatación en el fenotipo de plantas que no expresan el gen MPK3	31
2.	Efecto de la aclimatación en la actividad de ATPasa de H ⁺ en vesículas de membrana plasmática.....	33
3.	Determinación de la cinética de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática	34
4.	Estimación de los niveles de ATPasa de H ⁺ de vesículas de membrana plasmática.....	37
5.	Niveles de la proteína 14-3-3 en las vesículas de membrana plasmática	39
6.	Esfingolipidómica de las vesículas de membrana plasmática.....	41
7.	Digestión con tripsina de la ATPasa de H ⁺ de las vesículas de membrana plasmática.....	44
DISCUSIÓN.....		47
1.	Capacidad de aclimatación de las plantas wt y mpk3	48
2.	Parámetros contribuyentes a las diferencias de actividad de la ATPasa de H ⁺ en las plantas wt y mpk3.....	49
2.1.	Comportamiento cinético de la ATPasa de H ⁺ en plantas wt y mpk3	50
2.2.	Niveles enzimáticos de la ATPasa de H ⁺ y de la proteína 14-3-3 en plantas wt y mpk3.....	51

2.3. Entorno esfingolipídico de la ATPasa de H ⁺ en plantas wt y mpk3	53
3. Implicación del carboxilo terminal de la ATPasa de H ⁺ en los cambios de actividad	54
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS.....	56
APÉNDICES.....	57
Apéndice 1.....	57
Apéndice 2.....	57
Apéndice 3.....	58
Apéndice 4.....	58
Apéndice 5.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Aclimatada
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BCL	Bases de cadena larga
BTP	Bis-Tris-Propano
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
DE	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESI	Ionización por electrospray
GIPC	Glicosil-inositolfosforil-ceramida
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
MAPK o MPK	MAP cinasa
MAPKK o MKK	MAP cinasa cinasa
MAPKKK o MEKK	MAP cinasa cinasa cinasa
MOPS	Ácido-morfolinopropanosulfónico
MPK3	MAP cinasa 3
MS	Espectroscopia de masas
NA	No aclimatada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Piperazina-N, N-bis (ácido 2-etanosulfónico)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador de fosfatos salino
TEMED	Tetrametiletildiamina

RESUMEN

Las cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) son módulos de señalización que convierten estímulos en respuestas celulares. Las cascadas de MAP cinasas están compuestas de tres cinasas que conforman el módulo básico MAPKKK-MAPKK-MAPK que se activan de manera secuencial. Estas cascadas están involucradas en diversos aspectos de la fisiología de la planta y respuesta a estreses biótico y abiótico. Uno de los tipos de estrés abiótico es el frío, el cual puede ser clasificado como por enfriamiento (temperaturas 0-15 °C) y por congelamiento (temperaturas <0 °C).

Se ha encontrado que, durante el estrés por frío, las MAP cinasas MPK3, MPK4 y MPK6 son activadas y participan en la respuesta. Además, en nuestro laboratorio se ha encontrado que en una mutante (*mpk3*) con pérdida de función para MPK3, la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática disminuye un 70 ± 5 % después de haberse sometido a bajas temperaturas, lo que corresponde a una disminución mayor a lo observado en plantas tipo silvestres y otras mutantes. En la misma mutante, también se encontró que, en condiciones normales, la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática tiene una actividad un 50 ± 5 % mayor en comparación a la de plantas tipo silvestres. Estos resultados indican que la actividad de MPK3 está involucrada en la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺, por lo que este proyecto se planteó con el propósito de profundizar en el conocimiento de este proceso. El estudio se llevó a cabo en plantas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos tipo silvestre (*wt*) y mutante *mpk3*, realizándose la caracterización bioquímica de la ATPasa de H⁺ en membranas de las plantas aclimatadas (AC) y no aclimatadas (NA) a condiciones de frío.

Los resultados obtenidos muestran que tanto las plantas *wt* como *mpk3* son capaces de aclimatarse con una semana de exposición a 4 °C. Si bien, se encontraron diferentes actividades y constantes cinéticas de ATPasa de H⁺ entre ambos genotipos, tanto en condiciones de NA como de AC. Estas diferencias no pudieron ser atribuidas a una diferencia en la cantidad de ATPasa de H⁺, ni de una proteína 14-3-3. Además, un análisis esfingolipidómico reveló una mayor cantidad de GIPC en la membrana de plantas *mpk3* NA, lo cual sugiere la participación de MPK3 en el aumento de actividad de la ATPasa. Adicionalmente, se determinó que el carboxilo terminal de la ATPasa parece estar involucrado en la regulación. En conjunto, los resultados sugieren que la MPK3 si está involucrada en la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺, tanto en condiciones normales como de aclimatación al frío.

INTRODUCCIÓN

1. El estrés ambiental en las plantas

Las plantas están constantemente expuestas a diferentes estreses ambientales tales como temperaturas extremas, alta salinidad, exceso o falta de agua, luz o nutrimentos, que limitan su crecimiento y desarrollo [Levitt, 1980]. Para enfrentar estas condiciones desfavorables, las plantas han desarrollado mecanismos moleculares específicos que se expresan en cambios en su fisiología que les permiten adaptarse a diferentes tipos de estrés [Jenks y Hasegawa, 2014].

1.1. Estrés por frío en las plantas

El estrés por frío es de tipo abiótico y es uno de los estreses más relevantes, ya que además de afectar el crecimiento de las plantas determina su distribución geográfica. El frío puede afectar el desarrollo de las plantas en casi todas las fases de su ciclo de vida, desde la germinación hasta la producción de semillas. La sensibilidad de las plantas a las bajas temperaturas en un ambiente particular es determinada por el límite en el cual su proceso metabólico continúa funcionando bajo el estrés o el punto en el cual la planta sufre daños permanentes, los cuales finalmente la llevan a la muerte [Galiba y Tóth, 2017]. De acuerdo con la tolerancia al frío, las plantas están divididas en tres categorías:

- Susceptibles al frío: presentan daños por temperaturas menores a los 12 °C.
- Tolerantes al frío, pero susceptibles al congelamiento: capaces de sobrevivir a temperaturas menores a 12 °C, pero incapaces de resistir al congelamiento (≤ 0 °C).
- Tolerantes al congelamiento: capaces de aclimatarse para sobrevivir a temperaturas significativamente menores a 0 °C.

La respuesta de las plantas a las bajas temperaturas depende de la duración e intensidad del estrés, por ejemplo, en muchas plantas de climas templados, una exposición gradual a temperaturas bajas no congelantes induce una respuesta adaptativa conocida como aclimatación al frío, la cual aumenta su resistencia al congelamiento. Durante este proceso se lleva a cabo una reprogramación en la expresión génica que resulta en un ajuste metabólico [Thomashow, 1999].

1.2 Percepción y señalización durante el estrés por frío

En *Arabidopsis* y otras plantas se ha explorado la regulación transcripcional implicada en respuesta al estrés por frío. Se ha encontrado que tres factores de transcripción tipo CBF (por sus siglas en inglés C-repeat (CTR)-binding factors), CBF1, CBF2 y CBF3, también conocidos como DREB (por sus siglas en inglés dehydration-responsive element (DRE)-binding proteins) juegan un papel importante en la aclimatación al frío [Jia *et al*, 2016; Zhao *et al*, 2016].

Un análisis metabolómico en *Arabidopsis* reveló que la aclimatación al frío incrementó 75% de los 434 metabolitos analizados [Cook *et al*, 2004; Kaplan *et al*, 2004]. La función de estos metabolitos ha sido relacionada a una función osmoprotectora, sin embargo, algunos de ellos inducidos durante la aclimatación al frío pueden actuar como señales para reconfigurar la expresión génica [Yadav, 2009]. Entre los componentes que se sabe que aumentan durante el estrés por frío y actúan como señalizadores son el Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno (ERO), ácido fosfatídico (AF), óxido nítrico (NO) y fitoesfingosina-1-fosfato (PHS-P) (Fig. 1). Estos mensajeros pueden activar diferentes proteínas como las MAP cinasas, las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPK) y algunas fosfolipasas [Ichimura *et al*, 2000; Kim *et al*, 2003; Bargmann y Munnik, 2006; Janská *et al*, 2010] (Fig. 1).

Aun cuando se han estudiado ampliamente las vías de señalización en respuesta al frío, el mecanismo por el cual las plantas pueden percibir esta señal sigue siendo desconocido, y hasta ahora no se ha identificado ningún sensor o receptor de frío en plantas. Varios estudios sugieren que las plantas podrían detectar las bajas temperaturas a través de un cambio en las propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática, ya que la fluidez membranal disminuye y la rigidez membranal aumenta durante el estrés por frío. Se ha encontrado que la rigidificación de la membrana plasmática durante la exposición al frío induce genes que ayudan en la aclimatación en alfalfa y *Brassica napus* [Orvar *et al*, 2000; Sangwan *et al*, 2001]. Este cambio de fluidez se lleva a cabo de manera inmediata a los cambios de temperatura, ya que únicamente depende de la composición lipídica y no de otra proteína o elemento transductor.

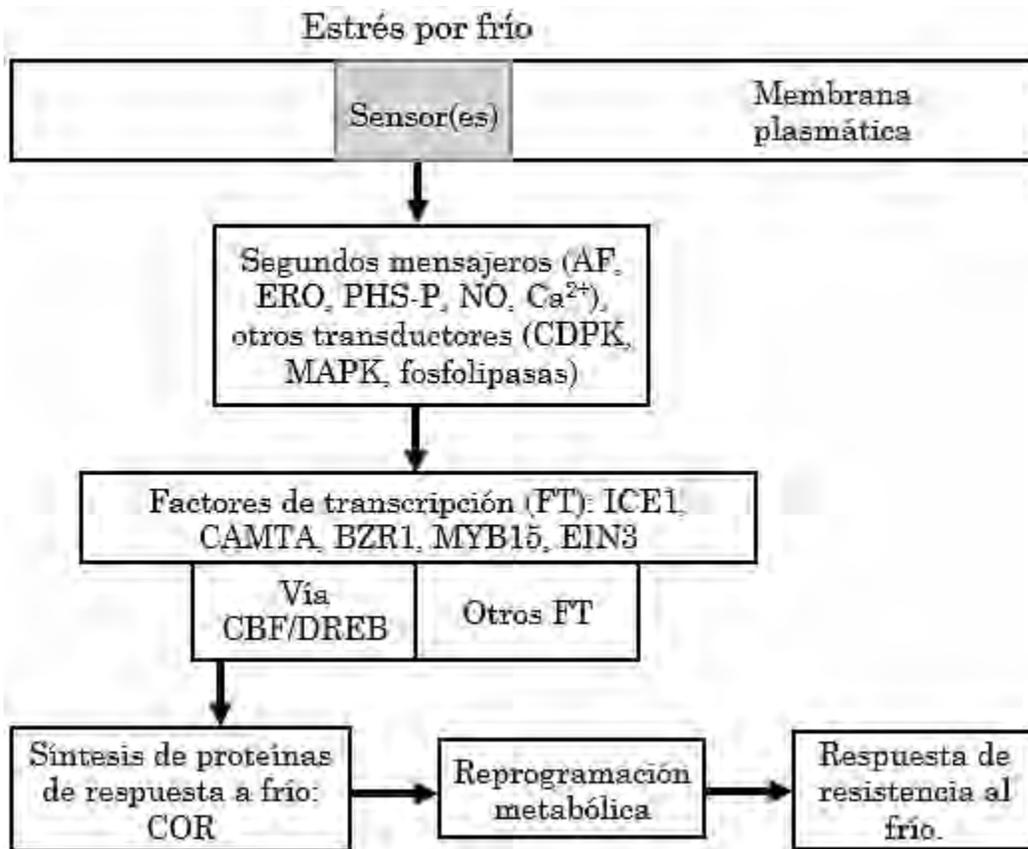


Fig. 1. Esquema ilustrativo de la respuesta molecular de las plantas a las bajas temperatura. [Modificada de Janská *et al*, 2010]. AF (ácido fosfatídico), BZR1 (por sus siglas en inglés brassinazole-resistant 1), CAMTA (activador transcripcional de unión a calmodulina), CBF/DREB (por sus siglas en inglés C-repeat (CTR)-binding factor/ dehydration-responsive element (DRE)-binding protein), CDPK (proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+}), EIN3 (por sus siglas en inglés ethylene-insensitive 3), ERO (especies reactivas de oxígeno), FT (factor de transcripción), ICE1 (por sus siglas en inglés inducer of CBF expression 1), MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos), MYB15 (gen que contiene una secuencia de reconocimiento Myb), NO (óxido nítrico), PHS-P (fitoesfingosína-1-P).

1.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), que incluyen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^\bullet), el radical perhidroxilo (HO_2^\bullet), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el ión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), son compuestos derivados de la molécula de oxígeno (O_2) que han sufrido la adición de uno o más electrones, por lo que son energéticamente más reactivos que el oxígeno molecular (Fig. 2) [Gechev *et al*, 2006].

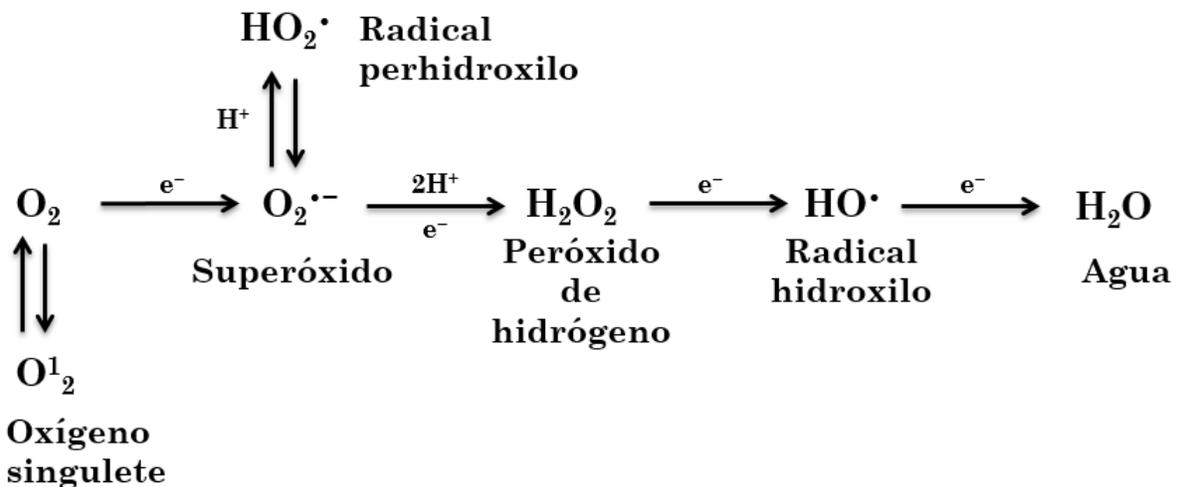


Fig. 2. Formación de las especies reactivas de oxígeno.

En las plantas, las ERO son formadas normalmente como subproductos de la respiración celular, la fotosíntesis, el plegamiento de proteínas, y muchas otras reacciones metabólicas [Foyer y Noctor, 2009]. En las mitocondrias, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ se forma por la cadena de transporte de electrones mitocondriales en los complejos respiratorios I, II y III. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede entonces dismutarse a H_2O_2 espontáneamente, o catalíticamente por la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial [Huang *et al*, 2016]. Durante la fotosíntesis, varios tipos de ERO se generan por diferentes vías en los cloroplastos. Por ejemplo, el $^1\text{O}_2$ se produce constitutivamente cuando la clorofila es excitada por los electrones. La fotorreducción de O_2 por el lado reductor del fotosistema II (PSII) produce $\text{O}_2^{\cdot-}$, que dismuta para formar H_2O_2 . En la parte donadora de electrones del PSII, el H_2O_2 puede producirse por inhibición de la actividad enzimática del complejo manganeso-agua. El fotosistema I (PSI) puede producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ donando el electrón al O_2 en lugar de a la ferredoxina por medio de la reacción de Mehler [Asada, 2006; Pospisil, 2009]. En los peroxisomas, el H_2O_2 se genera como un producto final por vías de oxidación como la vía de oxidación del glicolato y la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga [Del Rio y Lopez-Huertas, 2016]. En el apoplasto, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede producirse por una NADPH-oxidasa de la membrana plasmática (AtRbohD), de ahí, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede dismutar a H_2O_2 espontáneamente, o catalíticamente por una SOD apoplástica [Sagi y Fluhr, 2006].

Altos niveles de ERO pueden ser dañinos, los cuales causan directa o indirectamente daño en diferentes moléculas como la peroxidación lipídica en las membranas celulares, desnaturalización proteica, oxidación de carbohidratos, cambios en la expresión génica e inclusive la muerte celular [Moller *et al*, 2009]. Sin embargo, los niveles de ERO pueden ser

controlados por los sistemas celulares eliminadores de ERO. Estos sistemas se dividen en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los mecanismos enzimáticos incluyen múltiples enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa (CAT), la peroxidasa (PRX), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR). Los mecanismos no enzimáticos consisten en moléculas solubles e insolubles que pueden ser oxidadas por los ERO. El glutatión (GSH), el ascorbato (ASC), la vitamina E y los fenoles son los principales sistemas no enzimáticos por los que el H_2O_2 se reduce a H_2O [Foyer y Noctor, 2009; Foyer y Noctor, 2011; Saxena *et al*, 2012; Mené-Saffrané, 2018].

A pesar de sus potenciales efectos negativos, las ERO juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, y como respuesta a los diferentes tipos de estrés. Se ha encontrado que el estrés por frío en *Arabidopsis thaliana* desencadena la producción de ERO por una NADPH-oxidasa de la membrana plasmática (AtRbohD), las cuales pueden iniciar una rápida señalización en toda la planta [Moller *et al*, 2009]. Además, se ha encontrado que, durante las bajas temperaturas, se produce una disminución del transcrito de la ferredoxina (Fd; un aceptor de electrones en la fase luminosa de la fotosíntesis) [Zimmerman *et al*, 2004], lo cual produce una hiperreducción de la cadena de transporte de electrones fotosintética y con ello un desequilibrio entre la capacidad de seguir tomando la energía de la luz y transducirla a la fijación de carbono. En estas condiciones, los intermediarios sobrerreducidos de la cadena de transporte de electrones fotosintética transfieren sus electrones a algún aceptor, el cual comúnmente es el oxígeno, provocando la generación de ERO [Allen, 1995; Suzuki y Mittler, 2006].

1.2.2. Cascadas de MAP cinasas

Uno de los mecanismos que permiten la transmisión del estímulo externo consiste en la señalización por cascadas de MAP cinasas. Las MAP cinasas son enzimas citosólicas que tienen como objetivo transmitir estímulos externos percibidos por receptores membranales mediante una serie de reacciones de fosforilación consecutiva [Ichimura *et al*, 2006]. Las cascadas de MAPK están involucradas en diversos aspectos de la fisiología de la planta como la división celular, el crecimiento y desarrollo, resistencia a patógenos e insectos y respuesta a estrés abiótico [Rodríguez *et al*, 2007].

Este sistema de transducción de señales está compuesto de tres cinasas: MAPK, cinasa MAPK (MAPKK o MEK), y cinasa MAPKK (MAPKKK o MEKK). Las tres cinasas forman el módulo básico de una cascada de MAPK, MAPKKK-MAPKK-MAPK. En donde una

MAPKKK fosforila y activa a una MAPKK, que una vez activada fosforila y activa a una MAPK (Fig. 3). Una MAPK activada puede fosforilar a otras proteínas que contengan el motivo fosforeceptor serina/treonina-prolina y sitios de acoplamiento. Estas fosforilaciones se pueden llevar a cabo tanto en el citoplasma como en el núcleo, ya que los objetivos pueden ser factores o correguladores transcripcionales. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado aproximadamente 20 MAPKs diferentes [Ichimura *et al.*, 2002].

En *Arabidopsis* también se ha encontrado que las MAPK actúan como respuesta al estrés por frío. Se encontró que la MPK4 y la MPK6 son fosforiladas por la MKK2 cuando la planta se expone a bajas temperaturas. En mutantes que expresan constitutivamente a la MKK2 se encontró una tolerancia al frío y una regulación positiva de los *CBF* [Teige *et al.*, 2014]. También se reportó que la MPK6, pero no la MPK4, está involucrada en la respuesta al frío y que esta se ve activada por una acumulación de PHS-P [Dutilleul *et al.*, 2012]. Igualmente se encontró que el promotor del gen *AtMPK3* se induce por sequía, alta salinidad y bajas temperaturas, lo cual coincide con el reporte de que la transcripción del gen *AtMPK3* aumenta al someter a la planta a bajas temperaturas [Mizoguchi *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2010]. Además, se ha reportado que la doble mutante *mpk9/mpk12* presenta un cierre de estomas reducido tras ser expuesta a bajas temperaturas [Saucedo-García *et al.*, 2015].



Fig. 3. Esquema ilustrativo de una cascada de MAP cinasas. Los signos de interrogación (?) representan diferentes pasos que llevan a la fosforilación y activación de la primer MAPKKK.

1.2.3. Regulación de los genes de respuesta a frío

Los genes *CBF* se encuentran organizados en tándem dentro del cromosoma 4 de *Arabidopsis thaliana*, los cuales son altamente similares entre ellos y codifican para polipéptidos de aproximadamente 24 kDa [Medina *et al*, 2011]. Estos factores de transcripción son rápidamente inducidos como respuesta a bajas temperaturas y se unen a elementos reguladores del DNA de CRT/DRE en los promotores de un subconjunto de genes regulados por frío COR (por sus siglas en inglés cold-regulated). La expresión de los genes COR codifica para proteínas con múltiples funciones, las cuales permiten que las plantas puedan tolerar el estrés por congelamiento [Jaglo-Ottosen *et al*, 1998; Thomashow, 1999; Gilmour *et al*, 2000].

La regulación transcripcional de los genes *CBF* ha sido muy estudiada y se encontró que está controlada por múltiples factores de transcripción. Los factores de transcripción ICE1 (por sus siglas en inglés inducer of CBF expression 1), CAMTA3 (por sus siglas en inglés calmodulin-binding transcription activator 3) y BZR1 (por sus siglas en inglés brassinazole-resistant 1) regulan positivamente la expresión de los genes *CBF*, mientras que MYB15 (por tener una secuencia de reconocimiento Myb) y EIN3 (por sus siglas en inglés ethylene-insensitive 3) regulan negativamente la expresión de los genes *CBF* [Chinnusamy *et al*, 2003; Agarwal *et al*, 2006; Doherty *et al*, 2009; Shi *et al*, 2012; Li *et al*, 2017b].

Sobre los mecanismos de regulación traduccional y posttraduccional de las proteínas *CBF* poco se sabe. Aunque, la fosforilación y defosforilación de proteínas es muy importante. Se ha encontrado que una cinasa, la OST1 (por sus siglas en inglés open stomata 1), regula positivamente la tolerancia al congelamiento. Bajo el estrés por frío, OST1 se activa y fosforila a ICE1, lo que inhibe su degradación regulada por la HOS1 (por sus siglas en inglés E3 ligase high expression of osmotically responsive gene 1), y con esto regula positivamente la expresión de los genes *CBF* y la tolerancia al frío [Agarwal *et al*, 2006, Ding *et al*, 2015]. Es posible que muchos de los genes activados por frío participen en la remodelación membranar.

1.2.4. La membrana plasmática en la respuesta a las bajas temperaturas

La membrana plasmática es la principal interface entre el medio extracelular e intracelular y funciona como una barrera semiimpermeable que permite la entrada y salida de agua durante el ciclo de congelamiento/descongelamiento.

Todas las membranas celulares son vulnerables a la desestabilización generada por el frío, por lo que el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática es esencial para la sobrevivencia [Uemura *et al*, 2006].

El principal daño celular durante el congelamiento es debido a la deshidratación celular, ya que la formación de hielo ocurre primero en la superficie de las plantas por nucleación heterogénea. Posteriormente, la formación del hielo se propaga a la matriz extracelular y de ahí al interior. Esto provoca un desbalance en las concentraciones de los diferentes solutos en la célula, y como respuesta a estas diferencias de concentración, la célula saca agua que se congela fuera [Uemura y Steponkus, 1999].

Cuando se congelan protoplastos no aclimatados, la deshidratación llega a ser más severa y el daño se manifiesta como una pérdida de respuesta osmótica (LOR). La LOR de los protoplastos no aclimatados es una consecuencia de la formación de la fase hexagonal II (H_{II}) inducida por el congelamiento en regiones donde la membrana plasmática tiene una estrecha conexión con otras membranas celulares [Gordon-Karmm y Steponkus, 1984].

La fase H_{II} es un arreglo que pueden tomar los lípidos de membrana, pero que es diferente al acomodo clásico de bicapa. En esta fase, los lípidos adoptan estructuras de cilindros paralelos largos que en los centros contienen agua y acomodan a las cabezas polares, mientras que las cadenas hidrofóbicas interactúan con las de los otros cilindros. El daño de los protoplastos aclimatados se manifiesta como LOR, pero no se lleva a cabo la formación de la fase H_{II} [Uemura y Steponkus, 1999].

Durante la aclimatación, la estabilidad de la membrana plasmática se ve incrementada como consecuencia de una alteración en la composición lipídica. Se ha encontrado que un incremento en los fosfolípidos de la membrana plasmática disminuye la incidencia de la lisis inducida por la expansión durante la aclimatación al frío [Steponkus *et al*, 1990].

La modificación de la fluidez y composición membranal puede afectar fuertemente la actividad de las enzimas localizadas en la membrana plasmática. Una de estas enzimas bien podría ser la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

2. La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

Las ATPasas tipo P son bombas iónicas de aproximadamente 100 kDa que usan ATP para transportar cationes a través de la membrana celular en contra de un gradiente de concentración. El nombre de estas ATPasas transductoras de energía deriva del hecho de

que, al obtener la energía del ATP, estas enzimas forman un intermediario fosforilado covalentemente en un residuo de aspartato [Pedersen y Carafoli, 1987; Duby y Boutry, 2009].

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es una proteína monomérica transmembranal de entre 948 y 957 residuos de aminoácidos, según la isoforma, lo cual corresponde a un peso aproximado de 100 kDa. La ATPasa de H⁺ lleva a cabo dos funciones acopladas: la hidrólisis de ATP (reacción exergónica) y el transporte de protones a través de la membrana plasmática en contra de su gradiente de concentración (reacción endergónica) [Auer *et al*, 1998; Palmgren y Harper, 1999].

2.1. Estructura y funcionamiento de la ATPasa de H⁺

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es referida comúnmente como la “enzima maestra” de las células vegetales, ya que juega un papel primordial en diferentes aspectos de la fisiología y bioquímica de la planta. La estructura de esta enzima ya ha sido observada por cristalografía de rayos X por Pedersen *et al*, [2007] (isoforma 2 de la ATPasa de H⁺ de *Arabidopsis thaliana*). En ella se identifican cuatro dominios estructurales (Fig. 4):

- El dominio M, lipídico que tiene 10 cruces transmembranales nombrados de M1 a M10, el cual es el que permite el cruce de protones desde el citosol hacia el apoplasto.
- El dominio P (de fosforilación), el cual está unido a los cruces transmembranales M4 y M5, y donde se encuentra el residuo Asp329 que se fosforila durante la catálisis.
- El dominio N (de unión al nucleótido), que está unido al dominio P y contiene el sitio de unión al ATP. La adenosina del ATP se enlaza al dominio N, mientras que el grupo trifosfato y el ion Mg²⁺ se extienden hacia el dominio P.
- El dominio A (dominio activador), el cual comprende la región del amino terminal y una pequeña región citoplasmática entre los cruces transmembranales M1 y M2. El residuo Glu184 del motivo conservado TGES, es el residuo implicado en la funcionalidad del dominio A como fosfatasa. Este residuo estimula la desfosforilación del Asp329, por medio de una rotación del dominio A hacia el dominio P, y viceversa; el dominio A se aleja del dominio P para que el dominio N con el nucleótido unido pueda montar el sitio catalítico en el que el residuo Asp329 será fosforilado nuevamente.

Además de estos 4 dominios encontrados en la estructura cristalográfica, existe un quinto dominio, llamado R (de regulación), el cual comprende la región del carboxilo terminal. Este dominio actúa como auto-inhibitorio, ya que, al tener interacción con la proteína, esta se “enrosca”, bloqueando la entrada de los H⁺ a los sitios transmembranales de unión y restringe la rotación del dominio A, esencial para la función de fosforilación-defosforilación de la enzima.

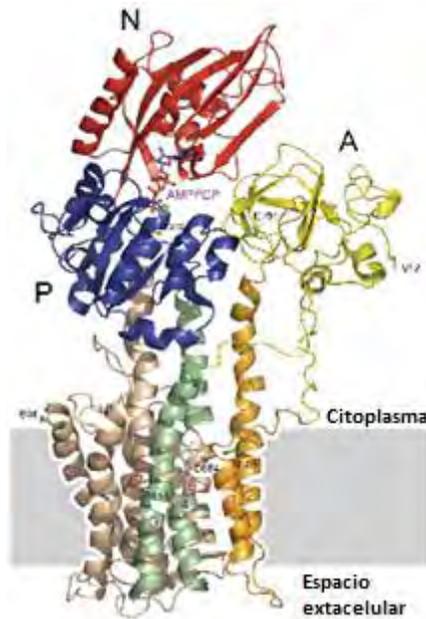


Fig. 4. Estructura cristalográfica de la isoforma AHA2 de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Se muestra la forma activa de la bomba de protones y tres de los cuatro dominios [Modificada de Pedersen *et al*, 2007].

El funcionamiento de esta ATPasa alterna entre al menos dos conformaciones principales, E₁ y E₂. En la conformación E₁ se tiene una gran afinidad por el ATP, así como por el H⁺ para ser transportado hacia el apoplasto. La conformación E₂ tiene una baja afinidad por los ligandos, pero tiene una alta afinidad por el inhibidor vanadato [Morsomme y Boutry, 2000]. Ésta es la conformación que une covalentemente al Pi en el Asp329. En cuanto a la función de transporte del catión, la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática contiene una región donadora/aceptora de H⁺, integrada por un único residuo protonable de ácido aspártico (Asp684), un residuo de asparagina (Asn106), un residuo de arginina (Arg655) y una gran cavidad central que puede ser llenada con agua. El Asp684 está estrechamente conectado al Asn106. Se cree que la protonación en la estructura E1-P del Asp684 facilita la formación del puente de hidrógeno entre este y el Asn106. La fosforilación crea cambios conformacionales de E1-P a E2-P y la liberación del H⁺ del Asp684. La Arg665 juega un papel importante en la liberación del H⁺ y del transporte contra altos potenciales de la membrana. La carga positiva de la Arg655 cercana al Asp684 favorece la liberación del H⁺

del Asp684 e impide la reprotonación del Asp684 con otro H⁺ extracelular [Janicka-Russak, 2011]. La membrana plasmática transporta solamente un protón por cada ATP hidrolizado, sin embargo, también se ha propuesto que existe desacoplamiento parcial entre la hidrólisis de ATP y el transporte de protones [Janicka-Russak, 2011]. Además, se conoce que el dominio R debe estar fosforilado para que la ATPasa de H⁺ tenga una conformación activa (Fig. 5) [Kühlbrandt *et al*, 2002].

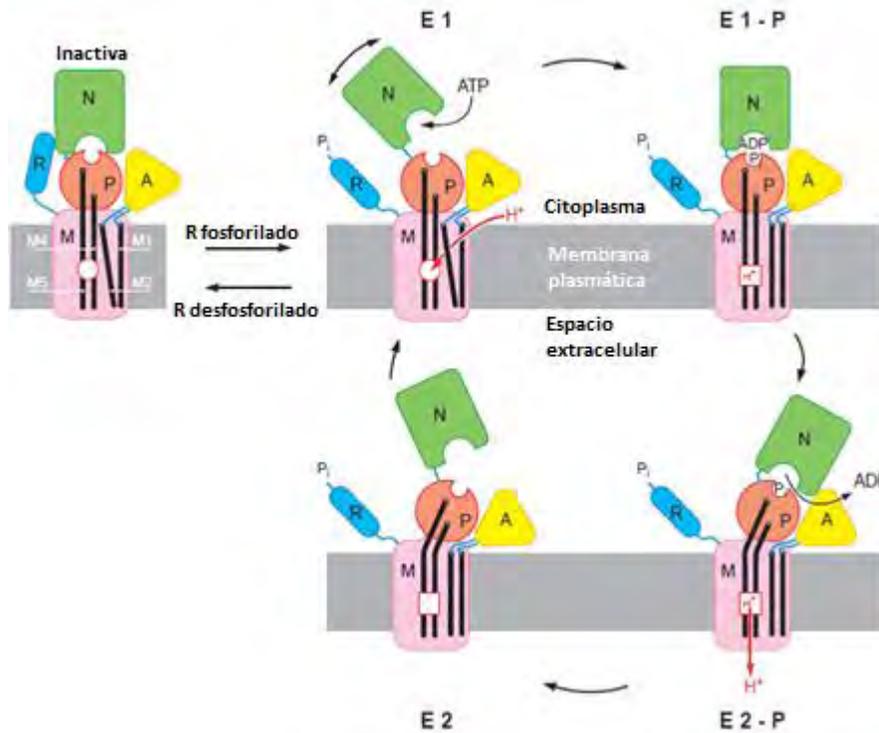


Fig. 5. Mecanismo simplificado del funcionamiento de la ATPasa de H⁺. Se observa como el dominio R inactiva a la enzima [Modificada de Kühlbrandt *et al*, 2002].

2.2. Papel fisiológico de la ATPasa de H⁺

Todas las células vegetales expresan a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, sin embargo, se ha encontrado que la cantidad de esta proteína varía en diferentes tipos de células y tejidos [Frías *et al*, 1996].

El transporte de H⁺ ocurre desde el citosol hacia el espacio apoplástico estableciendo una diferencia electroquímica de aproximadamente 2 unidades de pH y 250 mV. Ya que el citosol tiene un pH aproximado de 7 y el espacio apoplástico un pH de entre 5 y 6 unidades, el transporte se lleva a cabo en contra del gradiente de concentración de

H⁺, por lo que se requiere la reacción de hidrólisis de ATP para generar la energía requerida para el transporte. La reacción de ATPasa libera entre 60 y 65 kJ/mol, dependiendo de la concentración de ATP, lo que hace la reacción muy exergónica y capaz de sustentar el transporte [Nelson y Cox, 2007].

Las diferencias de potencial electroquímico generado por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática son necesarias para facilitar el transporte de solutos (iones, aminoácidos, azúcares, etc.) a través de acarreadores y canales, por transporte secundario, ya que la apertura de estos últimos es sensible al potencial electroquímico generado. El movimiento de especies como iones, carbohidratos y aminoácidos a través de la membrana plasmática se realiza por sistemas de simporte carbohidrato/H⁺ o aminoácido/H⁺, los cuales aprovechan la energía del transporte a favor del gradiente de concentración del H⁺ para entrar al citosol [Gavilanes *et al*, 1995].

El bombeo de protones al exterior de la célula ayuda también a la apertura y cierre de estomas, ya que al activar a la ATPasa de H⁺ aumenta el transporte de H⁺ hacia el apoplasto, lo que a su vez hiperpolariza la membrana plasmática, favoreciendo la entrada de K⁺ por canales membranales específicos. Al acumularse el K⁺, se induce la entrada de agua a la célula para equilibrar las concentraciones interna y externa, con lo que las células se hinchan y se generan cambios en la curvatura de la pared celular. Esto a su vez lleva a la apertura del poro estomático [Gavilanes *et al*, 1995; Liu *et al*, 2009].

Además de su papel fundamental en la absorción de nutrientes, la ATPasa de H⁺ es importante en el crecimiento de la célula. La teoría llamada del “crecimiento ácido” sugiere que los protones extruidos por una ATPasa de H⁺ activada disminuyen el pH apoplástico que activa a las enzimas que intervienen en la disminución de la rigidez de la pared celular [Hager *et al*, 1991]. Se ha reportado que las auxinas, hormonas vegetales, incrementan el flujo de membranas sintetizadas *de novo* y ricas en moléculas de ATPasa desde el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática, además de inducir la acidificación celular [Frías *et al*, 1996; Sanchez-Linares *et al*, 2012; López-Coria *et al*, 2016].

2.3. Regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺

2.3.1. Regulación por isoformas

Una forma de regular el metabolismo consiste en promover la expresión diferencial de distintas isoformas de una enzima clave. Para la ATPasa de H⁺ se han identificado múltiples

genes que codifican para diferentes isoformas. En *Arabidopsis thaliana* se sabe que existen 12 genes que codifican para variantes de la ATPasa de H⁺ denominadas AHA1-AHA12 [Gavilanes *et al*, 1995; Palmgren, 2001]. Las isoformas más abundantes son las AHA1 y AHA2, ya que estas se expresan en todos los tejidos y órganos. Además, se ha reportado que mutantes con interrupciones en los genes que codifican para estas dos isoformas resultan letales para la planta [Haruta *et al*, 2010]. Las propiedades catalíticas de todas las isoformas son similares, pero varían en su afinidad por el ATP, en su pH óptimo y en su sensibilidad a vanadato [Palmgren y Christensen, 1994].

2.3.2. Regulación por el carboxilo terminal

Entre las formas de regulación post-traduccionales, el mecanismo más estudiado involucra la regulación auto-inhibitoria por el dominio carboxilo terminal (aproximadamente 100 aminoácidos) de la enzima, que está altamente conservado en las ATPasas de H⁺ de la membrana plasmática de plantas [Rudashevskaya *et al*, 2011].

La eliminación del carboxilo terminal (dominio R) por medio de un tratamiento con tripsina o por ingeniería genética resulta en una enzima constitutivamente activa. Aunque está claro que el carboxilo terminal es el principal dominio regulatorio relacionado con la activación de la ATPasa de H⁺, los resultados recientes indican que el amino terminal igualmente participa en la modificación de la actividad de la bomba protones de la membrana plasmática [Janicka-Russak, 2011].

2.3.3. Regulación por la interacción con una proteína 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 son un grupo de proteínas que se unen a péptidos fosforilados, están altamente conservadas en organismos eucariontes y son capaces de actuar sobre múltiples blancos celulares. Constituyen una familia grande de proteínas homólogas codificadas por genes separados. Existen en su mayoría en forma de dímeros, cuyo monómero pesa aproximadamente 30 kDa [Fu *et al*, 2000].

Las proteínas 14-3-3 están involucradas in múltiples procesos biológicos y usualmente interactúan con proteínas fosforiladas para mediar la transducción de la señal alterando su actividad, su estabilidad, su conformación, su localización subcelular o su afinidad por otras proteínas [Denison *et al*, 2011; Paul *et al*, 2012].

Ya que las proteínas 14-3-3 están involucradas en interacciones proteína-proteína, se ha sugerido que participan en la respuesta al estrés en plantas a través de múltiples

mecanismos. Se ha encontrado que una proteína 14-3-3 es fosforilada por la cinasa CRPK1 (por sus siglas en inglés cold-responsive protein kinase 1) cuando esta es activada por frío, causando que la proteína 14-3-3 se transporte al núcleo para promover la degradación de las CBFs [Liu *et al*, 2017].

La proteína 14-3-3 activa a la ATPasa de H⁺ por medio de su interacción con el dominio R en los motivos arginina-serina-x-Pserina-x-prolina (donde x puede ser cualquier aminoácido y Pserina es una serina fosforilada) y tirosina-treonina-valina de la ATPasa [Fuglsang *et al*, 2003]. En un estudio reciente se encontró que para favorecer la unión de la proteína 14-3-3 con el carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺, el residuo Thr947 de la ATPasa requiere estar fosforilado mientras que la Ser931 no debe estar fosforilado [Fuglsang *et al*, 1999; Fuglsang *et al*, 2007].

Se ha encontrado también que el tratamiento de tejidos de plantas con la toxina fusicoccina producida por el hongo *Fusicoccum amygdali*, activa la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática promoviendo la unión de la proteína 14-3-3 de una forma esencialmente irreversible. La fusicoccina es capaz de formar el complejo únicamente cuando el carboxilo terminal de la ATPasa está interactuando con la proteína 14-3-3 [Olsson *et al*, 1998; Ottmann *et al*, 2007].

2.3.4. Regulación por fosforilación

La fosforilación tiene un papel muy importante en la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en plantas. Se han encontrado múltiples sitios de fosforilación [Rudashevskaya *et al*, 2012]. El primer sitio encontrado y más estudiado es en el penúltimo residuo, que corresponde a una treonina (Thr948 en AHA1 y Thr947 en AHA2). La fosforilación de este residuo crea el sitio de unión para la proteína 14-3-3, la cual estabiliza la conformación activa de la ATPasa. La proteína cinasa que lleva a cabo esta fosforilación no ha sido identificada. La fosforilación de otro residuo de treonina en el carboxilo terminal (Thr881 en AHA2) activa la ATPasa por un mecanismo que no involucra a las proteínas 14-3-3 [Fuglsang *et al*, 2014]. En contraste, la fosforilación de la Thr924 o la Ser931 inactivan a la ATPasa de H⁺ [Duby *et al*, 2009]. Por su parte, la fosforilación de la Ser931 y la Thr924 interfieren con la unión de las proteínas 14-3-3 (Fig. 6) [Falhof *et al*, 2015].

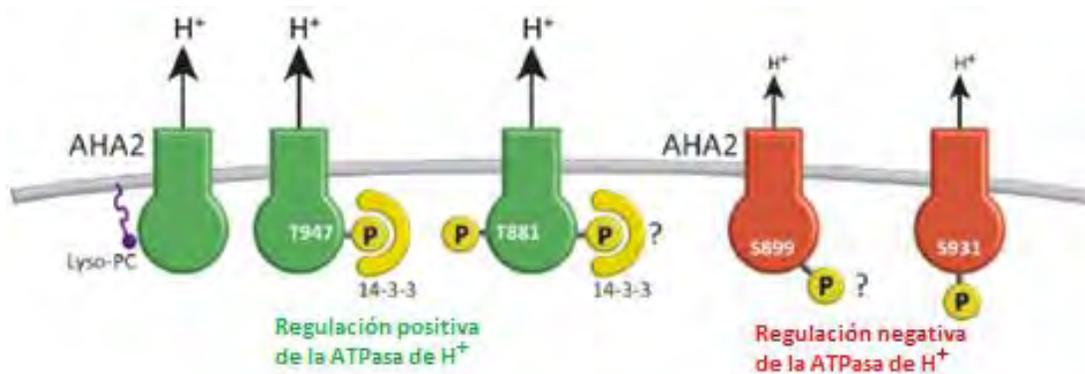


Fig. 6. Efectos de la fosforilación en diferentes residuos de la ATPasa de H^+ [Modificada de Falhof *et al*, 2015].

2.3.5. Regulación por lípidos membranales

Se ha descrito que varios agentes anfifílicos, incluyendo lípidos típicos de la membrana, pueden modificar la actividad de la ATPasa de H^+ . Esto se ha encontrado con glicerolípidos y esteroides. Por ello, se cree que el entorno membranal puede tener un efecto en la regulación de la actividad de la enzima [Kasamo, 1990].

La regulación de la actividad de las enzimas por los lípidos membranales que la rodean se ha explicado por dos modelos: la teoría de los lípidos en conjunto y la teoría de los lípidos frontera (anulares) [Kasamo y Sakakibara, 1996].

La teoría de los lípidos en conjunto (bulk) establece que cambios en la composición de lípidos en la membrana plasmática alteran la fluidez de la membrana, lo cual causa un cambio conformacional en la enzima y en su actividad [Kasamo, 2003].

La teoría de los lípidos frontera o anulares establece que hay moléculas lipídicas específicas de la membrana que están estrechamente unidas a la proteína. La interacción directa entre dichos lípidos anulares y las proteínas en la membrana causan la regulación de la actividad de la proteína. La composición de los fosfolípidos anulares alrededor de la proteína podría diferir de la composición del resto de fosfolípidos que integran el resto de la bicapa, lo cual permite dar una mejor explicación en la especificidad de las interacciones y uniones específicas entre lípidos y proteínas de la membrana [Kasamo, 2003].

ANTECEDENTES INMEDIATOS

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo estudios con plantas de líneas transgénicas mutantes en genes codificantes para enzimas de la vía de síntesis de esfingolípidos, así como con mutantes en genes codificantes para diferentes transductores relacionados con los esfingolípidos como segundos mensajeros. Estas líneas también se han usado en experimentos de aclimatación al frío. En todas estas mutantes se realizó un escrutinio midiendo varias funciones, entre ellas la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en condiciones de aclimatación.

Particularmente para la mutante *mpk3* se encontró una diferencia en la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática tanto en condiciones de aclimatación como de no aclimatación, ambas con respecto a la wt. La actividad de ATPasa de H⁺ de la mutante resultó ser 50% mayor en condiciones de no aclimatación. Sin embargo, la actividad disminuyó un 15% en condiciones de AC [Peña-Moral, 2015].

Además, se realizó un estudio en la cantidad total de ATPasa de H⁺ presente en la membrana plasmática, obteniéndose que únicamente para la mutante *mpk3* en condiciones de NA, la cantidad de enzima se incrementó un 20% [Rodríguez-Juárez, no publicado].

JUSTIFICACIÓN

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas es una enzima que es fundamental en la vida celular, por lo que ha sido muy estudiada tanto a nivel catalítico, como fisiológico y de regulación. Se sabe que la fosforilación de múltiples residuos es un mecanismo importante para la regulación de la enzima, pero hasta la fecha la proteína cinasa responsable de dichas fosforilaciones no ha sido identificada. De tal manera, no existen estudios que relacionen a las MAP cinasas como elementos que contribuyan a la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺, por lo que resulta muy interesante explorar el mecanismo mediante el cual la ATPasa modifica su actividad en plantas con pérdida de función de la MPK3, una MAPK frecuentemente involucrada en las respuestas a estrés biótico y abiótico.

Una de las formas de estrés abiótico muy importante para las plantas es la exposición a bajas temperaturas en etapas tempranas del desarrollo. En la actualidad el problema del cambio climático se ha incrementado considerablemente. El calentamiento global puede aumentar la frecuencia de las olas de frío y de las olas de calor ya que al modificar el balance energético de un sistema cambia el punto de equilibrio. Esto se traduce en aumentos y descensos bruscos de temperatura como respuesta del sistema para volver a equilibrarse [Wang *et al*, 2017], por ello, estudiar los mecanismos de adaptación de las plantas a diferentes temperaturas es muy importante. En este sentido, la caracterización de mutantes con respuestas diferenciales al frío constituye una herramienta experimental valiosa para intentar entender las estrategias celulares que las plantas despliegan para adaptarse a bajas temperaturas.

HIPÓTESIS

La MPK3 es un componente de la vía de señalización que activa a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en condiciones de aclimatación al frío.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar la catálisis de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la línea *mpk3* en condiciones de aclimatación, para así obtener información sobre el mecanismo mediante el cual la MPK3 contribuye al aumento de la actividad de la enzima.

2. Objetivos particulares

- Comparar los fenotipos de plantas Col-0 tipo silvestre y la mutante *mpk3* en condiciones de no aclimatación (NA) y aclimatación (AC) antes y después de un reto de congelación (-15 °C).
- Obtener vesículas de membrana plasmática de las plantas anteriormente mencionadas.
- Determinar la actividad específica de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en las vesículas de membrana obtenidas.
- Determinar la V_{max} , K_S y V_{max}/K_S de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de los genotipos en estudio en condiciones de aclimatación y no aclimatación.
- Estimar la cantidad de ATPasa en las vesículas de membrana plasmática de ambos genotipos y en ambas condiciones.
- Generar una versión de la ATPasa de H⁺ sin el dominio carboxilo terminal mediante tratamientos de tripsina, para determinar si esta región está involucrada en la menor actividad de la enzima observada en la línea *mpk3* en condiciones de NA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Para cumplir los objetivos presentados, se diseñó la estrategia experimental esquematizada en la Fig. 7.

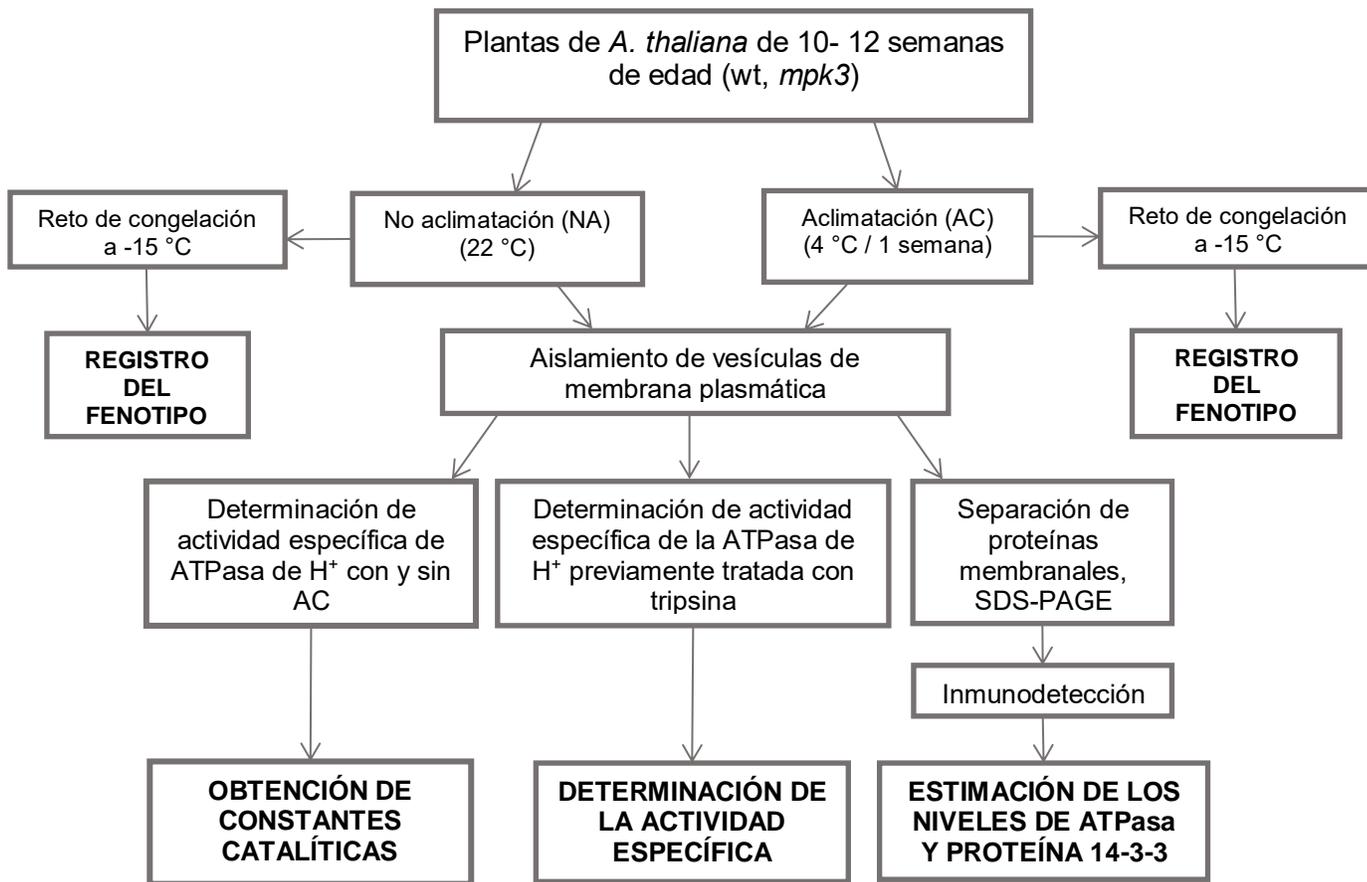


Fig. 7. Estrategia experimental para el cumplimiento de los objetivos.

2. Material biológico

Tabla 1. Material biológico.

LÍNEAS BAJO ESTUDIO	FENOTIPOS	GENOTIPOS
Silvestre (Col-0, wt)		Sin modificación
Mutante <i>mpk3</i>		Pérdida de función de MPK3 (SALK_100651)

3. Crecimiento de plantas

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 de los genotipos tipo silvestre (wt) y de la línea *mpk3*, la cual es una mutante de inserción por T-DNA con pérdida de función de la cinasa 3 activada por mitógenos (MPK3) (SALK_100651).

Las semillas de ambos genotipos fueron germinadas y crecidas por cuatro semanas en una maceta, a un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 °C y con riego discrecional con agua. Cinco días después se transfirieron a macetas previamente lavadas y remojadas con HClO₄ comercial al 30% y bien enjuagadas con agua de la llave, conteniendo un sustrato humedecido con agua de la llave compuesto de 3 partes de Mix 4 Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 1 parte de Vermiculita Premium Grande (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.) y 1 parte de Agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo de México), colocando de una a tres plántulas por maceta. Una vez remojadas, deben ser bien enjuagadas con agua de la llave para ser usadas.

Para el crecimiento de las plántulas, las macetas se colocan en charolas que se cubren con domos transparentes para mantener la humedad y se riegan con medio de Hoagland

(Apéndice 1) aproximadamente 3 veces por semana. Las plantas se crecieron en el invernadero con un fotoperiodo natural y aire acondicionado o bien en una cámara con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 ± 2 °C.

4. Tratamiento de no aclimatación (NA) y de aclimatación (AC)

Los tratamientos de NA o AC se realizaron sobre plantas de 8-10 semanas de desarrollo. Para las condiciones de NA las plantas se mantuvieron una semana en una cámara con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 ± 2 °C. Para las condiciones de AC las plantas se transfieren a una cámara con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 4 ± 2 °C. De las plantas en tratamiento y con ayuda de tijeras se cosecharon todas las hojas (jóvenes y adultas), las cuales se pesaron y separaron en paquetes de 25 g en papel aluminio, que fueron congelados inmediatamente con N₂ líquido y almacenados a -70°C hasta su uso posterior para la obtención de vesículas de la membrana plasmática.

5. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática

5.1. Obtención de la fracción microsomal

Las fracciones microsomales se obtuvieron a partir de hojas congeladas y homogeneizadas en N₂ líquido, siguiendo el protocolo de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial [Carmona-Salazar *et al*, 2011].

5.2. Obtención de vesículas de membrana plasmática

Se aislaron a partir de las fracciones microsomales utilizando un procedimiento de distribución de las membranas celulares en un sistema de fases de dos polímeros acuosos (polietilenglicol y dextrán) de acuerdo con Carmona-Salazar *et al* [2011].

6. Determinación de la proteína por el método de Lowry

La concentración de proteína en una muestra se realizó mediante un ensayo colorimétrico, utilizando una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/ml, desarrollando una reacción de color y midiendo la absorbancia a 750 nm [Peterson, 1977].

7. Determinación de fosfato inorgánico

Se realizó en tubos de ensayo previamente lavados con Extran y tratados con ácido sulfúrico. Para la realización de la curva patrón, inicialmente se añadieron de 10 a 60 μL de solución estándar 1 mM de K_2PO_4 , llevándolos a un volumen final de 150 μL con agua bidestilada, posteriormente se añadieron 150 μL de solución A (SDS 24 %) y 300 μL de solución B/C (molibdato de amonio 2 % y ácido ascórbico 2 %, ambos en HCl 1N en relación 1:1, v/v). La mezcla se incubó de 3 a 7 min a temperatura ambiente y se añaden 450 μL de reactivo E (citrato de sodio 2 %, metarsenito de sodio 2 % y de ácido acético 2 %, todo disuelto en agua bidestilada). Se incubó por 20 min para el desarrollo y estabilización del color y se leyó su absorbancia a 850 nm [González-Romo *et al*, 1992].

8. Determinación de hidrólisis de ATP

Tanto los tubos de ensayo como el recipiente con el medio de hidrólisis de ATP se mantuvieron en hielo. Para la preparación del medio de hidrólisis se mezclaron los siguientes componentes a concentraciones finales de: 250 mM de sacarosa/PIPES 20 mM ajustado a pH 6.5 con BTP (Bis-Tris-Propano), 7 μM CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona), 0.015 % Brij 58 (v/v), 10 mM MgCl_2 y 10 mM de ATP (adenosín trifosfato) a pH 6.5. Se colocaron tres tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis total (HT), hidrólisis química (HQ) e hidrólisis en presencia de inhibidores. En el último caso, el medio se suplementó con inhibidores de diferentes enzimas que hidrolizan ATP y que pudieran estar en la muestra membranal (si se usa Na_2VO_4 se utiliza una concentración final de 200 μM ; si se usa la mezcla de inhibidores NaN_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y KNO_3 , las concentraciones finales son de 2 mM, 2 mM y 50 mM, respectivamente). El volumen final en todos los tubos fue de 150 μL [Sánchez-Nieto *et al*, 1997].

La reacción se inició con la adición de 4 μg , se agitó manualmente por unos cuantos segundos y se colocó el tubo en una gradilla dentro de un baño María a 29 °C por 20 min. Se llevó a cabo el mismo procedimiento con todos los tubos que contienen medio de hidrólisis con o sin inhibidores. En el caso de la determinación de hidrólisis química sólo se adicionaron 150 μL del medio de hidrólisis en cada tubo y se colocó en una gradilla en las mismas condiciones que los demás tubos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación a 29 °C, a cada tubo se les adicionaron directamente cuando aún se encuentran en el baño María, 150 μL de SDS 24% e inmediatamente se agitaron con ayuda del vórtex y se transfirieron a un baño de hielo

[Sánchez-Nieto *et al*, 1997]. El Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP se determinó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Paralelamente al ensayo de hidrólisis de ATP se realizó una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico.

9. Determinación de la actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato para el análisis cinético

Tanto los tubos de ensayo como el recipiente contenedor del medio de hidrólisis de ATP se mantienen en hielo. Se prepararon 2 diferentes medios de hidrólisis en 2 tubos de ensayo independientes, uno con ATP/Mg²⁺ y otro sin éste. Para el primer medio de hidrólisis (MH) se mezclaron los siguientes componentes a concentraciones finales de: 250 mM de sacarosa/PIPES 20 mM ajustado a pH 6.5 con BTP, 7 µM CCCP, 0.015 % Brij 58 (v/v), 2 mM NaN₃, 2 mM Na₂MoO₄·H₂O, 50 mM KNO₃, 10 mM MgCl₂ y 10 mM de ATP a pH 6.5. Para el segundo medio de hidrólisis sin ATP/Mg²⁺ (MH-ATP) se mezclaron los siguientes componentes a concentraciones finales de: 250 mM de sacarosa/PIPES 20 mM ajustado a pH 6.5 con BTP, 7 µM CCCP, 0.015 % Brij 58 (v/v), 2 mM NaN₃, 2 mM Na₂MoO₄·H₂O y 50 mM KNO₃ [Sánchez-Nieto *et al*, 1997]. Se prepararon los medios de hidrólisis correspondiente al número de ensayos a realizar, tomando en cuenta que con este medio igual se realizará un ensayo de hidrólisis química. Se etiquetaron tubos con letras de la A a la M, y a estos se les añadieron las cantidades de MH y MH-ATP indicadas en la Tabla 2, para obtener las diferentes concentraciones del sustrato en un volumen final de 150 µL. Las concentraciones mostradas en la Tabla 2 son las concentraciones añadidas, sin embargo, las concentraciones reales del sustrato ATPMg, según el pH del medio y tomando en cuenta las constantes de asociación, se muestran en el Apéndice 2.

La reacción se inició con la adición de 4 µg de proteína al primer tubo con medio de hidrólisis, se agitó manualmente por unos cuantos segundos y se colocó en un baño María a 29 °C por 20 min. En el caso de la determinación de hidrólisis química, los tubos de la A a la M únicamente se colocaron en baño María a 29 °C por 20 min [Sánchez-Nieto *et al*, 1997].

Tabla 2. Volumen de MH y MH-ATP para obtener la concentración deseada de ATP/Mg²⁺ para el ensayo de saturación de la ATPasa.

	Conc ATP/Mg ²⁺ (1:1)	MH	MH-ATP
TUBO	mM	μL	μL
A	0	0	150
B	0.1	1.25	148.75
C	0.2	2.5	147.5
D	0.4	5	145
E	0.6	7.5	142.5
F	0.8	10	140
G	1	12.5	137.5
H	2	25	125
I	4	50	100
J	6	75	75
K	8	100	50
L	10	125	25
M	12	150	0
	TOTAL	563.75	1386.25

Una vez finalizado el tiempo de incubación a 29°C, a cada tubo se les adicionaron directamente cuando aún se encontraban en el baño María, 150 μL de SDS 24 % e inmediatamente se agitaron con ayuda del vórtex y se transfirieron a un baño de hielo. El Pi liberado en la reacción de hidrólisis de ATP se determinó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Paralelamente al ensayo de hidrólisis de ATP se realizó una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico.

10. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Las proteínas de las vesículas de membrana plasmática fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS de acuerdo con el método descrito por Schagger y Von Jagow (1987) como se describe a continuación.

- I. Se limpiaron los vidrios utilizados para el gel con SDS 10% o alcohol.
- II. Se colocaron las placas de vidrio del lado del separador y se montaron con cuidado en el soporte, comprobando ausencia de fugas con un poco de agua bidestilada. Se retiró el agua y se secó el interior con ayuda de papel filtro.
- III. Preparación del gel separador. Se mezclaron en un vaso de precipitados los reactivos siguientes en el orden descrito a continuación.
 - a) 1632 μL de acrilamida-bis acrilamida (10-0.3 %)

- b) 1632 μL de amortiguador del gel (Tris 3 M –SDS 0.3 %, pH 8.9)
- c) 660 μL de glicerol
- d) 991 μL de H_2O desionizada
- e) 25 μL de persulfato de amonio 10 %
- f) 2 μL de TEMED (tetrametiletildiamina)

Inmediatamente se vertió la mezcla en el espacio entre las dos placas. Una vez lleno el espacio, se colocó un poco de SDS al 0.3 % sobre el gel para evitar un borde cóncavo y se dejó polimerizar por aproximadamente 30 min.

- IV. Una vez polimerizado, se desechó el SDS y se enjuagó con agua. Se secó con ayuda de papel filtro.
- V. Preparación del gel concentrador. Se mezclaron los siguientes reactivos en el siguiente orden:
 - a) 264 μL de acrilamida-bis acrilamida (10-0.3%)
 - b) 496 μL de amortiguador del gel (Tris 3 M –SDS 0.3 %, pH 8.9)
 - c) 1221 μL de H_2O desionizada
 - d) 25 μL de persulfato de amonio 10%
 - e) 2 μL de TEMED (tetrametiletildiamina)
- VI. Se agregó un poco del gel concentrador encima del gel separador y se colocó el peine de 15 pozos introduciendo casi hasta el final del peine.
- VII. Se dejó polimerizar entre 45 min y 1 h a temperatura ambiente, asegurándose que la cantidad de gel concentrador llegara al borde de las placas.
- VIII. Una vez polimerizado se retiró el peine cuidadosamente para no dañar los carriles.
- IX. Se fijó el gel ensamblado entre las placas de vidrio en el soporte de la cámara de electroforesis.
- X. Se colocó el amortiguador del cátodo (Apéndice 3) en el interior casi hasta arriba de las placas de vidrio.
- XI. Se cargó un marcador de pesos moleculares comercial en el pozo del extremo izquierdo y posteriormente se cargaron las muestras, cuidando que contuvieran cantidades iguales de proteína y volúmenes similares, el cual fue ajustado buffer de ajuste de peso.

- XII. Se colocó el amortiguador del ánodo (Apéndice 3) dentro de la cámara hasta cubrir la mitad de los tornillos inferiores.
- XIII. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis cuidando de hacer coincidir los extremos del cátodo y ánodo. Se conectó a la fuente de poder y se aplicó corriente de 50 V por aproximadamente 30 min (tiempo requerido para que las proteínas se alineen en el gel concentrador) y posteriormente de 100 V por 2 a 3 h.

11. Tinción de geles con azul de Coomassie

Después de la separación de proteínas por electroforesis se colocó el gel en solución fijadora (Apéndice 4) asegurando de que se cubriera completamente y manteniéndose en agitación constante por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se tiñó con solución azul de Coomassie (Apéndice 4) por 30 min con agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se colocó en solución desteñidora (Apéndice 4) manteniéndose en agitación constante hasta que las bandas de proteínas fueron evidentes. El gel se almacenó en una solución de glicerol al 5 % [Schagger y Von Jagow, 1987].

12. Secado de geles

Los geles teñidos se digitalizaron y posteriormente se secaron para preservarlos. Para ello, el gel se colocó sobre una hoja de papel absorbente 3M y se cubrió con papel celofán previamente humedecido que se alisó para eliminar burbujas y se colocó en el equipo GEL DRYER (modelo 583 Bio-Rad) durante 2 h a 80 °C.

13. Detección de proteínas por Inmunodetección

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a una membrana de PVDF como se describe a continuación.

- I. El gel sin fijar ni teñir, se mantuvo en solución amortiguadora de transferencia (Apéndice 5) de 15-30 min a temperatura ambiente y agitación constante.
- II. El gel se colocó en un casete plástico conteniendo en orden ascendente: una esponja, una hoja de papel filtro, el gel, una hoja de membrana PVDF, otra hoja de papel filtro y otra esponja. Tanto el papel filtro como las esponjas fueron previamente humedecidas con solución amortiguadora de transferencia y la membrana PVDF fue humedecida con metanol y el mismo amortiguador de transferencia.

- III. El casete se colocó en la cámara de electrotransferencia conteniendo suficiente solución amortiguadora de transferencia para cubrirlo y de tal manera que el gel quedara orientado hacia el cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo.
- IV. La electrotransferencia de proteínas a la membrana se realizó a 22 volts por 150 min; entonces la membrana de PVDF se sometió a un lavado rápido con H₂O desionizada, se le añadieron 4 mL del primer reactivo del sistema Western Blot Signal Enhancer (Pierce®), que se dejó actuar por 2 min, se realizaron 5 lavados consecutivos rápidos con H₂O desionizada, se añadieron 4 mL del segundo reactivo del sistema Western Blot Signal Enhancer Pierce®, que se dejó actuar por 10 min para finalizar con 5 lavados rápidos con H₂O desionizada.
- V. La inmunodetección se realizó con el siguiente procedimiento:
 - a) Bloqueo: Se colocó la membrana en solución bloqueadora (Apéndice 5) por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados, uno con TTBS (Apéndice 5) en agitación rotatoria por 5 min y otro con TBS (Apéndice 5) por 10 min.
 - b) Primer anticuerpo (Apéndice 5): La membrana se colocó en una bolsa que contenía el primer anticuerpo, donde se mantuvo durante toda la noche a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se repitió la secuencia de lavados del paso de bloqueo.
 - c) Segundo anticuerpo (Apéndice 5): La membrana se colocó en una solución que contenía el segundo anticuerpo donde se incubó por 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados, tres con TTBS en agitación rotatoria por 10 min y uno con TBS por 10 min.
 - d) Revelado: Se añadió la mezcla para desarrollar color (Apéndice 5) y en cuanto las bandas se hicieron visibles, se retiró la solución y se añadió agua bidestilada para detener la reacción.

14. Determinación de la composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática

Vesículas de membrana plasmática de plantas de *Arabidopsis* de los genotipos tipo silvestre y mutante *mpk3* no aclimatadas y aclimatadas fueron procesadas para extracción,

separación, identificación y cuantificación de esfingolípidos membranales por cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS, de acuerdo con el protocolo descrito por Markham y Jaworski (2006).

15. Proteólisis controlada de vesículas de membrana

Los tubos para el ensayo se mantuvieron todo el tiempo en hielo. En un tubo para PCR se colocó el medio de proteólisis correspondiente al número de ensayos que se realizaron más un exceso. La composición del medio en concentraciones finales fue: 5 mM de EDTA-BTP a pH = 8, 2 mM de ATP, 250 mM de sacarosa, 1.175 mg/mL de Brij 58, 25 mM de MOPS-BTP a pH = 8. A los tubos de reacción se les añadieron 4 μ L de una solución de tripsina a una concentración de 1 μ g/ μ L y la reacción se inició con la adición de la proteína, colocando el tubo un baño de agua a 29 °C. A los 0 y 40 min se tomaron alícuotas correspondiente a 50 μ g de proteína que se colocaron en un tubo para PCR que contenía el volumen necesario de inhibidor de tripsina de soya a una concentración final de 800 μ g/mL y se colocaron en hielo. En cada muestra se determinó la hidrólisis de ATP y se procedió a la preparación de geles de acrilamida-SDS [Sánchez-Nieto *et al*, 1997].

16. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó un mínimo de 4 veces con al menos 3 preparaciones membranales independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa Excel 2010, con la función de promedio, error estándar y análisis de varianza de un factor que fue calculado para determinar diferencias significativas en 2 muestras, con un valor de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Con el propósito de determinar si el transductor MPK3 está involucrado en la respuesta a frío en la planta *A. thaliana*, se compararon las respuestas ante este tipo de estrés de plantas tipo silvestre con las de las plantas mutantes (*mpk3*) con pérdida de función de esta enzima (línea SALK_100651). Para documentar el fenotipo de la respuesta a frío se utilizaron plantas de 10-12 semanas de edad.

1. Determinación del efecto de la aclimatación en el fenotipo de plantas que no expresan el gen *MPK3*

Se analizaron plantas tipo silvestre y *mpk3* sometidas a 22 y 4 °C. Para ello, las plantas se crecieron en macetas por 8-10 semanas a 22 °C. Posteriormente, se colocaron en condiciones de aclimatación (AC) a frío (4 °C) o se mantuvieron en condiciones de no aclimatación (NA) (22 °C) por una semana más. Después de la semana en tales condiciones, se tomó un registro fotográfico de las plantas (Fig. 8A) y las plantas se sometieron a un tratamiento de congelación (-15 °C por 80 min), recuperación rápida (4 °C por 40 min) y recuperación a 22 °C por una semana. Después de esta semana se volvió a hacer un registro fotográfico, para evaluar la eficiencia de la aclimatación, estimada por su capacidad de sobrevivencia al congelamiento (Fig. 8A).

El fenotipo mostró que las plantas wt NA no resistieron el tratamiento de congelación a -15 °C, lo cual se reflejó por una menor sobrevivencia que la de plantas wt AC (Fig. 8B). Puesto que el tratamiento de aclimatación triplicó la sobrevivencia de plantas tipo silvestre en comparación con las NA, puede concluirse que la AC les confirió la capacidad de sobrevivir a temperaturas congelantes.

De manera similar a las plantas tipo silvestre NA, las plantas *mpk3* NA tampoco fueron capaces de sobrevivir al congelamiento (Fig. 8A). Sin embargo, en las plantas *mpk3* sometidas a AC se encontró que este tratamiento mejoró su sobrevivencia hasta cuatro veces respecto a las plantas no aclimatadas (Fig. 8B).

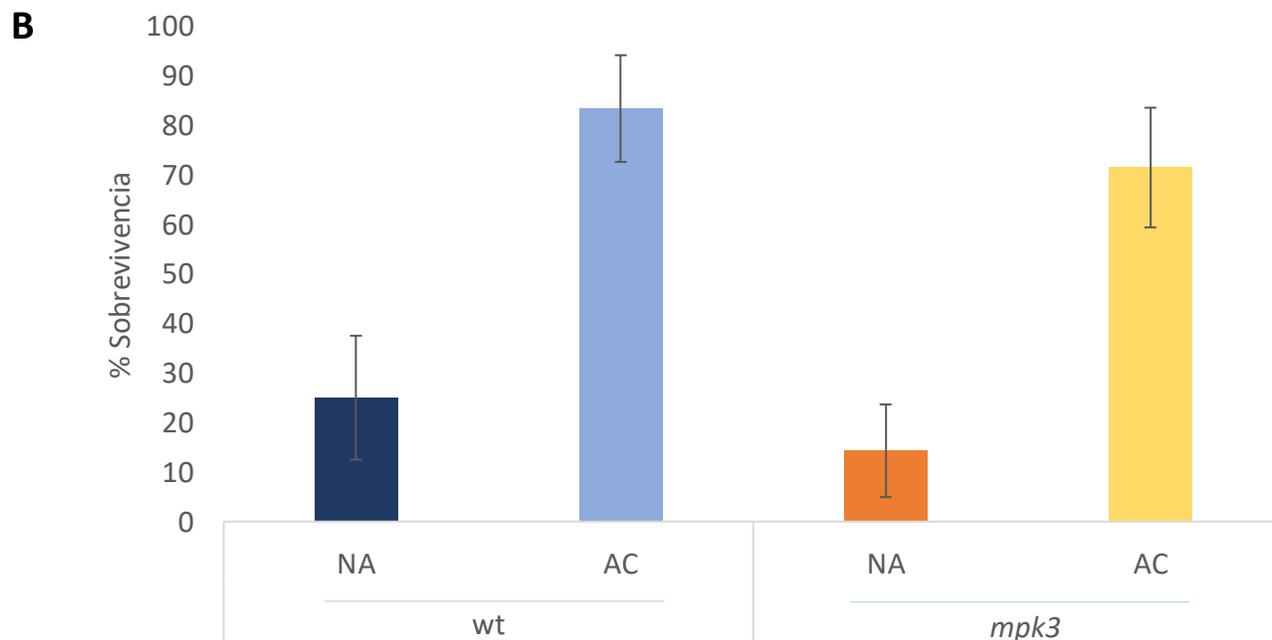
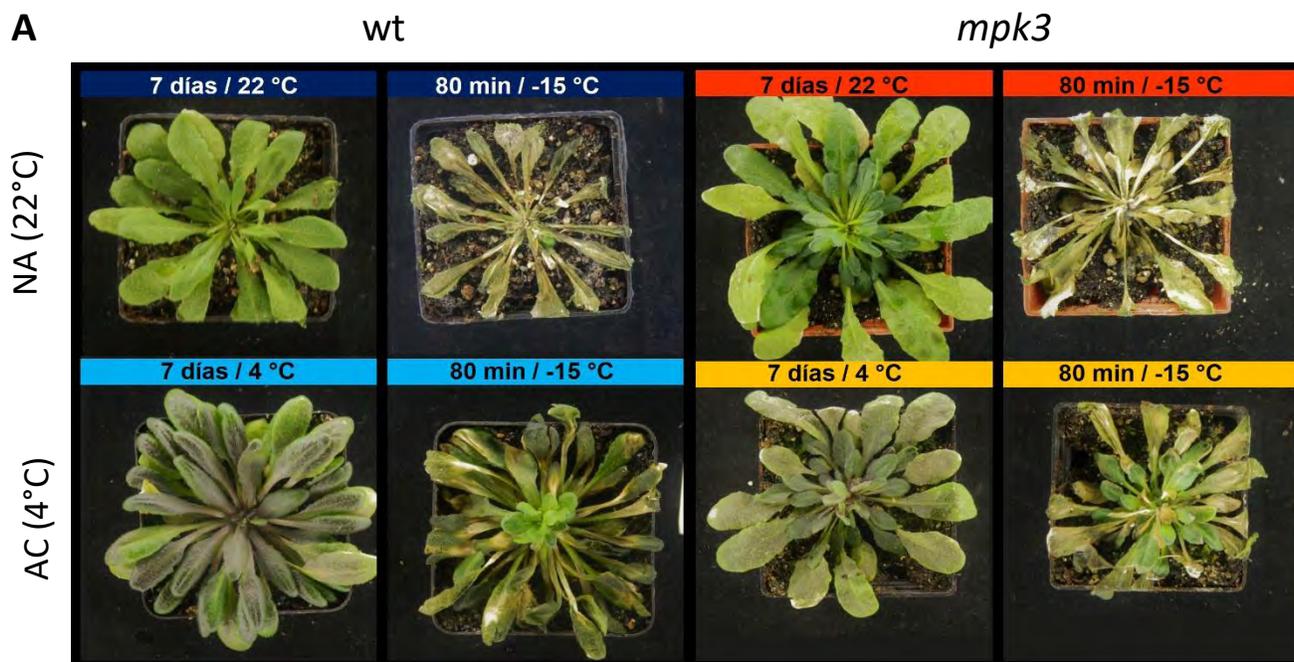


Fig. 8. Efecto de la aclimatación a bajas temperaturas de las plantas wt (azul) y *mpk3* (naranja). A. Fenotipos de plantas no aclimatadas (NA, color obscuro) y aclimatadas (AC, color claro) antes y después del reto a temperaturas congelantes (fotografías representativas de wt n=12 y *mpk3* n=14). B. Sobrevivencia de las plantas una semana después del congelamiento (wt n=12 y *mpk3* n=14).

2. Efecto de la aclimatación en la actividad de ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática

Experimentos anteriores de medición de la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas purificadas de membrana plasmática demostraron que la aclimatación previa de plantas tipo silvestre provoca una disminución de la actividad de ATPasa [Peña-Moral, 2015].

Experimentos de este tipo se realizaron nuevamente sobre membranas de plantas wt y de la línea *mpk3*, tanto en condiciones de NA como de previa AC. En la Fig. 9 se muestra la actividad de hidrólisis de ATP de vesículas de membrana plasmática de ambos genotipos de plantas sometidas a los tratamientos descritos.

Se observó que en las vesículas de membrana plasmática de plantas tipo silvestre NA la actividad fue de 106 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹. En cambio, en las plantas tipo silvestre AC, esta actividad disminuyó un 30 % (68 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹), lo que corroboró los resultados previamente reportados [Peña-Moral, 2015].

Por su parte, en las vesículas de membrana plasmática de plantas que no expresan el gen *MPK3* NA se observó un aumento del 50 % (149 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹) de la actividad en relación con la de las plantas tipo silvestre no aclimatadas, mientras la actividad en vesículas de membrana plasmática de las plantas *mpk3* aclimatadas disminuyó, siendo esta disminución mayor que la observada en las plantas tipo silvestre aclimatadas y – 60 % en comparación con el control NA (51 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹).

Un análisis estadístico de ANOVA de las actividades de ATPasa demostró que las diferencias entre los valores de actividad de ATPasa de H⁺ entre las plantas tipo silvestre y *mpk3* no aclimatadas o aclimatadas son significativas.

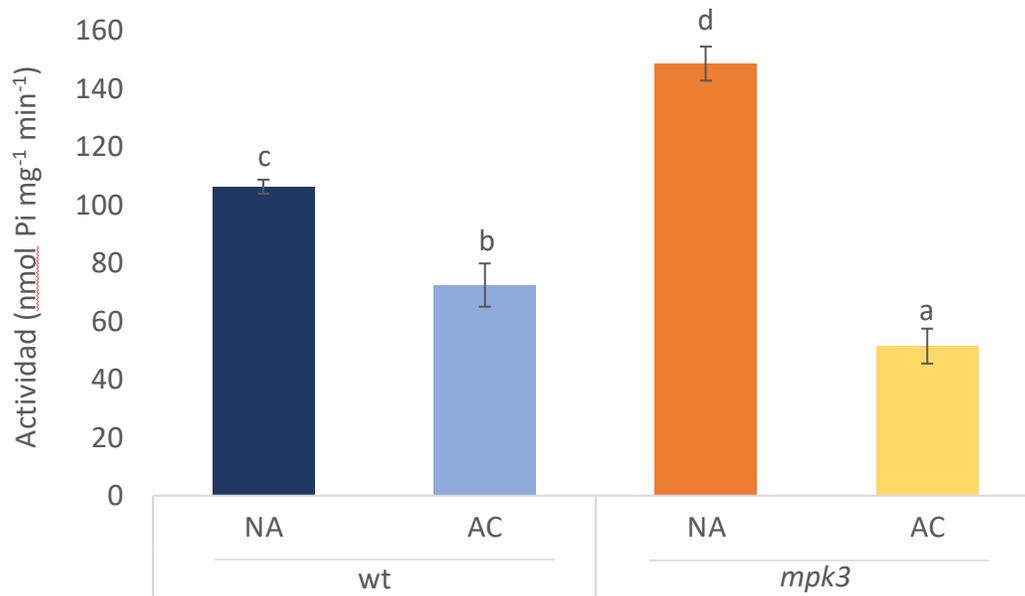


Fig. 9. Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP en las plantas wt y *mpk3* en condiciones de aclimatación (AC) y no aclimatación (NA). Se determinó la hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de las plantas de los dos genotipos a 29 °C y durante 20 min de reacción. Se presentan los valores promedio \pm EE correspondientes a seis determinaciones llevadas a cabo con tres preparaciones membranales independientes. Los datos fueron procesados con el programa Excel 2010, aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Diferentes letras indican valores promedio de actividad de hidrólisis de ATP significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

3. Determinación de la cinética de hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática

Con el objetivo de obtener más información sobre las diferencias en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática descritas, se determinaron las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis de ATP.

En la Fig. 10 se muestran las gráficas que describen el comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de ATP llevadas a cabo por la ATPasa de H⁺ de membranas plasmáticas purificadas de ambos genotipos en condiciones de NA y AC. Los datos experimentales fueron sometidos al ajuste descrito por la ecuación de Michaelis-Menten [Michaelis y Menten, 1913], ya que se había demostrado previamente un patrón michaeliano en las plantas silvestres NA [González-Reyes, 2010; Ponce-Pineda, 2016] (Fig. 10A). Además, los datos se ajustaron a la ecuación de Hill [Hill, 1910], ya que en la literatura existe evidencia de que la ATPasa puede presentar una cinética de cooperatividad en ciertas condiciones dependientes del ambiente lipídico [Sánchez-Nieto *et al*, 2011] (Fig. 10B). Se observó un buen ajuste de los puntos tanto para la ecuación de Michaelis-Menten

($\chi^2 = 33.48$) como para la ecuación de Hill [Hill, 1910] ($\chi^2 = 58.74$). Lo anterior concordó con las constantes catalíticas calculadas, pues se obtuvieron números de Hill (n) iguales a 1, lo que indica que la enzima no presentaba cooperatividad, con lo que quedó claro que la enzima presentaba un comportamiento michaeliano en las vesículas membranales de las plantas silvestres y de las *mpk3* en condiciones de NA y AC (Tabla 3).

Tabla 3. Constantes catalíticas de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Parámetro cinético		Genotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>			
		Wt		<i>mpk3</i>	
		NA	AC	NA	AC
Michaelis-Menten	V_{max} (nmolPi mg ⁻¹ min ⁻¹)	127.16 ± 5.19	88.76 ± 4.88	157.12 ± 5.50	62.74 ± 7.26
	K_m (mM)	1.15 ± 0.16	0.89 ± 0.17	1.28 ± 0.15	1.92 ± 0.68
	V_{max}/K_s (s ⁻¹)	1.84x10 ³ ± 540	1.66x10 ³ ± 478	2.04x10 ³ ± 610	5.4x10 ² ± 178
Hill	V_{max} (nmolPi mg ⁻¹ min ⁻¹)	121.98 ± 10.38	89.48 ± 11.30	144.75 ± 9.95	58.88 ± 18.39
	K' (mM)	1.05 ± 0.28	1.02 ± 0.4	1.04 ± 0.23	1.59 ± 0.96
	V_{max}/K' (s ⁻¹)	1.94x10 ³ ± 618	1.46x10 ³ ± 471	2.32x10 ³ ± 721	6.16x10 ² ± 319
	N	1.12 ± 0.21	1.05 ± 0.28	1.15 ± 0.18	0.97 ± 0.44

Se muestran datos de los genotipos tipo silvestre y *mpk3* en condiciones de no aclimatación (NA) y de aclimatación (AC). Las constantes se calcularon a partir de los valores de las gráficas de la Fig. 10, ajustándose a la ecuación de Michaelis-Menten y a la ecuación de Hill con el programa Origin 5.0 Data Analysis and Graphing Software®. Se muestran los promedios ± DE (n=6).

Los ajustes se llevaron a cabo en el programa Origin 5.0 Data Analysis and Graphing Software®, mostrándose los resultados en la Tabla 3. De las gráficas ajustadas al modelo de Michaelis-Menten se obtuvieron los valores de V_{max} , K_m y V_{max}/K_m . De las gráficas ajustadas al modelo de Hill se obtuvieron los valores de V_{max} , K' , V_{max}/K' y el número de Hill (n). La mayor diferencia se observó en los valores de V_{max} , en los que se encontró que la planta *mpk3* no aclimatada tiene el mayor valor (157.12 ± 5.50 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹), el cual coincidió con la actividad obtenida previamente (Fig. 9), resultando mayor al de la V_{max} obtenida para las plantas tipo silvestre no aclimatadas (127.16 ± 5.19 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹). La condición de aclimatación disminuyó la V_{max} para ambos genotipos, sugiriendo que esta condición tiene un efecto en la conformación o en la cantidad de la enzima.

No se encontraron cambios significativos entre las K_m , sin embargo, se encontró que la eficiencia catalítica decreció únicamente en la enzima de la planta *mpk3* AC, lo cual se puede asociar a la menor actividad observada en esta condición.

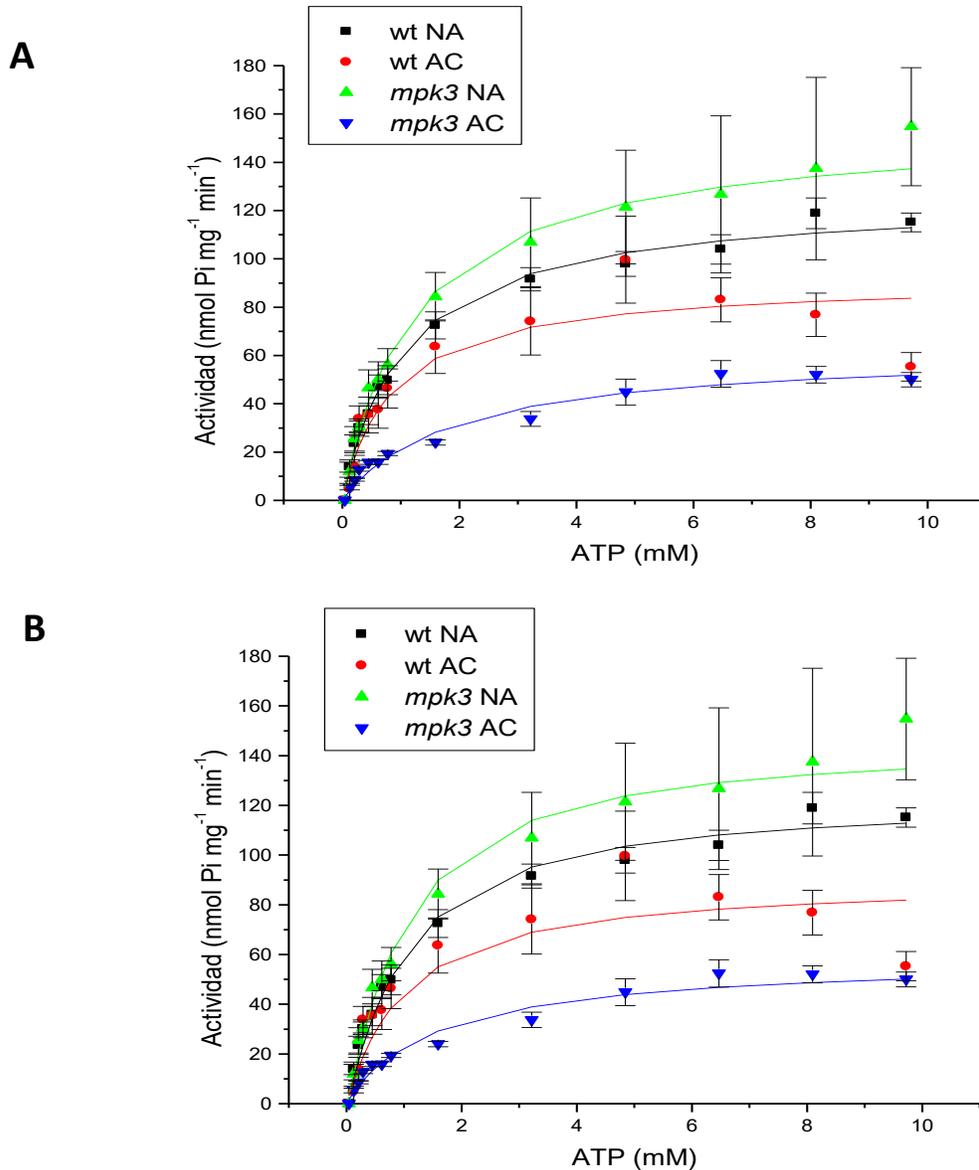


Fig 10. Comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de las plantas de los genotipos tipo silvestre en condiciones de NA, tipo silvestre en AC, *mpk3* en NA y *mpk3* en AC. Los valores experimentales fueron sometidos a dos tipos de ajustes: A) ajuste hiperbólico (modelo de Michaelis-Menten) y B) ajuste sigmoideal (modelo de Hill). Se determinó la actividad de ATPasa a las concentraciones de sustrato indicadas, por un tiempo de 20 min y a una temperatura de 29 °C. Tipo silvestre NA (negro), tipo silvestre AC (rojo), *mpk3* NA (verde) y *mpk3* AC (azul). Los ajustes se realizaron con el programa Origin 5.0 Data Analysis and Graphing Software®.

4. Estimación de los niveles de ATPasa de H⁺ de vesículas de membrana plasmática

Ya que los valores de actividad y de velocidad máxima en las plantas tipo silvestre y *mpk3*, tanto en condiciones de no aclimatación como de aclimatación fueron diferentes, se exploró la posibilidad de que estas diferencias se debieran a cambios en la cantidad de ATPasa presente en las vesículas de membrana plasmática. Por ello, se realizó una inmunodetección de los niveles endógenos de ATPasa de H⁺ presente en las vesículas de membrana plasmática de todas las condiciones.

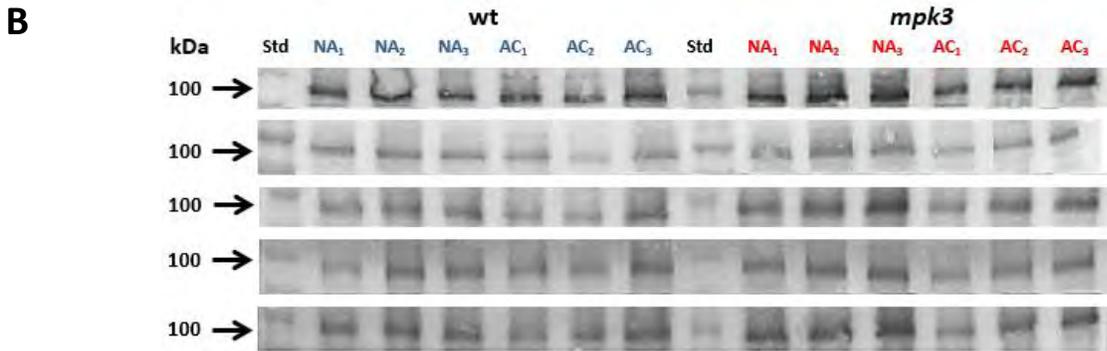
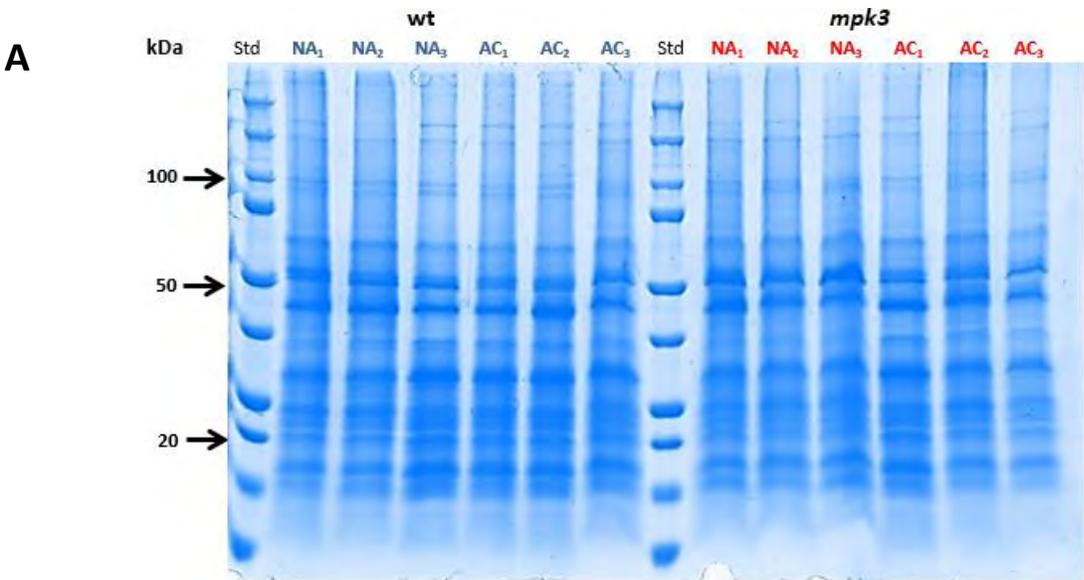
Lo primero que se realizó fue la separación de las proteínas membranales de las muestras utilizadas para medir la actividad de la ATPasa en geles de SDS-PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie.

La concentración de proteína incluida en los geles se calcula teóricamente, pero como frecuentemente se detectan diferencias en una primera separación electroforética, se ajustaron experimentalmente los volúmenes de muestra necesarios para lograr que la proteína total cargada fuera muy similar en todos los carriles (Fig. 11A). Posteriormente, el gel con las muestras homogenizadas se transfirió a una membrana de PVDF sobre la que se realizó una inmunodetección de la ATPasa de H⁺ para estimar su concentración en las diferentes muestras.

En la Fig. 11B se presentan cinco réplicas de tres diferentes preparaciones membranales independientes, las cuales fueron inmunotratadas con un anticuerpo homólogo comercial contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Al extremo izquierdo de las membranas se señala la banda con peso molecular de aproximadamente 100 kDa, correspondiente a la masa molecular reportada para la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Para realizar una estimación más precisa de los niveles de ATPasa presentes en las vesículas de membrana plasmática, se realizó una densitometría de las bandas normalizada contra la densidad de la banda 65 kDa del gel teñido con azul de Coomassie. La gráfica mostrada en la Fig. 11C, presenta los promedios de los valores de densidad de las bandas de cada muestra y las de sus réplicas ya normalizadas.

Las tres muestras biológicas de las plantas wt NA, wt AC y *mpk3* AC, no presentaron diferencias en la cantidad de proteína entre sí. Entre estas tres condiciones experimentales tampoco se presentaron cambios en los niveles de ATPasa. Sin embargo, en las preparaciones membranales de la mutante *mpk3* NA, sí se encontró una mayor cantidad de ATPasa de H⁺ en comparación con las demás condiciones. Este incremento sí podría

contribuir a explicar el aumento de actividad de ATPasa en la planta *mpk3* NA. Sin embargo, la diferencia de actividades de ATPasa de las demás condiciones no se pudo explicar por diferencias en la cantidad de ATPasa detectada en esas muestras.



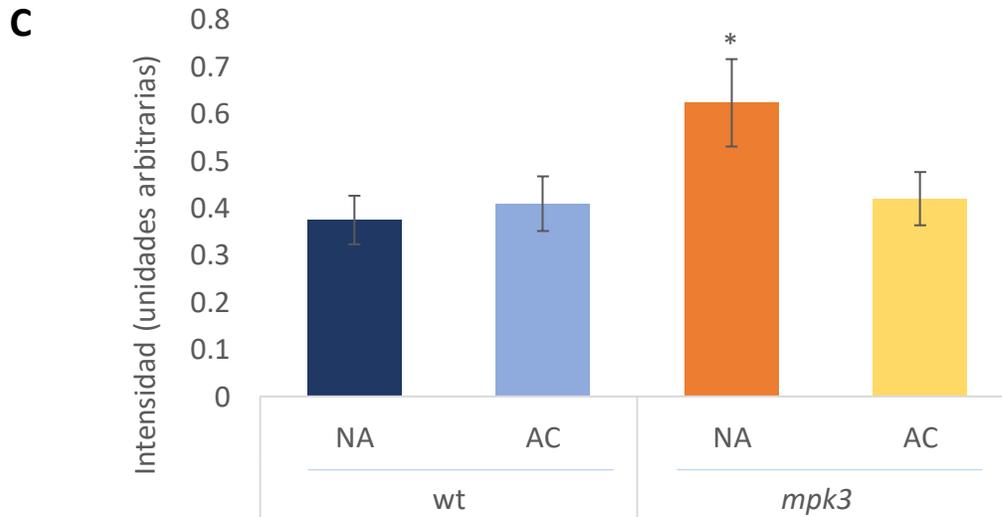


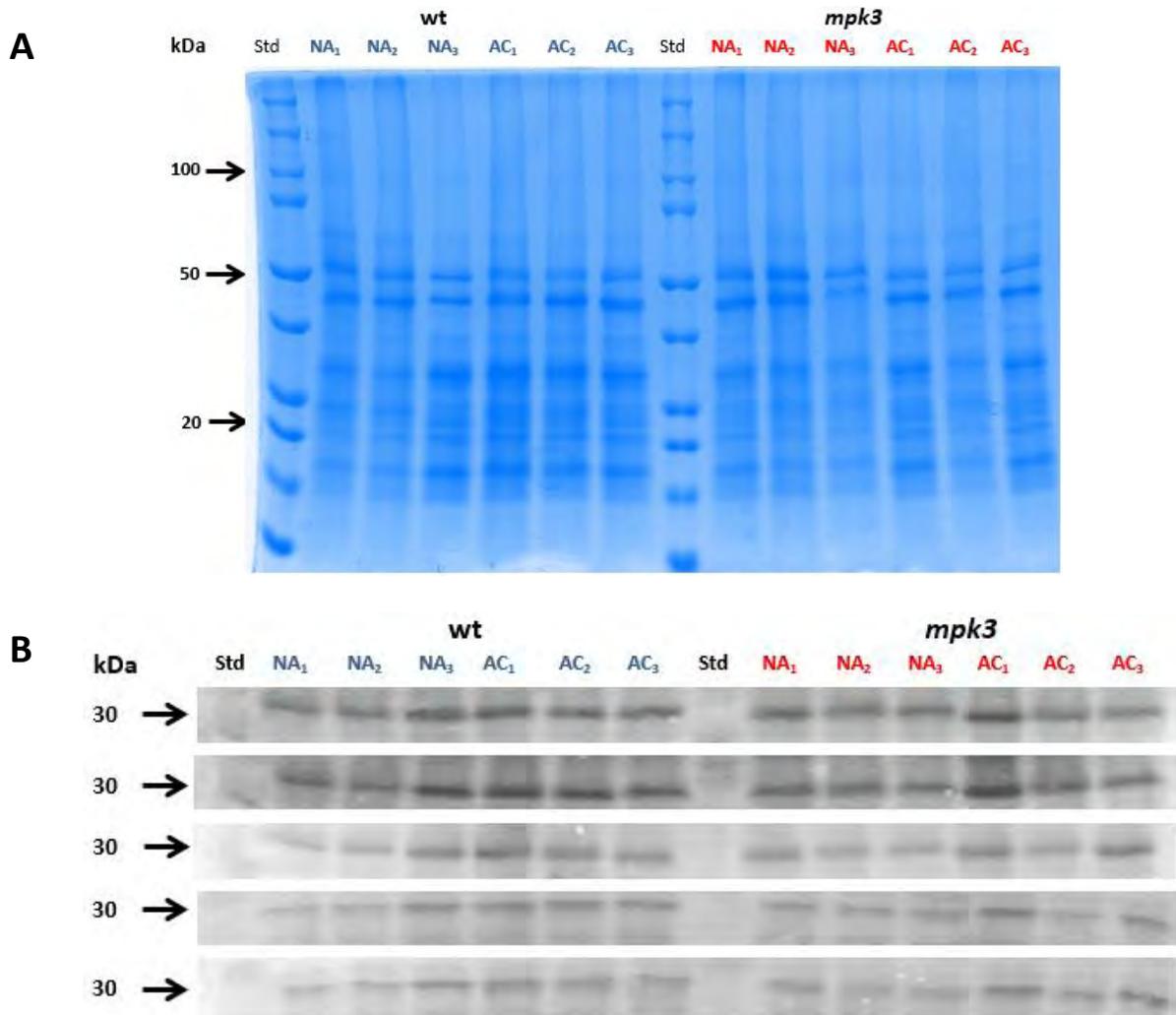
Fig 11. Separación electroforética de proteínas de VMP extraídas de plantas de los genotipos tipo silvestre y mutante *mpk3* en condiciones de aclimatación (AC) y de no aclimatación (NA). Se aplicaron 15 μ g de proteína membranar a cada uno de los carriles. El gel se replicó en una membrana de PVDF para estimar la cantidad de ATPasa de H^+ por inmunodetección. A. Se muestra el gel teñido con azul de Coomassie con proteínas totales de 3 preparaciones independientes. Los carriles corresponden a el estándar de pesos moleculares (Std), las seis preparaciones independientes de membranas plasmáticas de las plantas tipo silvestre no aclimatadas y aclimatadas (wt NA₁, NA₂, NA₃, AC₁, AC₂, AC₃) y las seis preparaciones independientes de membranas plasmáticas de las plantas mutantes no aclimatadas y aclimatadas (*mpk3* NA₁, NA₂, NA₃, AC₁, AC₂, AC₃). A la izquierda se indican las masas moleculares aproximadas de las bandas. B. Inmunodetección de los niveles de ATPasa de H^+ en 3 diferentes preparaciones membranales de plantas de los genotipos silvestre y mutante *mpk3* en condiciones de aclimatación y de no aclimatación. Se muestran 5 réplicas técnicas a partir de geles similares a los mostrados en el inciso A. C. Densitometría normalizada de las bandas correspondientes a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en las plantas wt y *mpk3* en condiciones de aclimatación (AC) y de no aclimatación (NA). Se presentan los valores promedio \pm EE correspondientes a la densidad de pixeles de quince bandas separadas en geles realizados a partir de tres preparaciones membranales independientes. El asterisco (*) representa una diferencia significativa según la prueba de análisis de varianza.

5. Niveles de la proteína 14-3-3 en las vesículas de membrana plasmática

Ya que la cantidad de ATPasa no explicó la diferencia en la actividad entre los genotipos wt y *mpk3* en condiciones de no aclimatación y de aclimatación, se decidió explorar los niveles de las proteínas 14-3-3 presentes en las vesículas de membrana plasmática mediante inmunodetección, ya que se ha reportado que una proteína 14-3-3 estabiliza la fosforilación de la treonina 947 de la ATPasa de H^+ , lo cual regula positivamente su actividad [Falhof *et al*, 2015].

En la Fig. 12A se muestra el patrón electroforético de las proteínas de cada una de las vesículas de membrana plasmática de tres preparaciones independientes de los genotipos wt y *mpk3* en condiciones de no aclimatación y de aclimatación. En el gel se observa que la cantidad de proteína cargada de cada una de las condiciones fue similar.

En la Fig. 12B se presentan las inmunodetecciones de una proteína 14-3-3 usando un anticuerpo contra una proteína 14-3-3 de *Arabidopsis*. En cada una de las cinco réplicas se aprecia la detección de una banda con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, que corresponde al peso molecular promedio reportado para la proteína 14-3-3- reguladora de la ATPasa de H⁺ [Fu *et al*, 2000]. Como se observa en las inmunoréplicas, la intensidad de la banda fue muy similar en las plantas tipo silvestre y *mpk3*, tanto NA como AC. La cuantificación de la densidad de las bandas de 30 kDa y la posterior normalización de estas con una banda de 50 kDa de una banda representativa del gel teñido con azul de Coomassie se muestra en la Fig. 12C. En todas las condiciones analizadas se encontraron valores estadísticos muy similares, lo cual sugiere que la proteína 14-3-3 parece no estar involucrada en las diferencias de actividad de ATPasa observadas en las plantas wt y *mpk3* en condiciones de NA y AC.



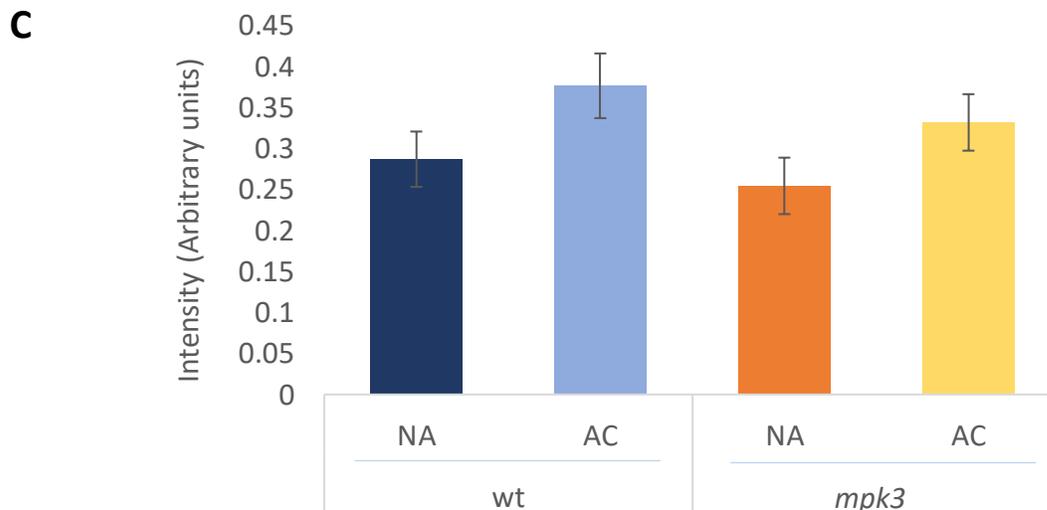


Fig 12. Separación electroforética de proteínas de VMP extraídas de plantas de los genotipos tipo silvestre y mutante *mpk3* en condiciones de aclimatación (AC) y de no aclimatación (NA). Se aplicaron 15 µg de proteína membranal a cada uno de los carriles. El gel se replicó en una membrana de PVDF para estimar la cantidad de ATPasa de H⁺ por inmunodetección. A. Se muestra el gel teñido con azul de Coomassie con proteínas totales de 3 preparaciones independientes. Los carriles corresponden el estándar de pesos moleculares (Std), las seis preparaciones independientes de membranas plasmáticas de las plantas tipo silvestre no aclimatadas y aclimatadas (wt NA₁, NA₂, NA₃, AC₁, AC₂, AC₃) y las seis preparaciones independientes de membranas plasmáticas de las plantas mutantes no aclimatadas y aclimatadas (*mpk3* NA₁, NA₂, NA₃, AC₁, AC₂, AC₃). Este gel se replicó en una membrana de PVDF para estimar la cantidad de proteína 14-3-3 por inmunodetección. Los carriles representan el estándar de pesos moleculares (Std), las seis preparaciones independientes de membranas plasmáticas de las plantas tipo silvestre no aclimatadas y aclimatadas (wt NA₁, NA₂, NA₃, AC₁, AC₂, AC₃) y las seis preparaciones independientes de membranas plasmáticas de las plantas mutantes no aclimatadas y aclimatadas (*mpk3* NA₁, NA₂, NA₃, AC₁, AC₂, AC₃). A la izquierda se indican las masas moleculares de las bandas. B. Inmunodetección de los niveles de proteína 14-3-3 en 3 diferentes preparaciones membranales de plantas de los genotipos tipo silvestre y mutante *mpk3* en condiciones de aclimatación (AC) y de no aclimatación (NA). Se muestran 5 réplicas técnicas a partir de geles similares al mostrado en el inciso A. C. Densitometría normalizada de las bandas correspondientes a la proteína 14-3-3 de la membrana plasmática en las plantas wt y *mpk3* en condiciones de aclimatación (AC) y de no aclimatación (NA). Se presentan los valores promedio ± EE correspondientes a la densidad de pixeles de quince bandas separadas en geles realizados a partir de tres preparaciones membranales independientes. No se encontraron diferencias según la prueba de análisis de varianza.

6. Esfingolipidómica de las vesículas de membrana plasmática

Como los niveles de proteína 14-3-3 tampoco sirvieron para explicar las diferencias de actividad de los genotipos tipo silvestre y mutante *mpk3* en las condiciones bajo estudio, se decidió explorar el nivel de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática, ya que se sabe que ciertas clases de esfingolípidos pueden regular la actividad de la ATPasa de H⁺ [Morales-Cedillo, 2014].

La composición y cuantificación de los esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática de ambos genotipos se determinó usando un protocolo que incluyó la extracción selectiva de esfingolípidos y su separación e identificación por HPLC en fase reversa

acoplada a ESI-MS/MS. Se hizo un análisis de los cuatro principales grupos de esfingolípidos de acuerdo con su grupo polar (glucosilceramidas, glicosil-inositolfosforilceramidas o GIPCs, ceramidas e hidroxiceramidas) y también se realizó un análisis de la porción apolar de cada uno de los esfingolípidos, es decir, de las nases de cadena larga (BCL) y el ácido graso respectivos. De estos, se analizaron los más abundantes y otros 10 ácidos grasos diferentes. En total se determinaron 160 especies de esfingolípidos en las membranas plasmáticas de las plantas tipo silvestre y de la mutante *mpk3*, en condiciones de NA y AC.

Como se muestra en la Fig. 13A, se encontró que en las vesículas de membrana plasmática de la mutante *mpk3* en condiciones de NA, el contenido de esfingolípidos totales fue tres veces mayor con el de los encontrados en el genotipo tipo silvestre.

De los esfingolípidos totales cuantificados se observó que las ceramidas y las glucosilceramidas no variaron en las cuatro fuentes de membranas plasmáticas (wt NA y AC y *mpk3* NA y AC). Las OH-ceramidas de las plantas AC de ambos genotipos experimentaron un aumento con respecto a las plantas NA. Y hubo un claro aumento en los niveles de GIPCs en la mutante *mpk3* NA. Esto último es muy interesante, pues se ha reportado que este tipo de esfingolípidos complejos regulan positivamente la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática [Morales-Cedillo, 2014]. Por lo tanto, las GIPCs podrían estar contribuyendo al aumento de actividad encontrado en las plantas *mpk3* NA (Fig. 13B). No obstante, la disminución de la actividad de ATPasa observada en las condiciones de AC para ambos genotipos podría verse asociada al aumento de OH-ceramidas en la membrana plasmática.

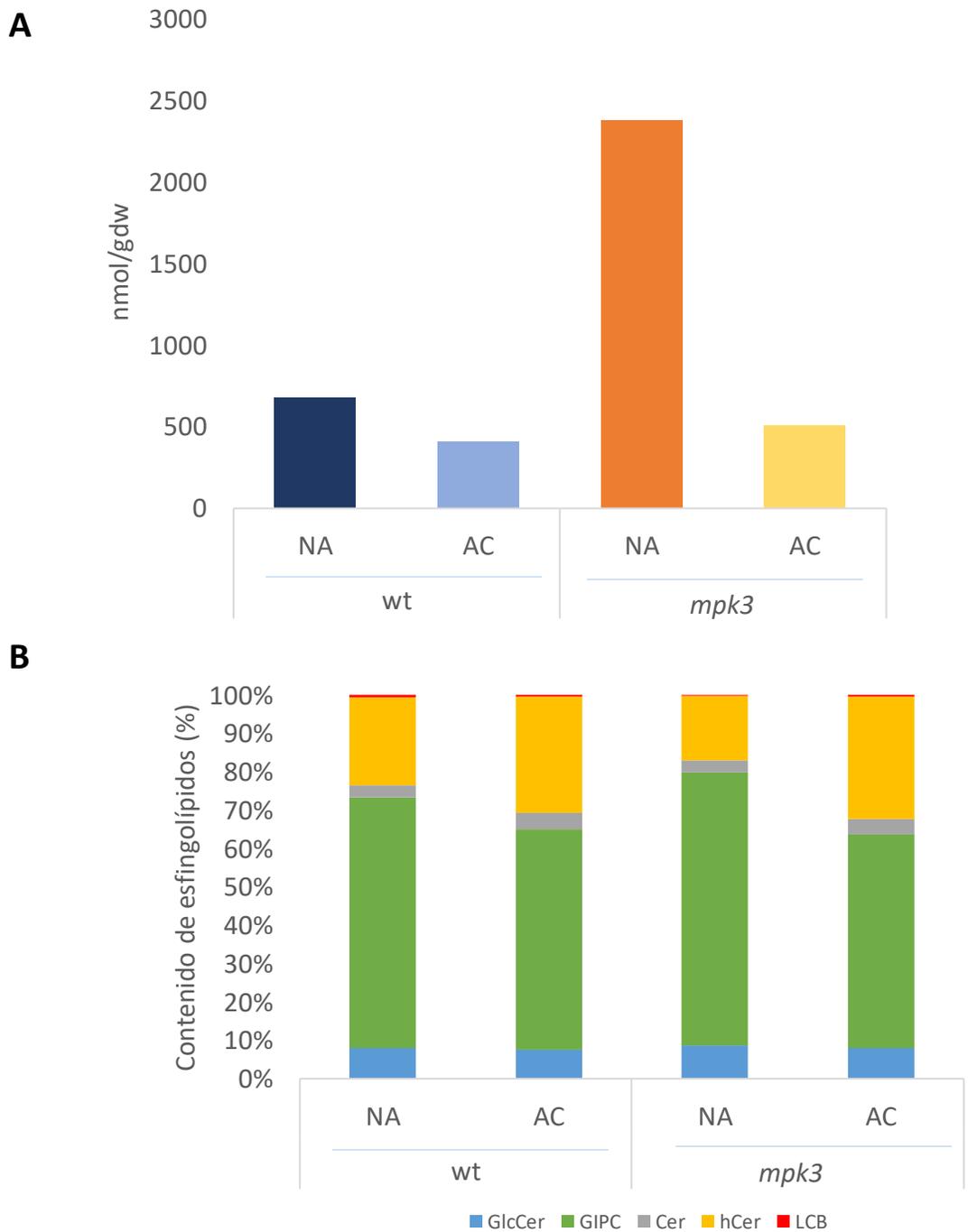
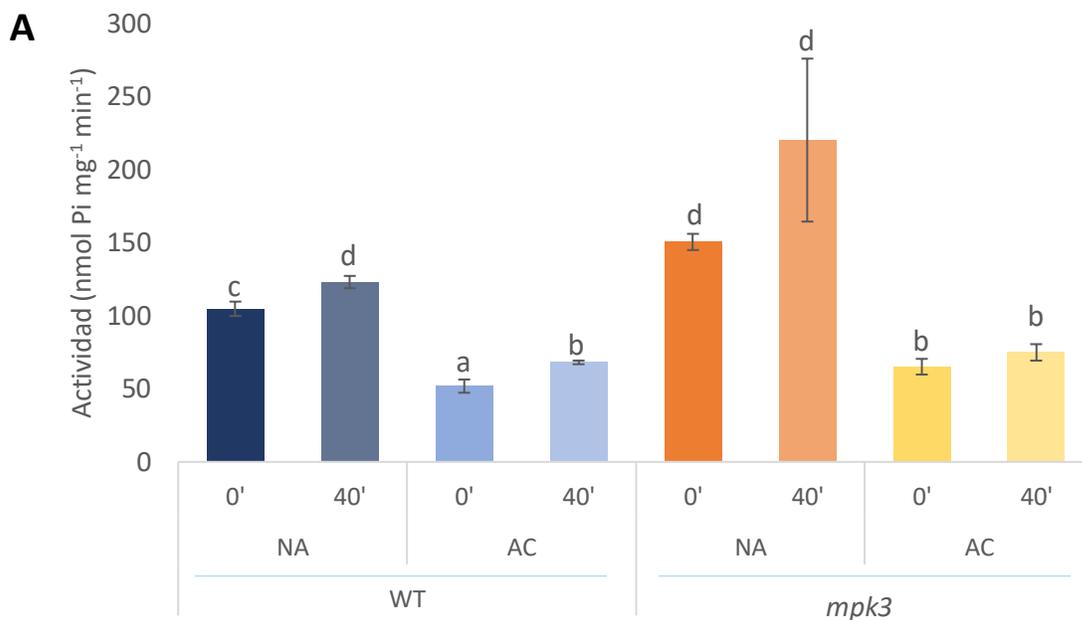


Fig 13. Determinación de la cantidad total de esfingolípidos complejos presentes en las membranas plasmáticas de las células de plantas wt y *mpk3* en condiciones de NA y AC. A. El contenido de esfingolípidos totales de la membrana plasmática se determinó después de la extracción, separación e identificación por HPLC-ESI-MS/MS. B. Contenido relativo de las especies totales de Glicosilceramidas (GlcCer), Glicosil-inositolfosforilceramidas (GIPC), Ceramidas (Cer), Hidroxiceramidas (OHCer) y Bases de Cadena Larga (LCB) de las vesículas de membrana plasmática.

7. Digestión con tripsina de la ATPasa de H⁺ de las vesículas de membrana plasmática

Para establecer si el efecto autoinhibitorio del extremo carboxilo terminal está comprometido en la mayor actividad de la enzima encontrada en las plantas *mpk3* NA, se realizó un ensayo de digestión con tripsina. En la literatura está bien documentado que el carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺ es el dominio regulatorio que, al ser digerido con tripsina, aumenta la actividad de la ATPasa de H⁺ [Axelsen *et al*, 1999; Piette *et al*, 2011].

El tratamiento con tripsina por diferentes tiempos resultó en ligeros aumentos de la actividad de ATPasa de H⁺ de plantas tipo silvestre tanto en condiciones NA como AC, alcanzándose el máximo aumento de actividad (123 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹) a los 40 min en condiciones de NA (Fig. 14A). Sin embargo, este aumento fue menor al encontrado anteriormente en el laboratorio (de hasta 200 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹) [Morales-Cedillo, 2012]. Lo mismo ocurrió en el caso de la actividad de ATPasa de H⁺ de la mutante *mpk3* en condiciones NA y AC. Para evaluar con mayor precisión el efecto de la digestión con tripsina, se compararon las actividades antes y después del tratamiento de 40 min de digestión con tripsina (Fig. 14B). Si bien se encontró que la actividad aumenta aproximadamente 1.3 veces por el tratamiento de digestión, tal aumento no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos en las condiciones de NA y AC.



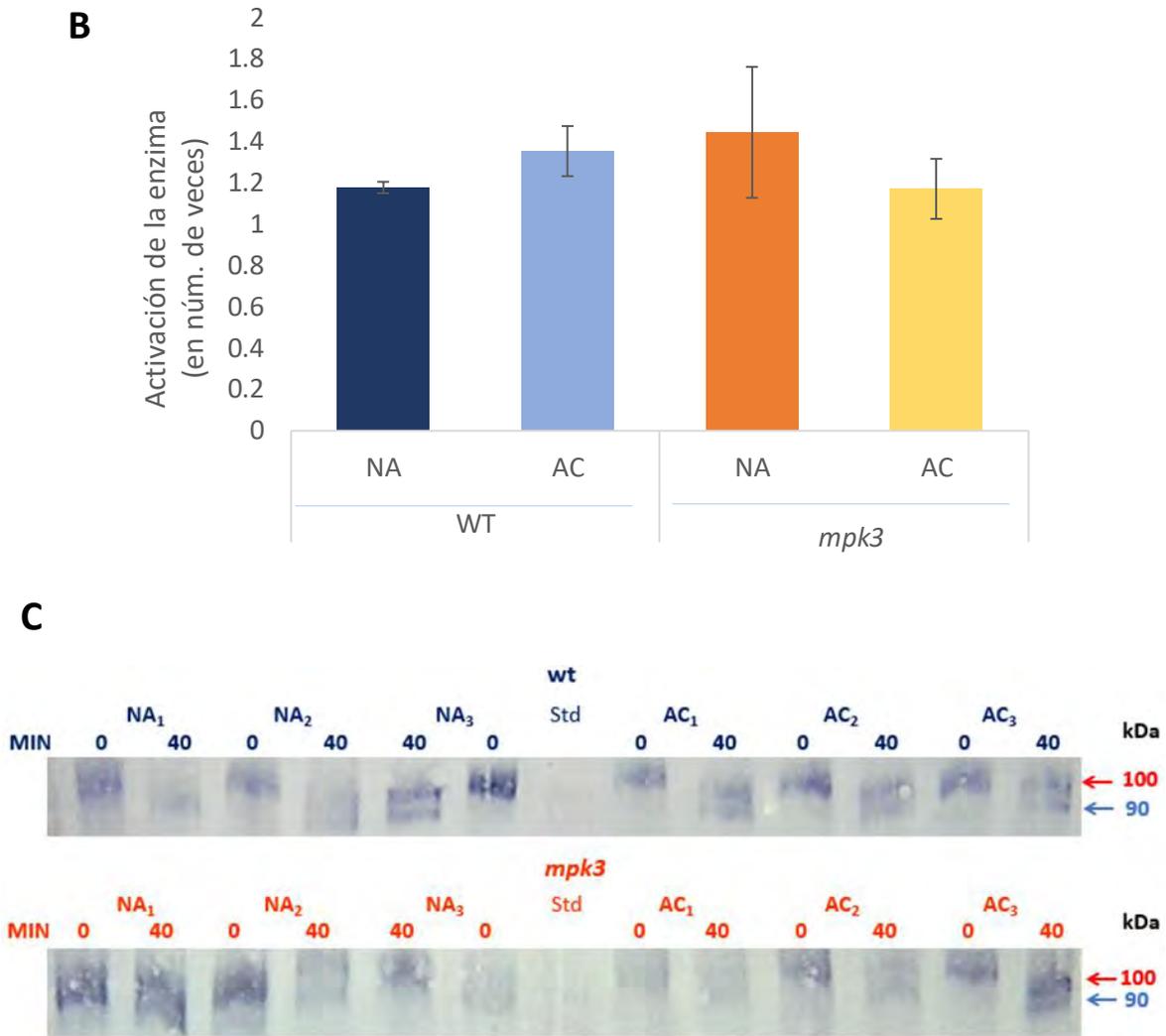


Fig. 14. Determinación de la relevancia funcional del carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺ de la MP en plantas *wt* y *mpk3* en condiciones de NA y AC. A. Se determinó la hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática de las plantas de los dos genotipos a 29 °C y durante 20 min de reacción digeridas previamente con tripsina por 0 y 40 min. Se presentan los valores promedio correspondientes a seis determinaciones llevadas a cabo con tres preparaciones membranales independientes de plantas *wt* y a tres determinaciones llevadas a cabo con 2 preparaciones membranales independientes de plantas *mpk3*. Los datos fueron procesados con el programa Excel 2010, aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Diferentes letras (a, b, c y d) indican que los valores promedio de actividad de hidrólisis de ATP son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$). B. Se determinó el número de veces de activación de la enzima como resultado de 40 min de digestión con tripsina respecto a la enzima no digerida. Los valores promedio \pm EE presentados, corresponden a las repeticiones de la Fig. 14A. C. Detección de los niveles de ATPasa de H⁺ en 3 diferentes preparaciones membranales de plantas de los genotipos tipo silvestre y mutante *mpk3* en condiciones de AC y de NA previamente digeridas con tripsina por 0 y 40 min. Los carriles corresponden a tres preparaciones independientes de membranas plasmáticas de plantas tipo silvestre o *mpk3* no aclimatadas y aclimatadas a 0 y 40 min de digestión, y al estándar (Std) de peso molecular. En rojo se indica el peso normal de la ATPasa (100 kDa) y en azul una banda de a aproximadamente 90 kDa obtenida consistentemente.

Para comprobar que los aumentos de actividad se relacionan a la remoción del carboxilo terminal de la enzima, se realizó una inmunodetección de la ATPasa de H⁺. En este análisis se encontró que la banda de 100 kDa correspondiente a la ATPasa de H⁺ disminuyó su intensidad a los 40' de digestión con tripsina, mientras apareció otra banda, con un peso aproximado de 90 kDa, también reactiva al anticuerpo (Fig. 14C). Lo anterior se observó tanto en la planta tipo silvestre como en la mutante *mpk3* en condiciones de NA y AC.

DISCUSIÓN

Las bajas temperaturas son una condición ambiental a la cual se encuentran expuestas las plantas constantemente, ya sea por cambios día/noche o por fluctuaciones estacionales. La adaptación a las bajas temperaturas es un proceso muy dinámico que involucra una orquestación de múltiples procesos. En las plantas de clima templado, las temperaturas bajas no congelantes causan alteraciones notables en procesos bioquímicos y fisiológicos que potencialmente mejoran su tolerancia al congelamiento. Este proceso de adaptación, conocido como aclimatación al frío y está asociado a cambios en los patrones de expresión de genes y de sus productos proteicos [Thomashow, 1999; Fowler y Thomashow, 2002; Chinnusamy *et al*, 2010; Janmohammadi *et al*, 2015; Kazemi-Shahandashti y Maali-Amiri, 2018].

Para la aclimatación, una de las estrategias que utilizan las plantas para adaptarse a las bajas temperaturas es el incremento de la fluidez membranal, mediante una remodelación que involucra a los tres componentes de la membrana: lípidos, proteínas y carbohidratos. En los lípidos, la remodelación membranal se realiza por un aumento de la insaturación de las cadenas acílicas de los ácidos grasos e igualmente por un aumento de especies de glicerolípidos y una disminución de esfingolípidos y esteroides [Uemura *et al*, 1995; Uemura y Steponkus, 1999; Zheng *et al*, 2011; Barrero-Sicilia *et al*, 2017].

Los cambios en la fluidez y composición de la membrana afectan la actividad de las enzimas localizadas en la membrana plasmática, como es el caso de la ATPasa de H⁺, la cual extrude protones de la célula generando un gradiente electroquímico de H⁺ que provee la fuerza motriz necesaria para el transporte secundario de iones y nutrientes dentro y fuera de las células, haciendo que la función de esta enzima sea una de las más importantes para la planta. Se ha encontrado que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática disminuye a bajas temperaturas [Peña-Moral, 2015; Rueda-Luna, 2015; Muzi *et al*, 2016], sin embargo, no se ha descrito el mecanismo por el cual esta actividad decrece.

Una de las formas en las que las plantas transducen la señal de frío es el encendido de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Particularmente, se ha encontrado que las MPK3, MPK4 y MPK6, son las principales MAP cinasas activadas en respuesta a frío [Li *et al*, 2017; Zhao *et al*, 2017].

Un reporte en levaduras relacionó el control de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática con una cascada de MAP cinasas [De la Fuente y Portillo, 2000], sin

embargo, en plantas no se ha descrito ningún mecanismo que relacione a las MAP cinasas con la ATPasa de H⁺.

Bajo estas consideraciones, en esta tesis se exploró la posibilidad de que una MAP cinasa (MPK3) estuviera involucrada en el control de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática tanto en condiciones normales como de aclimatación al frío, a través de la caracterización de la ATPasa de H⁺ en plantas tipo silvestre y la mutante *mpk3*.

1. Capacidad de aclimatación de las plantas wt y *mpk3*

Se encontró que en plantas tipo silvestre la aclimatación a bajas temperaturas (4 °C) condujo a un aumento del 50 % en la sobrevivencia (Fig. 8), lo cual coincide con el resultado de Cano-Ramírez descrito anteriormente en el laboratorio. Se piensa que esta sobrevivencia puede estar asociada al aumento en la fluidez membranal derivada del aumento de las insaturaciones en los lípidos, del aumento de glicerolípidos y de una disminución de esfingolípidos y esteroides, que se ha reportado en *A. thaliana* [Uemura *et al*, 1995; Uemura y Steponkus, 1999; Zheng *et al*, 2011; Barrero-Sicilia *et al*, 2017].

Las plantas de la línea *mpk3* respondieron a la aclimatación de manera similar a las plantas tipo silvestre. También se encontró un aumento similar (del 50 %) en la sobrevivencia de las plantas (Fig. 8). Por lo tanto, la ausencia de MPK3 no afectó la tolerancia a la congelación. En la literatura se describió que en respuesta a frío las MPK3 y la MPK6 fosforilan al factor de transcripción ICE1, marcándolo para degradación. ICE1 está involucrado en la activación de la transcripción de los genes *CBF*, cuyos productos confieren tolerancia a la congelación [Li *et al*, 2017; Zhao *et al*, 2017]. Gracias a este efecto, la fosforilación de ICE1 por MPK3 y MPK6 resultaría en una menor resistencia al congelamiento. Por lo anterior, se esperaría que las plantas de la línea *mpk6* (sin MPK6) mostraran una tolerancia a la congelación semejante a la de las mutantes *mpk3*. Sin embargo, Cano-Ramírez reportó una aclimatación ineficiente en las plantas *mpk6*. Esto puede explicarse debido a que, aunque para muchos procesos la MPK3 y la MPK6 tienen funciones redundantes, existen excepciones, como lo demostraron Ho *et al* (2017), quienes establecieron que la MPK6, pero no la MPK3, fosforila al factor de transcripción MYB15, el cual es un represor de la transcripción de los genes *CBF*, impidiendo su interacción con el promotor de *CBF*, favoreciendo la transcripción de los genes *CBF* y consecuentemente la resistencia al congelamiento.

Una característica de la mutante *mpk3* expuesta a bajas temperaturas es que sus hojas no presentan un color morado, como ocurre con las plantas wt. Se ha descrito que esta coloración morada en las hojas se debe a una acumulación de estructuras flavonoides como un mecanismo protector antioxidante [Christie *et al*, 1994; Doerfler *et al*, 2014; Himeno *et al*, 2014]. Esta observación puede implicar que la MPK3 está involucrada en la vía de biosíntesis de flavonoides, por lo que las plantas mutantes *mpk3* no presentan hojas con color morado.

2. Parámetros contribuyentes a las diferencias de actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas wt y *mpk3*

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es una enzima con un papel muy importante en la fisiología de la planta, comúnmente referida como la “enzima maestra”, ya que está involucrada en procesos como la expansión celular, la captación de nutrientes, regulación del pH intra y extra celular y la apertura estomática [Palmgreen, 1998; Wang *et al*, 2014b].

Debido a su importancia, es de esperarse que la actividad de la ATPasa de H⁺ debe ser modulada para afrontar las condiciones de estrés por el ambiente y los cambios metabólicos. Existe evidencia de que la ATPasa de H⁺ es muy sensible a estreses abióticos como alta salinidad, sequía y cambios de temperatura [Gong *et al*, 2010; Wakeel *et al*, 2010; Janicka-Russak *et al*, 2013; Kim *et al*, 2013; Falhof *et al*, 2015; Muzi *et al*, 2016]. Sin embargo, los eventos moleculares que llevan a la modulación de la actividad de la enzima y su posible papel en la respuesta de las plantas a estrés no están suficientemente descritos en muchos casos y para otros simplemente no existe información.

Con el propósito de dilucidar el mecanismo por el cual esta enzima presentaba cambios de actividad en las plantas carentes de MPK3, se procedió a caracterizar la funcionalidad de la enzima en el fondo mutante *mpk3*. Para ello, se estudió el efecto de la aclimatación en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en plantas wt y mutantes *mpk3*, encontrándose que en plantas wt la actividad disminuyó entre un 35 a un 40 % a consecuencia de la aclimatación. Por su parte, la mutante en comparación con la wt, presentó un incremento en la actividad en condiciones normales (NA) de un 50%. Sin embargo, en las plantas mutantes aclimatadas, la actividad disminuyó un 66%, siendo menor a la encontrada en la wt AC. Estos datos concuerdan con los previamente reportados en el laboratorio [Peña-Moral, 2015; Rueda-Luna, 2015]. Si bien, el mecanismo por el cual la enzima disminuye su actividad no ha sido elucidado.

2.1. Comportamiento cinético de la ATPasa de H⁺ en plantas wt y *mpk3*

Ya que se encontró un diferente comportamiento de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la mutante *mpk3* respecto a la wt tanto en condiciones NA como AC, se decidió determinar el patrón y las constantes cinéticas de la hidrólisis de ATP en ambos genotipos y condiciones. Se evaluaron concentraciones de ATP/Mg²⁺ en un intervalo entre 0.2 mM a 12 mM para evaluar concentraciones tanto saturantes como no saturantes de estos compuestos. Como realmente la enzima reconoce el complejo ATPHMg, que es diferente a las concentraciones independientes agregadas de ATP/Mg²⁺; la equivalencia es mostrada en la Tabla 6 del Apéndice 5 y para las determinaciones cinéticas se consideró el complejo ATPHMg.

Ya que en la literatura se establece que esta enzima puede o no oligomerizarse [Roberts *et al*, 1995; Monteiro y Sá-Correia, 1998; Sánchez-Nieto *et al*, 2011], las curvas experimentales se ajustaron tanto al modelo de Michaelis-Menten [Michaelis y Menten, 1913] como al modelo de Hill [Hill, 1910]. Se encontró que para ambos casos se tenía una buena correlación, además, al calcular la *n* de Hill se obtuvo un valor aproximado de 1 para todos los casos, por lo que con base al comportamiento michaeliano de la enzima se puede concluir que en ninguno de los casos la enzima activa se encuentra en forma oligomérica y que muy probablemente solamente se está expresando una isoforma.

Tomando como criterio el comportamiento michaeliano, se compararon las constantes catalíticas de ambos genotipos en condiciones de NA y AC. Para la wt NA se encontró una V_{max} de 127.16 ± 5.19 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹, la cual es coincidente con datos de actividad obtenidos previamente en el laboratorio [Ponce-Pineda, 2016]. Al calcular la V_{max} de la *mpk3* NA se encontró un valor de 157.12 ± 5.50 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹, el cual es mayor del de las plantas wt y también coincidente con los datos de actividad previamente determinados en el laboratorio [Peña-Moral, 2015]. La aclimatación provocó una disminución de la V_{max} para ambos genotipos, siendo la disminución más acentuada en la *mpk3*. La disminución de la V_{max} y de la actividad de la ATPasa se pueden deber a que en condiciones de frío la planta disminuye su tasa de crecimiento. Esto se observó en una planta mutante para la isoforma 2 de la ATPasa (AHA2), la cual presentó una menor actividad catalítica en las raíces, donde se redujo la fuerza protomotriz y con esto la habilidad de la célula de mantener una fuerza impulsora suficiente para transportar los iones y nutrientes necesarios para sostener un crecimiento adecuado [Haruta *et al*, 2010; Haruta y Sussman, 2012]. Adicionalmente, el hecho de que la actividad de la ATPasa de H⁺ es indispensable para la viabilidad celular

está demostrado porque la mutación de las dos isoformas más expresadas es letal [Haruta *et al*, 2014].

La disminución de la actividad de la enzima en condiciones de frío se puede interpretar en términos de la necesidad de la planta de conservar el agua, para prevenir la deshidratación que acompaña a la congelación y mantener la homeostasis intracelular. Para ello, necesita mantener cerrados los estomas, cuyo cierre es promovido por la actividad de la ATPasa [Inoue y Kinoshita, 2017]. A este respecto, se encontró que una mutante sobre-expresora de la ATPasa en células guarda indujo una mayor apertura estomática en presencia de luz, además de mostrar mayor actividad fotosintética, mayor crecimiento de hojas, semillas silicuas y flores [Wang *et al*, 2014a].

No se observó una diferencia entre las afinidades de las enzimas por el sustrato ATPHMg, sin embargo, en la *mpk3* AC hubo una disminución de un orden de magnitud en la eficiencia catalítica, la cual corresponde a la menor actividad observada en esa condición (Tabla 3). Este resultado indica que la AC, si bien reduce la actividad de la enzima en ambos genotipos, lo hace a través de diferentes mecanismos.

Es interesante mencionar que, en la condición de AC, en las plantas wt se presenta un efecto que se puede atribuir a una inhibición por sustrato. Este tipo de inhibición es una derivación de la cinética de Michaelis-Menten que se presenta cuando el sustrato se encuentra en exceso. Implica que la curva de velocidad de reacción incrementa hasta un máximo mientras la concentración de sustrato incrementa y después desciende hasta una asíntota o hasta cero. La inhibición por sustrato es muy común, y tiene un rol importante en la regulación de varias vías metabólicas [Kaiser, 1980; Kühl, 1994; Reed *et al*, 2010]. Los métodos cinéticos comunes no se pueden utilizar para analizar la inhibición por sustrato. Sin embargo, existen algunos modelos como el propuesto por Yoshino y Murakami (2015), que se podría usar para obtener las constantes cinéticas en esa condición. El que se presente este tipo de inhibición en las plantas wt AC implica una diferente estructuración de la enzima, posiblemente con una mayor accesibilidad de su sitio catalítico, tal que pudieran caber, pero estorbarse dos moléculas de sustrato a la vez.

2.2. Niveles enzimáticos de la ATPasa de H⁺ y de la proteína 14-3-3 en plantas wt y *mpk3*

Debido a que se encontraron diferentes comportamientos en la actividad y en la velocidad máxima de la ATPasa de H⁺ entre la mutante y la wt tanto en condiciones de NA como AC,

a través de inmunodetecciones de los niveles endógenos de la ATPasa de H⁺, se exploró la posibilidad de que las diferencias descritas estuvieran asociados a un nivel diferencial en la cantidad de enzima presente en la membrana plasmática. Existen varios reportes en los cuales cambios en la cantidad de enzima en la membrana reflejan diferentes niveles de expresión génica de la ATPasa [Ahn *et al*, 2000; Martz *et al*, 2006; Zahng *et al*, 2006].

Se encontró que únicamente los niveles de la ATPasa de H⁺ de las plantas *mpk3* NA aumentaban, lo cual se puede interpretar como la cantidad de enzima está contribuyendo a la actividad encontrada en esta muestra. Sin embargo, como las demás muestras no presentaron una diferencia significativa en la cantidad de enzima, esto lo que esta no puede explicar las diferencias encontradas en las actividades (Fig. 11). Esto sugiere que durante la aclimatación se llevan a cabo mecanismos independientes a la síntesis de *nov*, a la degradación y a su incorporación a la membrana que regulan la actividad de esta enzima.

Otra posibilidad es que la cantidad de ATPasa de H⁺ fuese la misma, pero se tuvieran diferentes isoformas. Para *Arabidopsis*, se sabe que existen 12 genes que codifican para la síntesis de variantes de la ATPasa de H⁺ que han sido denominadas como AHA1-AHA12 [Gavilanes *et al*, 1995]. Las isoformas AHA1 y AHA2 se expresan en todos los tejidos y órganos, indicando que estas isoformas parecen funcionar en el mantenimiento continuo de la homeostasis celular de iones. Se ha encontrado que el principal transcrito en la parte aérea de plántulas es el de AHA1, mientras que el de AHA2 predomina en raíces y en pelos radiculares [Gaxiola *et al*, 2007]. Las propiedades funcionales de las isoformas individuales han sido determinadas expresando los genes de AHA en levadura. En general, la propiedad que más varía es la afinidad por el ATP. Las isoformas AHA1 y AHA2 tienen una $K_m = 0.15$ mM por ATP, la cual es aproximadamente 10 veces más pequeña que la encontrada en nuestros ensayos para ambos genotipos en ambas condiciones. Se encontró que la isoforma AHA3 tenía una $K_m = 1.5$ mM por ATP [Palmgren y Christensen, 1994], la cual es consistente con el rango de K_m obtenidas experimentalmente (0.89 ± 0.17 a 1.92 ± 0.68 mM), por lo cual se podría suponer que la isoforma expresada mayormente en hojas es la AHA3, sin embargo, no podemos descartar la presencia de alguna de las otras isoformas.

Tomando en cuenta que uno de los mecanismos por los que la ATPasa de H⁺ aumenta su actividad es mediante la unión de una proteína 14-3-3 al carboxilo terminal, se exploró la posibilidad de que la disminución en la actividad de las plantas wt y *mpk3* en las condiciones de AC, estuviera relacionada a una menor cantidad de la proteína 14-3-3 asociada a la

ATPasa. Para ello, se estimaron los niveles de proteína 14-3-3 presentes en las vesículas de membrana por medio de inmunodetección.

Los niveles de la proteína 14-3-3 no se vieron afectados en las muestras de plantas wt ni *mpk3* en condiciones de NA y AC (Fig. 12), lo cual indica que dicha proteína no está involucrada en la disminución de la actividad de la ATPasa. Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con reserva, ya que existen 13 isoformas diferentes de proteína 14-3-3 en *Arabidopsis* [Alserfjord *et al*, 2004], y como el anticuerpo utilizado no es capaz de distinguir entre isoformas, algunas de ellas pudieron haber variado en sus niveles. Además, la proteína 14-3-3 podría estar asociada a otras proteínas de membrana que pudieran estar afectando la actividad [DeLille *et al*, 2001]. Adicionalmente, se ha descrito que, durante la exposición a bajas temperaturas, la isoforma lambda es fosforilada por la proteína CRPK1, induciendo su transporte al núcleo [Liu *et al*, 2017], lo cual también podría tener efectos sobre la actividad de la ATPasa que hasta el momento no se han explorado.

2.3. Entorno esfingolipídico de la ATPasa de H⁺ en plantas wt y *mpk3*

Si bien se encontró un aumento en la cantidad de ATPasa en las muestras *mpk3* NA, con mayor actividad de la enzima, no se encontró una forma de explicar la disminución de la actividad en las plantas aclimatadas. Tratando de encontrar una explicación, se analizaron las especies de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática, ya que se ha descrito que el ambiente lipídico puede regular la actividad de la ATPasa de H⁺. Adicionalmente, en el laboratorio se tenía el antecedente de que ciertas especies de esfingolípidos son capaces de interactuar con la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática [Morales-Cedillo, 2015].

Se encontró que en condiciones de NA, el contenido de esfingolípidos en la *mpk3* fue tres veces mayor que el de la wt. Esto sugiere que la MPK3 está involucrada en la regulación de la síntesis de esfingolípidos, posiblemente a través de una regulación a nivel de factores de transcripción, sin embargo, esta posibilidad no ha sido descrita hasta ahora en ningún organismo.

En cuanto a los niveles relativos de las clases de esfingolípidos, se encontró que en la *mpk3* NA tiene la mayor cantidad de esfingolípidos totales y particularmente de las glicosilinositolfosforilceramidas (GIPC). En el laboratorio se ha descrito a los GIPC como reguladores positivos de la actividad de la ATPasa de H⁺ [Morales-Cedillo, 2015]. Igualmente, en levadura se ha descrito que la síntesis de esfingolípidos de ácidos grasos de cadena muy larga es necesaria para la integración *de novo* de la ATPasa de H⁺ a la

membrana plasmática, así como que un aumento en la inositolfosforilceramida es primordial para la biogénesis de la ATPasa [Gaigg *et al*, 2005]. Así se podría explicar el aumento en la cantidad de ATPasa presente en la *mpk3* NA y consecuentemente el aumento de su actividad.

Sin embargo, como los niveles de esfingolípidos entre la wt NA y AC y la *mpk3* AC no muestran diferencias en el contenido de esfingolípidos, realmente sus niveles no pueden explicar las diferencias en las actividades de ATPasa.

De hecho, en las condiciones de AC, los niveles de esfingolípidos disminuyeron en ambos genotipos, lo cual concuerda con la estrategia de disminución de esfingolípidos previamente descrita para aumentar la fluidez membranal [Uemura *et al*, 1995; Uemura y Steponkus, 1999; Zheng *et al*, 2011; Cano-Ramírez, 2014].

3. Implicación del carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺ en los cambios de actividad

Un último intento para explicar las diferencias en la actividad de ATPasa de la membrana plasmática descrita consistió en estudiar la contribución del carboxilo terminal a este respecto.

Para este estudio, se realizó la remoción del carboxilo terminal por medio de un ensayo de proteólisis controlada con tripsina. Se encontró que, con tratamientos de 40 min de proteólisis, la actividad de ATPasa de H⁺ en la planta wt NA presentó un incremento pequeño pero significativo (Fig. 14). Aunque dicho incremento fue menor en comparación al obtenido en ensayos similares previamente realizados en el laboratorio [Morales-Cedillo, 2015]. En las plantas wt AC, también se encontró un pequeño incremento significativo en el tratamiento de 40 min de proteólisis. En el caso de la planta *mpk3*, la actividad de ATPasa no se vio afectada por el tratamiento de proteólisis en ninguna de las condiciones. Una inmunodetección de la ATPasa de H⁺ antes y después de proteólisis reveló que como consecuencia del tratamiento una banda de 100 kDa (correspondiente al peso de la ATPasa de H⁺ reportado [Falhof *et al*, 2015]) se torna difusa, mientras que simultáneamente aparece una banda de 90 kDa comenzó a aparecer, indicando el funcionamiento correcto del tratamiento de proteólisis.

El resultado sugiere que el carboxilo terminal no parece tener un papel relevante en la regulación de la enzima en estas condiciones. Sin embargo, no se conoce que residuos se encuentran fosforilados en el carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺ en las condiciones de aclimatación, ya que reportes previos encontraron que la fosforilación diferencial en

múltiples sitios ocasiona la activación o la inactivación de la enzima [Kasamo, 2003; Pedersen *et al*, 2007; DUBY y Boutry, 2009].

A este respecto es importante mencionar que la ATPasa de H⁺ puede ser desfosforilada por una fosfatasa 2A (PP2A) [Camoni *et al*, 2000], que también ha sido reportada como involucrada en la respuesta a estrés por frío [Pais *et al*, 2009; Zhao, 2015].

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la MPK3 está involucrada en la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺, tanto en condiciones de no aclimatación como de aclimatación. La MPK3 en la no aclimatación funge como regulador negativo de la actividad de la ATPasa, mientras que en la aclimatación funge como regulador positivo.

Posiblemente estos cambios estén relacionados a la regulación transcripcional de las enzimas de la vía de síntesis de esfingolípidos, e igualmente podría regular la activación postraduccional de cinasas o fosfatasas que tienen como blanco a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

PERSPECTIVAS

- Determinar los niveles de fosforilación de la ATPasa de H⁺ de plantas wt y *mpk3* en condiciones NA y AC mediante inmunodetecciones, para identificar los posibles residuos fosforilados y su posible implicación en la actividad.
- Hacer un análisis exhaustivo de cada una de las clases de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática de plantas tipo wt y *mpk3* en condiciones NA y AC por medio de un análisis computacional de los datos de Esfingolipidómica, para identificar que esfingolípidos están mayormente alterados y como pudieran alterar la actividad de la ATPasa de H⁺.
- Identificar a las cinasas y fosfatasas que tienen como blanco a la ATPasa de H⁺, por medio de análisis proteómico y fosfoproteómico para después identificar si estas proteínas son activadas en frío.
- Estudiar los perfiles de actividad de la ATPasa de H⁺ en plantas mutantes carentes de MPK6, MKK4 y MKK5 con ensayos como los realizados previamente para dilucidar un poco más el cómo está constituido el cassette de MAPK.
- Realizar el análisis cinético con un modelo que describa el comportamiento de la ATPasa en las plantas tipo silvestre AC y así identificar posibles modificaciones postraduccionales.
- Caracterizar los patrones de actividad de MPK3 y MPK6 en la planta wt y las mutantes *mpk3* y *mpk6* en condiciones de NA y AC mediante ensayos de fosforilación de mielina básica, para identificar la activación de estas cinasas en nuestras condiciones.

APÉNDICES

Apéndice 1

Composición del medio de Hoagland.

Tabla 4. Composición química de los macronutrientes y micronutrientes en el medio de Hoagland.

MICRONUTRIENTES		MACRONUTRIENTES	
REACTIVOS	mM	REACTIVOS	mM
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.009	KNO ₃	6
H ₃ BO ₃	0.046	Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	4
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.0008	NH ₄ H ₂ PO ₄	1
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0003	MgSO ₄ •7H ₂ O	2
H ₂ MoO ₄ •H ₂ O	0.0001		

- El medio de Hoagland se compone de las soluciones de macronutrientes-micronutrientes (1:1) y Fe-EDTA (0.00005 %).
- Las soluciones de micronutrientes y macronutrientes se preparan independientemente disueltos en agua bidestilada y en el orden indicado en la Tabla 4.
- El pH del medio se ajusta con NaOH 3 M a 5.2 - 5.5.

Apéndice 2

Tabla 5. Equivalencia de la concentración de ATP/Mg²⁺ añadida y la concentración de ATPMg como sustrato de la reacción de hidrólisis de ATP [O'Sullivan y Smithers, 1979].

ATP/Mg ²⁺ (mM)	ATPMg (mM)
0.2	0.1266
0.3	0.2079
0.4	0.2892
0.6	0.4518
0.8	0.6144
1	0.777
2	1.59
4	3.216
6	4.842
8	6.468
10	8.094

Apéndice 3

Amortiguadores para electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS.

- A. Amortiguador del cátodo.
 - a. 0.1 M tris (Trizma Base)
 - b. 0.1 M tricina
 - c. 0.1 % SDS

- B. Amortiguador del ánodo.
 - a. 0.2 M tris (Trizma Base)
 - b. Ajustar pH 8.9 con HCl 1 M

Apéndice 4

Soluciones para tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

- A. Solución fijadora/desteñidora.
 - a. 50 % metanol
 - b. 10 % ácido acético

- B. Solución de tinción con azul de Coomassie
 - a. 1.5 g azul de Coomassie
 - b. 375 mL metanol
 - c. 200 mL ácido acético
 - d. 950 mL agua destilada

Apéndice 5

Soluciones y condiciones para la inmunodetección en membranas de PVDF.

- A. Solución amortiguadora de transferencia para réplica en Western.
 - a. 15 mL de una solución 1 M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 (se prepara tomando 7.5 ml de 1 M de Na_2HPO_4 y 7.5 mL de 1 M de NaH_2PO_4)
 - b. 200 mL de metanol reactivo analítico
 - c. 5 mL de solución SDS al 10 %
Aforar todo lo anterior a 1 L con agua bidestilada

- B. Solución amortiguadora a pH 9.5 (Tris-solución salina, TBS)
 - a. 12.1 g/L Trizma base
 - b. 5.8 g/L de NaCl
 - c. 1 g/L MgCl_2
Ajustar a pH de 9.5

- C. Solución amortiguadora TBS con Tween 20 (TTBS)
 - a. 900 mL TBS
 - b. 100 mL Tween 20 al 0.1 % v/v

Tabla 6. Condiciones para la incubación y revelado de las membranas.

Anticuerpo	Solución Bloqueadora	Primer anticuerpo y condiciones de incubación	Solución del segundo anticuerpo* y condiciones de incubación
ATPasa de H ⁺ de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrisera)	2 % de leche descremada <i>Svelty</i> en TBS (30 mL)	3 µl de anticuerpo ATPasa de H ⁺ en 0.06 g leche descremada <i>Svelty</i> / 3 ml TBS durante toda la noche	4 µl de anticuerpo fosfatasa alcalina en 0.2 g leche descremada <i>Svelty</i> / 10 ml TTBS por 2 h
14-3-3 de <i>Arabidopsis</i> (Santa Cruz)	2 % de leche descremada <i>Svelty</i> en TTBS	3 µl de anticuerpo 14-3-3 en 0.06 g leche descremada <i>Svelty</i> / 3 ml TTBS durante toda la noche	4 µl de anticuerpo fosfatasa alcalina en 0.2 g leche descremada <i>Svelty</i> / 10 ml TTBS por 2 h

*Fosfatasa alcalina del proveedor *Millipore*® a una dilución 1:2500 (4 µl en 10 ml de TTBS)

- D. Solución patrón de NBT para desarrollar color
 - a. 30 mg NBT en 1 ml de dimetilformamida al 70 %

- E. Solución patrón de BCIP para desarrollar color
 - a. 15 mg BCIP en 1 mL de dimetilformamida

- F. Mezcla para desarrollar color
 - a. Se prepara justo antes de usarla
100 µL NBT y 100 µL BCIP en 10 mL TBS pH 9.5.

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X, Zhu JK. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Bio. Chem*, 281:37636–37645 (2006).

Ahn J, Im Y, Chung G, Seong K, Cho B. Sensitivity of plasma membrane H⁺-ATPase of cucumber root system in response to low temperature. *Plant Cell Rep*, 19:831-835 (2000).

Allen R. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol*. 107:1049–1054 (1995).

Alsterfjord M, Sehnke PC, Arkell A, Larsoon H, Svannelid F, Rosenquist M, Ferl RJ, Sommarin M, Larsoon C. Plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves. Evidence for isoform specificity un the 14-3-3/H⁺-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol*, 45:1202-1210 (2004).

Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol*. 141:391–396, (2006).

Auer M, Scarborough GA, Kühlbrandt W. Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature*, 392 (6678):840-843 (1998).

Axelsen K, Venema K, Jahn T, Baunsgaard L, Palmgren M. Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase AHA2: Mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry*, 38:7227-7234 (1999).

Bargmann BO, Munnik T. The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr. Opin Plant Biol*, 9:515-522 (2006).

Barrero-Sicilia C, Silvestre S, Haslam R P, Michaelson L V. Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Sci*, 263:194 – 200 (2017).

Camoni L, Lori V, Marra M, Aducci P. Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, 275:9919-9923 (2000).

Cano-Ramírez DL. Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM (2014).

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 17:1043–1054 (2003).

Chinnusamy V, Zhu JK, Sunkar R. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. Plant Stress Tolerance. *Methods Mol Biol*, Humana Press. Pp. 39 – 55 (2010).

Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194:541 – 549 (1994).

Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of *Arabidopsis* Proc *Natl Acad Sci*. 101:15243–15248 (2004).

De la Fuente N, Portillo F. The cell Wall integrity/remodeling MAPK cascade is involved in glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 1509:189 – 194 (2000).

De Lille JM, Sehnke PC, Ferl RJ. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol*, 126:1-35 (2001).

Del Rio LA, Lopez-Huertas E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol*, 57:1364–1376, (2016).

Denison FC, Paul AL, Zupanska AK, Ferl RJ. 14-3-3 proteins in plant physiology. *Semin Cell Dev Biol*, 22:720–727 (2011).

Ding Y, Li H, Zhang X, Xie Q, Gong Z, Yang S. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in Arabidopsis. *Dev Cell*, 32, 278–289 (2015).

Doerfler H, Sun X, Wang L, Engelmeier D, Lyon D, Weckwerth W. *mzGroupAnalyzer*-Predicting pathways and novel chemical structures from untargeted high-throughput metabolomics data. *Plos One*, 9(5) (2014).

Doherty, C.J., Van Buskirk, H.A., Myers, S.J., and Thomashow, M.F. Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21:972–984, (2009).

Duby G, Boutry M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Archiv Eur J Physiol*, 457:645–655, (2009).

Duby G, Poreba W, Piotrowiak D, Bobik K, Derua R, Waelkens E, Boutry M. Activation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H⁺-ATPase C-terminal region. *J Biol Chem*, 284: 4213–4221 (2009).

Falhof J, Pedersen J, Fuglsang A, Palmgren M. Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the center of plant physiology. *Mol Plant*, 9, 323-337 (2015).

Fowler S, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14:1675-1690 (2002).

Foyer CH, Noctor G, Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155:2–18 (2011).

Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications, *Antioxid Redox Signal*, 11:861–905 (2009).

Frías I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviñó JP, Culiañez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R. A major isoform of the maize

plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *The Plant Cell*, 8: 1533-1544 (1996).

Fu H, Subramanian R, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 617-647 (2000).

Fuglsang A, Kristensen A, Cuin T, Schulze W, Persson J, Thuesen K, Ytting C, Oehlenschläger C, Mahmood K, Sondergaard T, *et al.* Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *Plant J*, 80:951–964 (2014).

Fuglsang A, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen O, Aducci P, Palmgren M. Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947. *J Biol Chem*, 274:36774–36780 (1999).

Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS. Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *The Plant Cell*, 19:1617-1634 (2007).

Gaigg B, Timishci B, Corbino L, Schneiter R. Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J Biol Chem*, 280:22515-22522 (2005).

Galiba G, Tóth T. Cold Stress. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd edition, volume 1 (2017).

Gao F, Su Q, Fan YL, Wang L. Expression pattern and core region analysis of *AtMPK3* promoter in response to environmental stresses. *Sci China Press*, 53:1315-1321 (2010).

Gavilanes M, Sánchez S, Enríquez M, García O. Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia*, 46: 251-262 (1995).

Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K. Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581: 2204-2214 (2007).

Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28:1091-1101 (2006).

Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* 124: 1854–1865 (2000).

Gong DS, Xiong YC, Ma BL, Wang TM, Ge JP, Qin XL. Early activation of plasma membrane H⁺-ATPase and its relation to drought adaptation in two contrasting oat (*Avena sativa*) genotypes. *Environ Exp Bot*, 69:1-8 (2010).

González-Reyes KM. Caracterización de la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2010).

González-Romo P, Sánchez-Nieto S, Gavilanes-Ruiz M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Analytical Biochemistry*, 200: 235-238 (1992).

Gordon-Kamm WJ, Steponkus PL. Lamellar-to-hexagonal III phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 6373-6377 (1984).

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

Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barrett-Wilt G, Kline KG, Mohsin SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR. Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biochem Chem*, 285:17918 – 17929 (2010).

Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff B, Sussman M. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, 343:408–411 (2014).

Haruta M, Sussman MR. The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 158:158- 1171 (2012).

Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (London)*, 40: 4-6 (1910).

Himeno M, Kitazawa Y, Yoshida T, Maejima K, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Sci Rep UK*, 4: 4111 (2014).

Ho KS, Soo KH, Bahk S, An J, Yoo Y, Kim JY, Sik CW. Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 45:6613-6627 (2017).

Huang S, Van Aken O, Schwarzlander M, Belt K, Millar AH. Roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signalling and stress response in plants. *Plant Physiol*, 171:551–1559 (2016).

Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J*, 24: 655-665 (2000).

Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B, Morris P, Innes R, Ecker J, Schell D, Klessig D, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker J. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci*, 7:301-308 (2002).

Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281:36969-36976 (2006).

Inoue S, Kinoshita T. Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 174: 531–538 (2017).

Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*. 280:104–106 (1998).

Janicka-Russak M, Kabala K, Wdowikowska A, Klobus G. Modification of plasma membrane proton pumps in cucumber roots as an adaptation mechanism to salt stress. *J Plant Physiol*, 170: 915-922 (2013).

Janicka-Russak M. Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase in Adaptation of Plants to Abiotic Stresses. *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, ISBN: 978-953-307-672-0, InTech (2011).

Janmohammadi M, Zolla L, Rinalducci S. Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry*, 117:76 – 89 (2015).

Janská A, Marsík P, Zelenková S, Ovesná J. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol*, 12:395-405 (2010).

Jenks M, Hasegawa P. Plant Abiotic Stress. *Wiley-Blackwell*. 2nd Edition (2014).

Jia Y, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Gong Z, Yang S. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 212: 345–353 (2016).

Kaiser PM. Substrate inhibition as a problem of non-linear steady state kinetics with monomeric enzymes. *J Mol Catal*, 8:431–442 (1980).

Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 136:4159–4168 (2004).

Kasamo K, Sakakibara Y. The plasma membrane H⁺-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci*, 111: 117-131 (1995).

Kasamo K. Mechanism for activation of plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) culture cells by molecular species of a phospholipid. *Plant Physiol*, 93: 1049-1052 (1990).

Kasamo K. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res*, 116: 517-523 (2003).

Kazemi-Shahandashti S-S, Maali-Amiri R. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J Plant Physiol*, 226: 123-135 (2018).

Kim HS, Oh JM, Luan S, Carlson JE, Ahn SJ. Cold stress causes rapid but differential changes in properties of plasma membrane H⁺-ATPase of camelina and rapeseed. *J Plant Physiol*, 170: 828-837 (2013).

Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:411–423 (2003).

Kühl PW. Excess-substrate inhibition in enzymology and high-dose inhibition in pharmacology: a re-interpretation. *Biochem J*, 298:171–180 (1994).

Kühlbrandt W, Zeelen J, Dietrich J. Structure, Mechanism, and Regulation of the *Neurospora* Plasma Membrane H⁺-ATPase. *SCIENCE*, 297: 1692-1696 (2002).

Levitt J. Response of Plants to Environmental Stress, 2nd ed. Academic Press, New York, USA, (1980).

Li H, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Zhang S, Gong Z, Yang S. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 43:1-13 (2017a).

Li H, Ye K, Shi Y, Cheng J, Zhang X, Yang S. BZR1 positively regulates freezing tolerance via CBF-dependent and CBF-independent pathways in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 10:545-559 (2017b).

Liu Z, Jia Y, Ding Y, Shi Y, Li Z, Guo Y, Gong Z, Yang S. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response. *Mol Cell*, 66: 117-128 (2017).

López-Coria M, Hernández-Mendoza JL, Sánchez-Nieto S. Trichoderma asperellum induces maize seedling growth by activating the plasma membrane H⁺-ATPase. *Mol Plant Microbe Interact*, 29: 797-806 (2016).

MAPK Group. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci*, 7:301-308 (2002).

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

Martz F, Sutinen ML, Kiviniemi S, Palta J. Changes in freezing tolerance, plasma membrane H⁺-ATPase activity and fatty acid composition in *Pinus resinosa* needles during cold acclimation and de-acclimation. *Tree Physiol*, 26:783-790 (2006).

Medina J, Catalá R, Salinas J. The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Sci*, 180:3-11 (2011).

Méne-Saffrané L. Vitamin E biosynthesis and its regulation in plants. *MDPI*, 7(1): 2 (2018).

Michaelis L, Menten ML. Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z*, 49: 333-369 (1913).

Miura K, Furumoto T. Cold signaling and cold response in plants. *Int J Mol Sci*, 14:5312-5337 (2013).

Miura K, Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci*, 5:1-12 (2014).

Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:765-769 (1996).

Moller L, Jensen P, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 459-481 (2009).

Monteiro GA, Sá-Correia. *In vivo* activation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. *Biochim Biophys Acta*, 1370(2): 310-316 (1998).

Morales-Cedillo F. Interacción estructural esfingolípidos-ATPasa de H⁺ y su relevancia funcional en *Arabidopsis*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM (2014).

Muzi C, Camoni L, Visconti S, Aducci P. Cold stress affects H⁺-ATPase and phospholipase D activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 108:328 – 336 (2016).

Nelson D, Cox M. Lehninger: Principios de Bioquímica. Ed. Omega. 4^a ed. España. Pp 372-374 (2006).

O'Sullivan WJ, Smithers GW. Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods in Enzymology*, 63: 294-336 (1979).

Olsson A, Johansson F, Sommarin M, Larsson C. Multiple regulatory sites in the C-terminal autoinhibitory domain of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant J*, 8: 959-962 (1998).

Ottmann C, Marco S, Jaspert N, Marcon C, Schauer NW, Vandermeeren C, Duby G, Boutry M, Wittinghofer A, Rigaud JL, Oecking C. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol Cell*, 25: 427-440 (2007).

Orvar B, Sangwan V, Omann F, Dhindsa R. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J*, 23:785-794 (2000).

Pais SM, Tellez-Inon MT, Capiati A. Serine/threonine protein phosphatase type 2 and their roles in stress signaling. *Plant Sign Behav*, 4:1013-1015 (2009).

Palmgren MG, Christensen G. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 3037-3033 (1994).

Palmgren MG, Harper JF. Pumping with plant P-type ATPases. *Journal of Experimental Botany*, 50: 883-893 (1999).

Palmgren MG. Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouse for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 817-845 (2001).

Paul AL, Denison FC, Schultz ER, Zupanska AK, Ferl RJ. 14-3-3 phosphoprotein interaction networks – does isoform diversity present functional interaction specification? *Front Plant Sci*, 3: 190 (2012).

Pedersen BP, Buch-Pedersen M, Morth P, Palmgren MG, Nissen P. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450:1111-1115 (2007).

Pedersen PL, Carifoli E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci*, 12: 146-150 (1987).

Peña-Moral A. Estudio comparativo de la actividad de ATPasa en plantas con diferente capacidad de aclimatación. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Milpa Alta (2015).

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356 (1977).

Piette A, Derua R, Waelkens E, Boutry M, Duby G. A phosphorylation in the C-terminal auto-inhibitory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase activates the enzyme with no requirement for regulatory 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, 286:18474-18482 (2011).

Pitzschke A. Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends Plant Sci*, 20:49-55 (2015).

Ponce-Pineda IG. Análisis energético del efecto de la temperatura en la catálisis de la ATPasa de H⁺ en membranas con diferente contenido de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2016).

Pospisil P, Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1987:1151–1160 (2009).

Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bio Essays*, 32:422–429 (2010).

Roberts G, Berbérián G, Beaugé L. Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H⁺-ATPase from higher plants. *Plant Physiol*, 108: 813-819 (1995).

Rodríguez M, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61:621-649 (2007).

Rudashevskaya EL, Ye J, Jensen ON, Fuglsang AT, Palmgren MG. Phosphosite mapping of P-type plasma membrane H⁺-ATPase in homologous and heterologous environments. *The Journal of Biological Chemistry*, 287: 4904-4913 (2011).

Rueda-Luna AJ. Relación entre nivel de proteína y actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas expuestas a bajas temperaturas y deficientes en la síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2015).

Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol*, 141:336–340 (2006).

Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *J Exp Bot*, 63(12): 4513–4526 (2012).

Sánchez-Nieto S, Enríquez-Arredondo C, Guzmán-Chávez F, Hernández-Muñoz R, Ramírez J, Gavilanes-Ruíz M. Kinetics of the H⁺-ATPase from dry and 5-hours-imbibed maize embryos in its native, solubilized and reconstituted forms. *Mol Plant*, 4: 505-515 (2011).

Sánchez-Nieto S, García-Rubio O, Pacheco-Moisés F, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes-Ruíz M. Purification of the plasma membrane from dry maize embryos. *Physiol Plant*, 101: 157-164 (1997).

Sangwan V, Foulds I, Singh J, Dhindsa RS. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx, *Plant J*, 27:1–12 (2001).

Saucedo-García M, Gavilanes-Ruíz M y Arce-Cervantes O. Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-14 (2015).

Saxena M, Saxena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *J Pharm Sci*, 28: 130-134 (2012).

Schägger H, Von Jagow G. Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*, 166: 368–379 (1987).

Shi Y, Tian S, Hou L, Huang X, Zhang X, Guo H, Yang S. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24:2578–2595 (2012).

Steponkus PL, Lynch DV, Uemura M, Heber U, Pearce RS. The influence of cold acclimation on the lipid composition and cryobehaviour of the plasma membrane of isolated rye protoplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B: Biological Sciences*, 326: 571-583 (1990).

Suzuki N y Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plant*, 126: 45-51 (2006).

Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 15, 141-152 (2004).

Thomashow M. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 50:571-599 (1999).

Uemura M, Joseph RA, Steponkus L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 109:15 – 30 (1995).

Uemura M, Steponkus PL. Cold acclimation in plants: Relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J Plant Res*, 112:245 – 254 (1999).

Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A, Kawamura Y. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126: 81-89 (2006).

Wakeel A, Hanstein S, Pitann B, Schubert S. Hydrolytic and pumping activity of the H⁺-ATPase from leaves of sugar beet (*Beta vulgaris*) as affected by salt stress. *J Plant Physiol*, 127:1102-1112 (2010).

Wang X, Jiang D, Lang X. Future extreme climate changes linked to global warming intensity. *Science Bulletin*, 62: 1673-1680 (2017).

Wang Y, Noguch K, Ono N, Inoue S, Terashima I, Kinoshita T. Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:533-538 (2014a).

Wang Y, Shimazaki K, Kinoshita T. Multiple roles of the plasma membrane H⁺-ATPase and its regulation. *The Enzymes*, Vol 35, Chapter 8, Pp 191-211 (2014b).

Yadav Kumar S. Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Agron Sustain Dev*, 30:515-527 (2009).

Yoshino M, Murakami K. Analysis of substrate inhibition of complete and partial types. *Springer Plus*, 4:292 (2015).

Zhang J, Liu Y, Pan Q, Zhan J, Wang X, Huang W. Changes in membrane-associated H⁺-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Sci*, 170:768-777 (2006).

Zhao C, Wang P, Si T, Hzu C-C, Wang L, Zayed O, Yu Z, Zhu Y, Dong J, Tao WA, Zhu J-K. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability. *Dev Cell*, 43: 618-629 (2017a).

Zhao J. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signaling. *J Exp Bot*, 66:1721-1736 (2015).

Zhao Y, Wang P, Si T, Hsu C-C, Wang L, Zayed O, Yu Z, Zhu Y, Dong J, Tao W.A, Zhu J-K. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability. *Dev Cell*, 43:1-12 (2017b).

Zhao C, Zhang Z, Xie S, Si T, Li Y, Zhu JK. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 171:2744–2759 (2016).

Zheng G, Tian B, Zhang F, Tao F, Li W. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodeling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant Cell Environ*, 34:1431- 1442 (2011).

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136:2621–2632 (2004).