



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA BAJA TEMPERATURA EN LOS NIVELES DE ATPASA
DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LÍNEAS DE
ARABIDOPSIS DEFICIENTES EN MAP CINASAS Y ESPECIES
REACTIVAS DE OXÍGENO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ABRAHAM RODRÍGUEZ JUÁREZ



Cd. Universitaria, Cd. de México, agosto de 2019



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: MARINA GAVILANES RUÍZ
VOCAL: JOSE PEDRAZA CHAVERRI
SECRETARIO: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
1°. SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARIN
2°. SUPLENTE: MARIA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB 101, DEPTO. DE BIOQUÍMICA, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. MARINA GAVILANES RUÍZ

SUSTENTANTE (S):

ABRAHAM RODRÍGUEZ JUÁREZ

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se financió con recursos de los proyectos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México [PAPIIT-IN222815, IN220618], de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México [PAIP 5000 9115] y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México [238368].

Este trabajo se realizó bajo la supervisión continua de la M. en C. Ariadna González Solís.

Este trabajo se realizó con la ayuda técnica de la Dra. Laura Carmona Salazar.

Se reconoce la ayuda técnica de la Q. Laurel Fabila Ibarra en el cultivo de plantas y los sistemas de aclimatación a bajas temperaturas.

ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
1. RESISTENCIA A BAJAS TEMPERATURAS.....	10
2. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	11
2.1. Sistemas de transducción de señales en respuesta al frío.....	11
2.1.1. Especies reactivas de oxígeno.....	11
2.1.2. MAP cinasas	12
3. LA MEMBRANA PLASMÁTICA COMO RECEPTOR EN EL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN RESPUESTA AL FRÍO	12
3.1. Cambio en la composición lipídica de la membrana en respuesta al frío.....	13
3.2. La ATPasa de H ⁺	14
3.2.1. Estructura	15
3.2.2. Función molecular	16
3.2.3. Función fisiológica.....	16
<i>Transporte secundario</i>	16
<i>Elongación celular</i>	17
<i>Tolerancia a la salinidad</i>	17
<i>Apertura de estomas y osmorregulación</i>	17
<i>Regulación del pH intracelular</i>	17
4. REGULACIÓN DE LA ATPASA DE H ⁺ POR LA PROTEÍNA 14-3-3.....	18
III. ANTECEDENTES.....	19
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVO	22

VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
2. MATERIAL BIOLÓGICO	24
3. MÉTODOS	24
3.1. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	24
3.2. CRECIMIENTO HASTA PLANTAS ADULTAS	24
3.3. COSECHA DE HOJAS	26
3.4. OBTENCIÓN DE FRACCIÓN MICROSOMAL	27
3.5. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA	27
3.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS	27
3.7. TINCIÓN DE GELES CON AZUL DE COOMASSIE	29
3.8. SECADO DE GELES	29
3.9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ATPASA: TÉCNICA DE WESTERN BLOT O INMUNORÉPLICA.....	30
3.10. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.....	31
4. SOLUCIONES PARA LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS Y LA TRANSFERENCIA EN WESTERN.....	32
1. INMUNODETECCIÓN DE LA ATPASA DE H ⁺	34
2. Estimación de los niveles de proteína 14-3-3 en las membranas plasmáticas de las plantas aclimatadas y no aclimatadas de los genotipos silvestre y <i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> , <i>pfl</i> <i>18-18</i>	43
IX. DISCUSIÓN.....	47
1. IDENTIFICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES RELEVANTES.....	48
Verificación de la reactividad del anticuerpo contra la banda de la ATPasa de H ⁺	49
a. Solubilización completa de la ATPasa de H ⁺ para su separación electroforética ...	49
b. Ajuste de la cantidad de proteína de las muestras de membranas que son separadas electroforéticamente.	50

2. ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO DE LAS LÍNEAS MUTANTES Y LA CANTIDAD DE ATPASA DE H ⁺ EN CONDICIONES DE ACLIMATACIÓN Y DE NO ACLIMATACIÓN	50
Comparación de la cantidad de ATPasa de plantas de los genotipos <i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> , <i>pfd 18-18</i> con la actividad de las plantas wt, todas en condiciones de no aclimatación y de aclimatación	51
3. INFLUENCIA DEL GENOTIPO DE LAS LÍNEAS MUTANTES SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNA 14-3-3 EN CONDICIONES DE ACLIMATACIÓN Y DE NO ACLIMATACIÓN	52
4. CONSIDERACIONES GENERALES	53
X. SÍNTESIS DE RESULTADOS	54
XI. CONCLUSIONES GENERALES	55
XII. PERSPECTIVAS	56
XIII. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS.

Figura 1. Representación de la ATPasa de H ⁺	15
Figura 2. Actividad de ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática de la línea silvestre (wt) y de mutantes en vías de señalización con (AC) y sin tratamiento de aclimatación (NA) (<i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> y <i>pflid 18-18</i>).....	19
Figura 2. Actividad de ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática de la línea silvestre (wt) y de mutantes en vías de señalización con (AC) y sin tratamiento de aclimatación (NA) (<i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> y <i>pflid 18-18</i>).....	20
Figura 4. Diagrama en donde se representa la metodología que se siguió para realizar este estudio.....	23
Figura 5. Perfil electroforético de vesículas de membrana plasmática de plantas del genotipo silvestre y líneas mutantes en vías de señalización (wt, <i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> , <i>pflid 18-18</i>) de <i>Arabidopsis thaliana</i> no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC).....	33
Figura 6. Detección de la ATPasa de H ⁺ por Western blot.....	34
Figura 7. Efecto del calentamiento de la muestra de proteína en la detección de la ATPasa de H ⁺ por inmunoréplica.....	35
Figura 8. Gel de control de carga para dos diferentes preparaciones, a y b, de vesículas de membrana plasmática en plantas silvestres y líneas mutantes en vías de señalización de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Figura 9. Inmunodetección de la ATPasa de H ⁺ en las preparaciones membranales de plantas del genotipo silvestre y líneas mutantes en vías de señalización (<i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> , <i>pflid 18-18</i>) de plantas NA y AC.....	37
Figura 10.....	38
Figura 11. Detección de niveles de ATPasa en preparaciones membranales de diferentes líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC).....	40
Figura 12. Detección de niveles de ATPasa en preparaciones membranales para diferentes líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) comparadas con los niveles de las plantas wt NA.....	41
Figura 13. Detección de niveles de ATPasa en preparaciones membranales para diferentes líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) comparadas con los niveles de las plantas NA para cada genotipo.....	42
Figura 14. Inmunodetección de la proteína 14-3-3 en preparaciones membranales de plantas NA y AC de los genotipos <i>mpk3</i> , <i>mpk6</i> , <i>pflid 18-18</i> y silvestre wt.....	43

Figura 15. Detección de niveles de proteína 14-3-3 en preparaciones membranales para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC).....44

Figura 16. Detección de niveles de proteína 14-3-3 en preparaciones membranales para diferentes líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*) y muestra silvestre (wt) de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC).....45

Figura 17. Detección de niveles de proteína 14-3-3 en preparaciones membranales para diferentes líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*) y silvestre (wt) de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC).....46

TABLAS.

Tabla 1. Líneas de *Arabidopsis thaliana* que se utilizaron para este estudio, de genotipos silvestre y líneas mutantes en vías de señalización aclimatadas (AC) y no aclimatadas (NA).....25

Tabla 2. Composición y preparación de la solución de Hoagland.....26

Tabla 3. Masas moleculares correspondientes a las 11 isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*, descritas en la literatura. Cada uno de los pesos está en kDa y se calculó según el procedimiento en <http://enzyme.expasy.org/EC/3.6.3.6>.....39

I. RESUMEN

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas realiza la hidrólisis de ATP acoplada al transporte de H⁺ desde el citoplasma hacia el espacio extracelular. Gracias a lo anterior, la enzima es esencial para el transporte secundario de solutos a través de las membranas, el alargamiento celular y la regulación de los pHs citoplásmico y extracelular. Se ha establecido que la ATPasa de H⁺ está regulada por fosforilación, asociación de proteínas 14-3-3, ambiente de lípidos membranales, así como por mecanismos en los que participan cinasas. El presente estudio se originó por la necesidad de entender lo que sucede a nivel bioquímico en las plantas bajo condiciones de estrés debido a las bajas temperaturas. Este estudio evaluó, por medio de la técnica de réplica en Western, la cantidad de ATPasa de H⁺ presente en diferentes muestras de vesículas de membrana plasmática obtenidas de diferentes líneas mutantes de *A. thaliana* (*mpk₆*, *mpk₃* y *pfl_d 18-18*). Éstas tienen defectos en elementos de señalización como son las MAP cinasas MPK3 y MPK6 y las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas en el cloroplasto antes y después del tratamiento de aclimatación a bajas temperaturas que conduce a una resistencia al congelamiento. Los resultados complementaron la determinación de las actividades enzimáticas reportadas previamente (Peña Moral, 2015). En esta tesis se estableció que los niveles de enzima no correspondieron a los niveles de actividad en los ocho casos (cada uno de los cuatro genotipos en condiciones control y de aclimatación), excepto en el caso de las plantas control del genotipo *mpk₃*, en el que el aumento de la actividad de la enzima en condiciones control sí correspondió al aumento encontrado en la enzima con respecto a los de la enzima en las plantas silvestres no aclimatadas. Los resultados anteriores indican que la aclimatación al frío induce cambios en la actividad de la ATPasa de H⁺ que no están relacionados con cambios en su cantidad en la membrana plasmática. También sugieren que la MPK3 actúa como un regulador negativo de la actividad de la ATPasa de H⁺ de las plantas silvestres en condiciones de temperatura ambiente. Estos resultados implican que la ATPasa de H⁺ es regulada por diferentes mecanismos tras la aclimatación al frío y en condiciones de no aclimatación también puede ser regulada por cascadas de MAP cinasas.

II. INTRODUCCIÓN

1. RESISTENCIA A BAJAS TEMPERATURAS

Los estreses abióticos (condiciones extremas de temperatura, concentraciones de sales, niveles de agua, oxidantes y metales pesados) afectan negativamente el crecimiento de las plantas y su productividad ya que desencadenan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Mahajan y Tuteja 2005). En particular, en el caso del estrés por bajas temperaturas no congelantes, se desencadena una compleja remodelación metabólica y estructural, la cual impide el crecimiento y desarrollo de la planta, pero algunas especies logran sobrevivir bajo temperaturas de congelación (Ruelland *et al.*, 2009). Durante el enfriamiento, la membrana celular es el sitio primario de la lesión y esto parece estar asociado con la fluidez de los lípidos de la membrana. Los componentes lipídicos determinan las propiedades físicas y químicas de las membranas celulares y se consideran los factores más importantes para la función de la membrana bajo condiciones de baja temperatura (Uemura 1995).

Para sobrevivir, las plantas responden y se adaptan al estrés a niveles moleculares y celulares, así como a niveles fisiológicos y bioquímicos (Hilker y Schmölling 2019). La desestabilización de la membrana resulta de la deshidratación inducida por congelación y es la causa principal de lesión en las plantas durante la aclimatación al frío (Uemura 1995).

La aclimatación es un proceso de exposición a temperaturas bajas por un tiempo determinado; esta exposición al frío promueve cambios en las células para que la planta pueda adaptarse y soportar descensos más pronunciados de temperatura, aún por debajo de los 0°C, lo cual se denomina tolerancia a la congelación (Levitt 1980). Durante la aclimatación al frío, se aumenta la estabilidad de la membrana plasmática. En parte, esto es una consecuencia de cambios en la composición de los lípidos que la conforman. Cuando se exponen a bajas temperaturas, las plantas tolerantes tienen la capacidad de establecer respuestas adaptativas apropiadas que les permiten mantener homeostasis celular. Esto se logra mediante complejos cambios metabólicos y de programación

génica destinados a proteger los componentes celulares con una restricción del crecimiento de la planta. Los cambios metabólicos originan la síntesis de moléculas crioprotectoras y de especies distintas de lípidos para remodelar las membranas (Uemura *et al.*, 1995; Martz *et al.*, 2006; Zuther *et al.*, 2019).

2. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Como todos los organismos eucarióticos, las células vegetales poseen diversos sistemas de transducción de señales que les permiten responder de forma específica a los estímulos externos. En los organismos multicelulares los mecanismos de transducción de señales forman redes de comunicación, que garantizan que la célula funcione y responda a una gran diversidad de estímulos y que a su vez funcione en coordinación con otras células (Saucedo-García *et al.*, 2015).

2.1. Sistemas de transducción de señales en respuesta al frío

La transducción de la señal de frío depende de una compleja red de señalización que desencadena y controla las modificaciones celulares y el reordenamiento metabólico (Uemura *et al.*, 1995; Amolkumar y Sharma, 2008; Saucedo-García *et al.*, 2015).

Las cascadas de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas) son frecuentemente empleadas dentro sistemas de transducción y se han asociado con diversos procesos fisiológicos y con respuestas a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (Yang *et al.*, 2003). También, las especies reactivas de oxígeno (ERO), fosfatos de inositol y calcio participan como moléculas señalizadoras ante distintos tipos de estímulos externos (Lv *et al.*, 2018). Así mismo, cuando el estrés por bajas temperaturas es detectado por la membrana y se lleva a cabo la transducción subsecuente de la señal, se llegan a desatar o estimular diferentes sistemas de transcripción de genes que facilitan la señalización en frío (Knigh y Knigh 2012; Zuther *et al.*, 2019).

2.1.1. Especies reactivas de oxígeno

Bajo una variedad de condiciones de estrés ambiental, incluyendo bajas temperaturas, sequía y salinidad, cuando el oxígeno molecular se reduce parcialmente, se generan ERO. Los estudios sugieren un papel dual para las ERO

en la biología vegetal como subproductos tóxicos pero también como moléculas señalizadoras (Apel y Hirt 2004; Mittler *et al.*, 2004; Dreyer y Dietz 2018). El papel de las ERO como moléculas de señalización se conserva entre todos los organismos aeróbicos (Raymond y Segrè 2006; Dickinson y Chang, 2011; Schippers *et al.*, 2012). En el estrés por frío hay una gran generación de ERO como peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo e ion superóxido. Aun cuando la célula vegetal induce la síntesis de moléculas protectoras tras la generación de ERO, el exceso de estas especies reactivas puede resultar dañino para las plantas (Dreyer y Dietz 2018).

2.1.2. MAP cinasas

Las cascadas de proteínas cinasas activadas por estrés abiótico o biótico son procesos de señalización altamente conservados en eucariotas. Estas cascadas se activan después de que las señales son percibidas por los receptores de membrana de la célula (Widmann *et al.*, 1999; Ling 2015). La principal función de las proteínas cinasas consiste en transducir los estímulos reconocidos extracelularmente por los receptores de la célula, para transmitir esa información y generar respuestas intracelulares altamente específicas (Ichimura *et al.*, 2002). Son tres elementos los que integran las cascadas de MAP cinasas: una MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAP cinasa), una MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) y una MAPK (MAP cinasa). No existe una asociación directa entre las MAP cinasas y los receptores membranales, sino que hay intermediarios que sí pueden estar relacionados directamente, como son las proteínas G y proteínas C, pero en plantas, estos intermediarios no existen y sus equivalentes son desconocidos (Meskiene y Hirt 2000).

3. LA MEMBRANA PLASMÁTICA COMO RECEPTOR EN EL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN RESPUESTA AL FRÍO

Las membranas están implicadas en casi todos los procesos biológicos incluyendo: establecer y mantener gradientes trans-membranales, compartimentalizar las reacciones bioquímicas en distintos dominios funcionales, controlar el transporte dentro y fuera de las células, comunicar a la célula con el exterior, participar en el reconocimiento celular y en eventos de transducción de señales y energía. La membrana plasmática está compuesta por cientos de

especies de proteínas, miles de variantes de lípidos y numerosos tipos de carbohidratos superficiales (Stillwell 2013). Gracias a la impermeabilidad intrínseca de la parte lipídica de la membrana plasmática se logra mantener el gradiente de concentraciones de solutos, así como la diferencia de carga eléctrica necesaria para que se lleve a cabo el metabolismo celular (Luckey 2014). El efecto primario de la temperatura sobre la membrana celular se cree que está relacionado con la fluidez de los lípidos, componentes que determinan las propiedades físicas y químicas de las membranas celulares y se consideran los factores más importantes para su función bajo condiciones de baja temperatura (Steponkus 1984; Uemura y Yoshida 1984). La membrana plasmática al estar expuesta a estrés por frío sufre cambios en la fluidez, afectándose la estabilidad de la estructura de algunas proteínas (Uemura *et al.*, 1995). Se cree que el cambio de la fluidez de la bicapa lipídica inducido por el frío desencadena la respuesta intracelular a la baja temperatura, ya que no se ha descrito un receptor a frío en la membrana plasmática (Ruelland *et al.*, 2009).

3.1. Cambio en la composición lipídica de la membrana en respuesta al frío

La composición lipídica de las membranas plasmática y vacuolar de las plantas es diferente a las otras membranas celulares en cuanto a que hay una alta proporción de esteroides y esfingolípidos. Los lípidos de las membranas tienen una parte hidrofóbica y una hidrofílica, estas biomoléculas integran la matriz membranal formando una bicapa, la cual se conoce como la base de todas las membranas celulares (Luckey 2014). La membrana plasmática está conformada por cuatro tipos de lípidos: glicerolípidos, esteroides, esfingolípidos y terpenos. Cuando las plantas son expuestas a bajas temperaturas, la permeabilidad de la membrana de las células aumenta y hay un cambio en su fluidez (Guy 1990). Los cambios de la membrana en las bajas temperaturas se refieren a la redistribución posicional de ácidos grasos saturados e insaturados (Hughes y Dunn 1996). Durante la aclimatación al frío en *Arabidopsis*, el porcentaje de fosfolípidos aumenta y la proporción de esfingolípidos específicos y esteroides libres disminuye. Una de las modificaciones estructurales de los lípidos membranales en respuesta a las bajas temperaturas es la insaturación de los ácidos grasos de glicerolípidos y esfingolípidos (Uemura *et al.*, 1995). Se sabe que esto sucede gracias a la

activación de genes de desaturasas como parte de la reprogramación génica que sufre la planta durante la aclimatación al frío (Welti *et al.* 2002; Chen y Thelen 2013; Zuther *et al.*, 2019).

3.2. La ATPasa de H⁺

En todos los eucariontes, el potencial de la membrana plasmática y los sistemas de transporte secundario son energizados por la actividad de bombas membranales como la ATPasa de H⁺ tipo P (bomba de protones) en plantas y hongos y la ATPasa Na⁺/K⁺ (bomba sodio-potasio) en animales (Skou y Esmann 1992).

La ATPasa de H⁺ es una proteína de la membrana plasmática de las plantas. Esta proteína pertenece a una gran superfamilia de bombas iónicas denominadas ATPasas tipo-P (Axelsen y Palmgren 2001). La ATPasa de H⁺ es un monómero funcional con una masa molecular de aproximadamente 100 kDa que puede formar un dímero o hexámero (Briskin y Reynolds-Niesman 1989; Kanczewska *et al.*, 2005). La ATPasa de H⁺ transporta activamente H⁺ hacia el espacio extracelular en paralelo con la hidrólisis de ATP, creando un gradiente electroquímico de H⁺ a través de la membrana plasmática para el mantenimiento del potencial de membrana y la homeostasis (Duby y Boutry 2009).

Por otro lado, esta enzima controla los principales procesos de transporte en la planta, como la absorción de nutrientes de las raíces y la carga del xilema o del floema. Además, esta bomba está implicada en otras funciones fisiológicas importantes, tales como apertura de estomas, la elongación celular y la regulación del pH celular. La generación de un gradiente electroquímico a través de la membrana da como resultado una fuerza motriz del protón que es utilizada por el transporte secundario para la asimilación de diversos nutrientes y también para liberar iones y sustancias tóxicas de las células (Serrano 1989; 1990).

Se sabe que la ATPasa de H⁺ está regulada por señales fisiológicas tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Portillo 2000). Datos publicados indican que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se modula a baja temperatura mediante cambios en los lípidos asociados con la bomba de protones de la membrana plasmática (Kasamo 2003; Lindberg *et al.*, 2005; Martz *et al.*, 2006).

3.2.1. Estructura

La ATPasa de H⁺ es una única cadena polipeptídica funcional, con una masa aproximada de 100 kDa. La proteína puede oligomerizarse para formar complejos diméricos y hexaméricos. Se cuenta con la estructura cristalográfica de la ATPasa de H⁺ (Figura 1). Gracias a ello se sabe que la ATPasa de H⁺ tiene 10 dominios transmembranales los cuales están compuestos por tramos de entre 15 y 30 aminoácidos; el 70% de la proteína es hidrofílica, por lo que se encuentra en el citoplasma y el 5% está expuesto hacia la superficie extracelular; los grupos carboxilo y amino terminal de la ATPasa de H⁺ se encuentran en el citoplasma de la célula. El resto de la proteína está embebido en la membrana plasmática (Kasamo 2003; Duby y Boutry 2009).

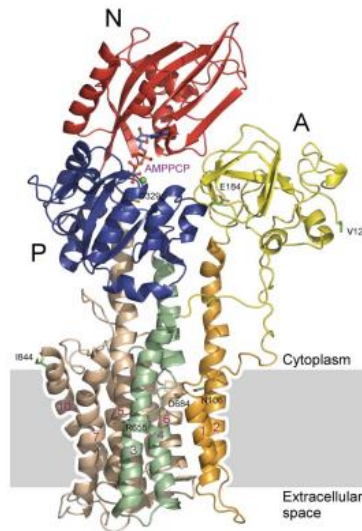


Figura 1. Representación de la ATPasa de H⁺. Se presentan los cuatro dominios reconocidos, en azul el dominio de fosforilación (P), en rojo el dominio de unión a nucleótidos (N), en amarillo el segmento amino terminal (A) y en café el dominio lipídico. Tomado de Pedersen *et al.*, 2007.

Con más detalle, la estructura de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática consiste en los dominios A, M, P, N, y R. El dominio A (activador) consiste en el segmento amino terminal. El dominio membranal (M) corresponde a un dominio transmembranal con diez hélices, M1 a M10. El dominio de fosforilación (P) se encuentra unido a los segmentos M4 y M5 que están en la membrana. El dominio de unión a nucleótido (N) está situado entre dos partes de la secuencia de la formación del dominio P. El dominio regulador (R) consiste en el

fragmento carboxilo terminal de la proteína que actúa como un dominio autoinhibitorio (Pedersen *et al.*, 2007; Duby y Boutry 2009).

3.2.2. Función molecular

El sitio catalítico de la ATPasa de H⁺ se encarga de llevar a cabo la hidrólisis del ATP en complejo con el Mg. El ciclo catalítico de la ATPasa de H⁺ se describe por dos estados conformacionales principales, E1 y E2. En la conformación E1, el sitio de unión transmembranal tiene una alta afinidad por el protón y para el ATP, mientras que en el mismo sitio E2 tiene una baja afinidad para ambos ligandos. Los cambios conformacionales en estos dominios durante la catálisis conducen a movimientos simultáneos en la parte de la membrana que dirige el transporte de protones. La unidad de transporte de la bomba de protones de membrana se define por un aceptor/ donador de protones situado en el centro, un único residuo de ácido aspártico protonable (Asp684), un residuo de asparagina (Asn106), un residuo de arginina (Arg655) y una gran cavidad central (Pedersen *et al.*, 2007). Energéticamente, la reacción de hidrólisis de ATP es exergónica y por tanto espontánea y libera energía. Esta es acoplada al transporte de H⁺ que es una reacción endergónica y requiere de esa energía, ya que el bombeo de H⁺ ocurre en contra de su gradiente de concentración, al moverse los iones del citosol al espacio extracelular (Palmgren 2001).

3.2.3. Función fisiológica

Se sabe que todas las células de las plantas expresan a la ATPasa de H⁺. Sin embargo, se ha encontrado que la abundancia de esta proteína varía en diferentes tipos de células y tejidos, lo cual está en función de la demanda fisiológica.

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática participa en diferentes funciones fisiológicas importantes como son:

Transporte secundario

El principal papel de la ATPasa de H⁺ es activar el transporte secundario. Por ejemplo, en las raíces el transporte es para la absorción de los nutrientes del suelo y su translocación hacia las partes aéreas de la planta. Por ello, se han observado altas cantidades ATPasa de H⁺ en las raíces, las células epidérmicas,

las de la endodermis y las del floema (Parets-Soler *et al.*, 1990; Logan *et al.*, 1997; Jahn *et al.*, 1998).

Elongación celular

La ATPasa de H⁺ juega un papel importante en el crecimiento celular. La llamada teoría del "crecimiento ácido" sugiere que los protones extruidos por la ATPasa de H⁺ disminuyen el pH apoplástico y activan a las enzimas implicadas en el aflojamiento de la pared celular necesario para el alargamiento celular (Hager 2003).

Tolerancia a la salinidad

La tolerancia a la salinidad depende en algunos casos de transportadores secundarios, para evitar su acumulación en el citoplasma, ya que el NaCl es tóxico para las células vegetales. Debido a lo anterior, las plantas han desarrollado diversos mecanismos que implican transporte secundario para mover el Na fuera de las células. La energía para extruir este ión está dada por el gradiente electroquímico de H⁺ promovido por la ATPasa de H⁺ (Niu *et al.*, 1993; Reuveni *et al.*, 1993).

Apertura de estomas y osmorregulación

La apertura y el cierre de estomas se llevan a cabo por la expansión y la contracción de las células guarda, lo cual resulta de los flujos masivos de iones y agua a través de canales específicos (Fairley-Grenot y Assmann 1991; MacRobbie 1998). El papel de la ATPasa de H⁺ en este transporte es proporcionar el potencial electroquímico requerido para impulsar el movimiento de iones, pero también para controlar la apertura/cierre de canales con la diferencia de voltaje producida por el transporte de H⁺. De manera similar, la actividad de la ATPasa de H⁺ también puede estar implicada en otros fenómenos relacionados con la turgencia celular, tales como los movimientos de las hojas (Becker *et al.*, 1993; Cote 1995).

Regulación del pH intracelular

Esta bomba también está implicada en la regulación intra y extracelular del pH. La acidificación del citosol activa la bomba de protones de la membrana plasmática y mejora la extrusión de protones desde el citosol hasta el apoplasto. Esto contribuye a la alcalinización del citosol, el pH interno se mantiene a pH 7.5,

si bien el pH óptimo de la ATPasa de H⁺ está ligeramente por debajo de 7.0 (Luo *et al.*, 1999; Kurkdjian y Guern 1989).

4. REGULACIÓN DE LA ATPasa DE H⁺ POR LA PROTEÍNA 14-3-3

La fosforilación y defosforilación de proteínas es un ejemplo muy común de modificación post-traducciona que tiene el potencial de alterar la actividad de las proteínas. La actividad de la ATPasa de H⁺ es bien conocida por ser regulada por las proteínas 14-3-3, la asociación de las cuales requiere la fosforilación del penúltimo residuo Thr 947 de la ATPasa de H⁺. La unión de la proteína reguladora 14-3-3 desplaza el dominio R inhibitorio. El dominio R contiene dos regiones (I y II), de aproximadamente 20 residuos cada una, que contribuyen a mantener la enzima a un bajo nivel de actividad. La mutagénesis de estas regiones suprime el efecto inhibitorio de la región del carboxilo terminal. La unión de la proteína 14-3-3 a la ATPasa de H⁺ se estabiliza por la fusicoccina, toxina fúngica, lo que disminuye la velocidad de disociación de la proteína 14-3-3. Un dímero de proteínas 14-3-3 se une de forma simultánea a dos polipéptidos conteniendo la región del carboxilo terminal, por lo que un estado de alta actividad de la ATPasa de H⁺ podría implicar la formación de dímeros o complejos multiméricos (Piette *et al.*, 2011; Speth *et al.*, 2010).

III. ANTECEDENTES

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que la actividad de la ATPasa de H^+ disminuye después del tratamiento de aclimatación (AC) en plantas silvestres (wt) y en mutantes en vías de señalización (Peña Moral 2015). En la Figura 2 se observa que en las plantas silvestres (wt), la disminución de la actividad fue de aproximadamente 50%. En dos mutantes que no expresan a las cinasas MPK3 y MPK6, las cuales se encargan de transducir los estímulos reconocidos extracelularmente por los receptores de la célula, se observó que había una disminución muy marcada en la actividad y que fue de aproximadamente 70%. Por el contrario, en el caso de la mutante *pflid 18-18* que expresa una menor formación de especies reactivas de oxígeno en el cloroplasto, se observó que la actividad de la ATPasa de H^+ aumentaba en la muestra que fue aclimatada (AC), este aumento fue de aproximadamente 20% con respecto a la muestra no aclimatada (NA).

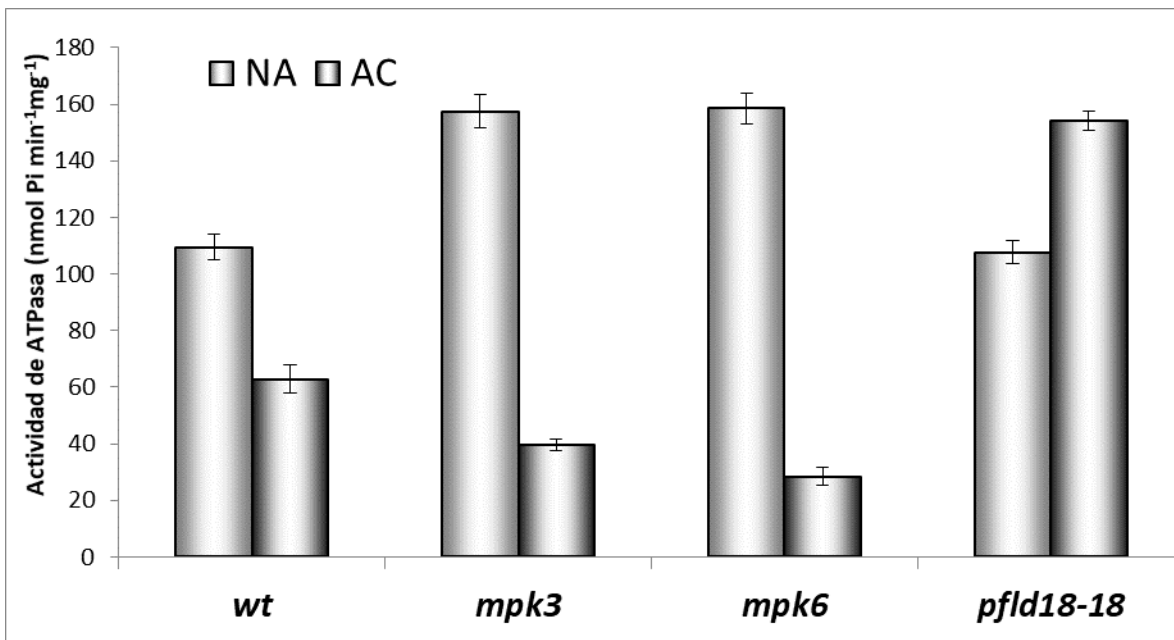


Figura 2. Actividad de ATPasa de H^+ de membrana plasmática de la línea silvestre (wt) y de mutantes en vías de señalización con (AC) y sin tratamiento de aclimatación (NA) (*mpk3*, *mpk6* y *pflid 18-18*). Tomado de Peña Moral 2015.

También se reportó que las plantas wt, *mpk3* y *pflid 18-18* con disminución en la actividad de la ATPasa de H^+ , sobreviven después de 80 min de exposición a $-15^{\circ}C$ (Cano Ramírez 2014). Sin embargo, la mutante *mpk6*, a diferencia de los

otros tres genotipos, no sobrevive a temperaturas congelantes. El registro fotográfico realizado se observa en la Fig. 3.

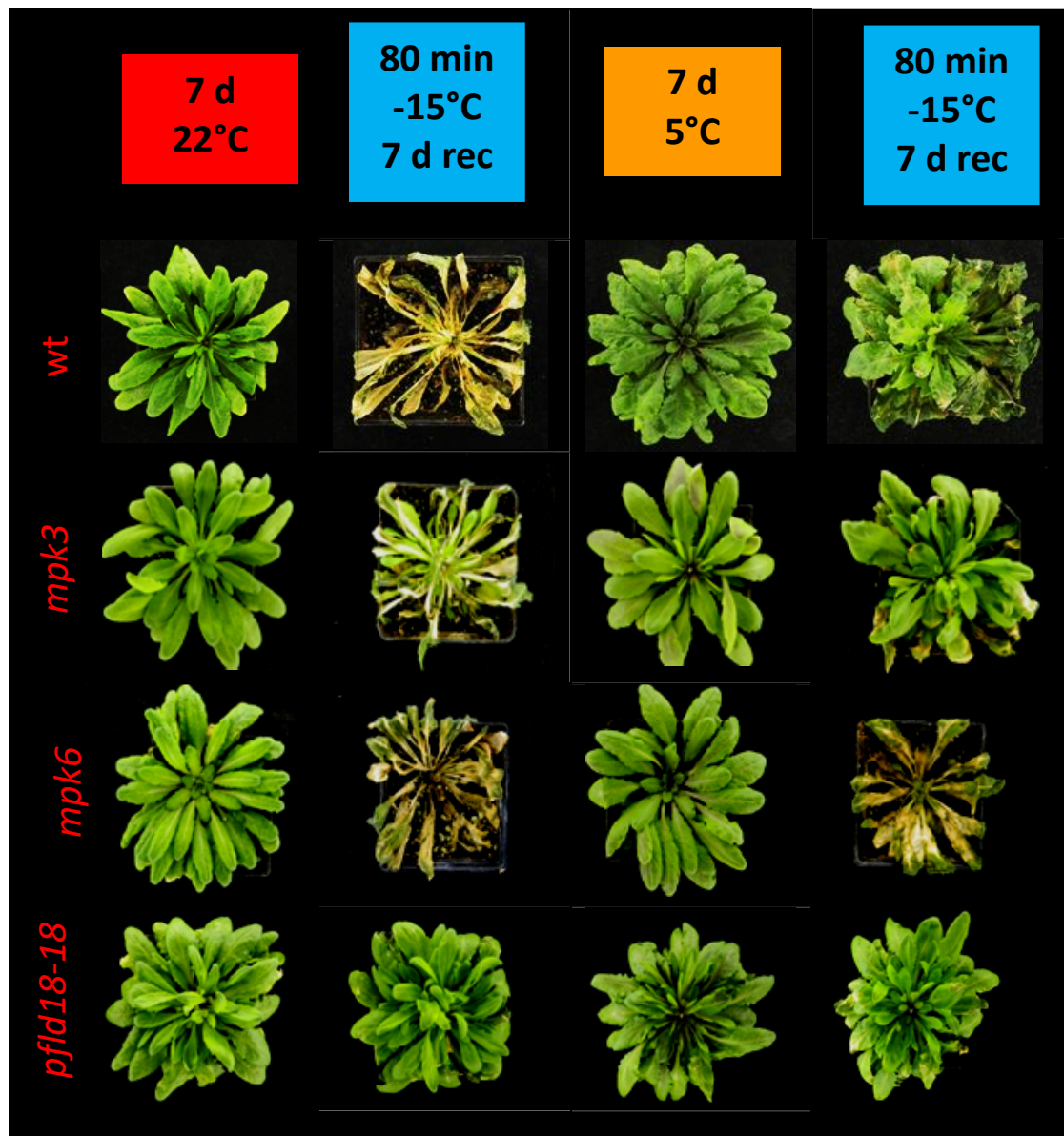


Figura 3. Efecto de la aclimatación a bajas temperaturas en los fenotipos de plantas silvestres y de líneas mutantes en vías de señalización. Plantas adultas del genotipo silvestre y de las líneas mutantes *mpk3*, *mpk6* y *pfld 18-18* se expusieron a 22°C (NA, no aclimatación) o 5°C (AC, aclimatación) por 7 días y posteriormente fueron expuestas a temperatura bajo cero por 80 min (-15°C, reto). El registro fotográfico de las plantas AC y NA se realizó al término de la AC y una semana después del reto. Tomado de Cano Ramírez 2014.

En la Figura 3, se observa que para la línea silvestre, la planta que no fue aclimataada 7 días a 5°C no sobrevivió después de haber sido expuesta a temperatura congelante (-15°C) durante 80 min. Mientras que las plantas de la línea silvestre que pasaron por el tratamiento de aclimatación (AC, 7 días a 5°C),

sí sobrevivieron al reto de temperatura congelante (-15°C). Este mismo comportamiento lo presentó la mutante *mpk3*, es decir, las plantas NA, no fueron capaces de sobrevivir a la temperatura de -15°C, mientras que las plantas AC, sobrevivieron al reto de temperaturas congelantes. La mutante *mpk6* no sobrevivió a temperaturas congelantes con o sin tratamiento de aclimatación. En el caso particular de la mutante *pfl1 18-18*, sobrevivió a temperaturas congelantes aun cuando no había sido aclimatada.

Más recientemente, Rueda Luna (2015) encontró que los niveles de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre y de 4 líneas mutantes en la síntesis de esfingolípidos que pasaron por un proceso de NA o AC, no cambiaba, por lo que se dedujo que la baja actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en plantas de *Arabidopsis thaliana* AC no estaba relacionada con un descenso en la cantidad de dicha enzima. Por otro lado se encontró que los niveles de la proteína 14-3-3, la cual estabiliza el efecto activador de la fosforilación de la ATPasa de H⁺, no variaban después de la aclimatación, por lo que la disminución de la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las plantas silvestres y en las líneas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos no estaba relacionada con una disminución en la presencia de la proteína 14-3-3.

IV. HIPÓTESIS

Los cambios de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas que no expresan a las cinasas MPK3, MPK6 y que presentan reducción en las ERO del cloroplasto, dependen de la cantidad de enzima cuando son expuestas a un proceso de aclimatación al frío.

V. OBJETIVO

Determinar si los cambios en la actividad de ATPasa de H⁺ en las líneas *mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18* de *Arabidopsis thaliana* se deben a diferencias en la cantidad de enzima presente en la membrana plasmática.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar las condiciones de detección de la ATPasa de H⁺ utilizando la técnica de Western blot, en vesículas de membrana plasmática de plantas con los genotipos *wt*, *mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*.
- Estimar la cantidad de ATPasa de H⁺ utilizando la técnica de Western blot en vesículas de membrana plasmática de las plantas utilizando los genotipos *wt*, *mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18* con y sin tratamiento de aclimatación.
- Estimar la cantidad de proteína 14-3-3 utilizando la técnica de Western blot, en vesículas de membrana plasmática de plantas con los genotipos *wt*, *mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18* con y sin tratamiento de aclimatación.
- Analizar las réplicas obtenidas por densitometría y aplicar las pruebas estadísticas correspondientes.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo abarcó una estrategia que incluyó el empleo de líneas de *Arabidopsis thaliana* que fueron tratadas en condiciones de AC y NA y de las cuales se aislaron vesículas de membrana plasmática que se utilizaron para estimar los niveles de ATPasa de H⁺ por inmunodetección (Figura 4).

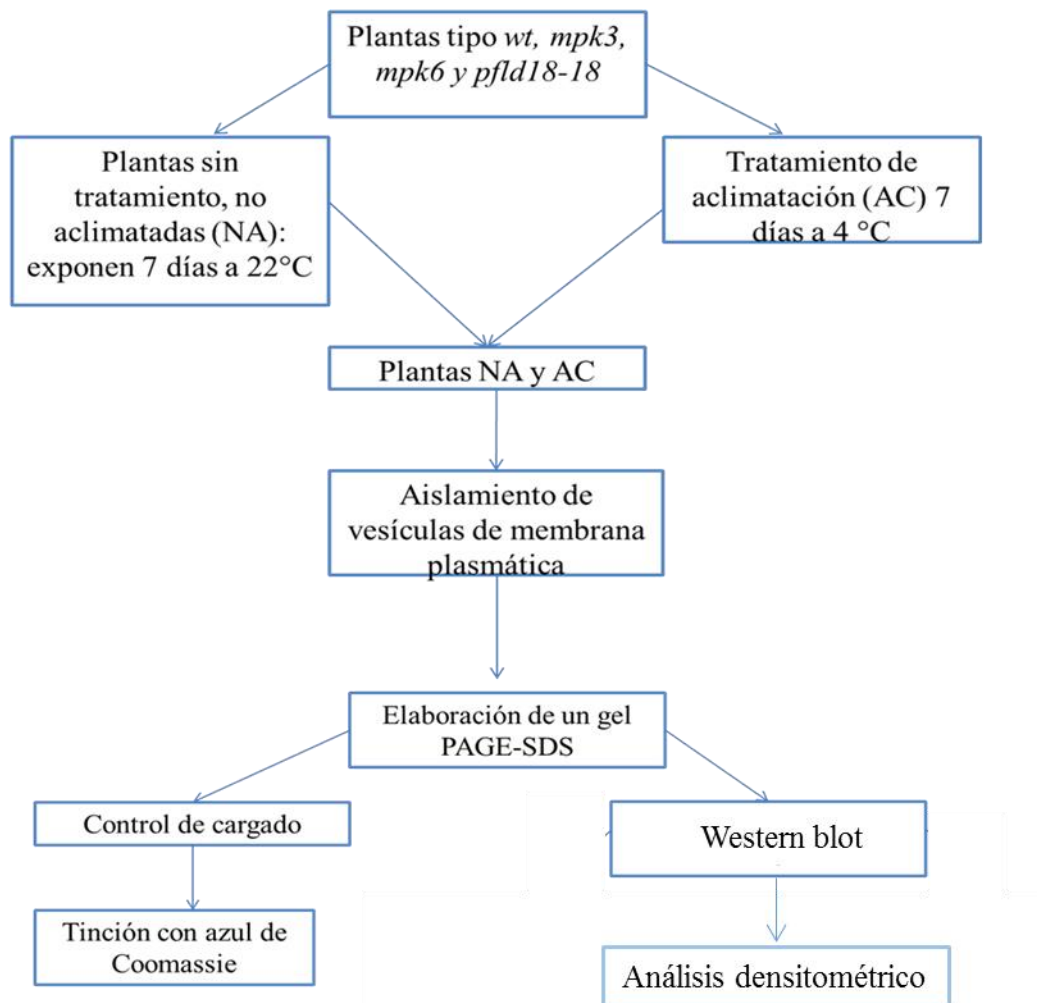


Figura 4. Diagrama en donde se representa la metodología que se siguió para realizar este estudio.

2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre (wt), así como de líneas mutantes en vías de señalización: *mpk3*, *mpk6* y *pfl1 18-18* (Tabla 1).

3. MÉTODOS









3.1. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron sobre sustrato contenido en macetas de plástico. El sustrato se preparó mezclando 3 partes de Mix 4 Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 1 parte de vermiculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.) y 1 parte de agrolita (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo. de México). Posteriormente la mezcla se humedeció con agua corriente. Se colocaron las semillas en la superficie del sustrato, cuidando que quedaran esparcidas. Las macetas se mantuvieron en el invernadero con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Se regaron con agua con un atomizador para mantenerlas húmedas.

3.2. CRECIMIENTO HASTA PLANTAS ADULTAS

Una vez que se llegó al estadio de plántulas (después de 3-4 semanas), éstas se transfirieron a nuevo sustrato en macetas o maceteros colocando de una a tres plántulas por maceta con mucho cuidado, utilizando espátulas y/o pinzas. Las macetas se colocaron charolas y se cubrieron con domos transparentes para mantener la humedad. Se regaron tres veces por semana, procurando regar por la orilla de la superficie de cada maceta o bien con atomizador. Las plantas se mantuvieron en invernadero con un fotoperiodo natural y aire acondicionado o bien con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25°C. Si la luz natural era muy intensa, se cubrieron los domos con servitoallas. Las macetas y maceteros, así como las charolas, se lavaron previamente con HClO₄ comercial al 30% (Cloralex®).

Tabla 1. Líneas de *Arabidopsis thaliana* que se utilizaron para este estudio, de genotipos silvestre y líneas mutantes en vías de señalización aclimatadas (AC) y no aclimatadas (NA).

Nombre	Gen alterado	Fenotipo	Planta NA	Planta AC
			7 días a 22°C	7 días a 4°C
WT Col-0	Ninguno	Normal		
<i>mpk3</i>	MPK3	No expresa a la MAP cinasa MPK3		
<i>mpk6</i>	MPK6	No expresa a la MAP cinasa MPK6		
<i>pfl1 18-18</i>	Inserción de un gen de una flavodoxina bacteriana.	Reducción en las especies reactivas de oxígeno generadas en los cloroplastos.		

Alrededor de las cuatro semanas de edad de las plantas, los domos se removieron para permitir una mejor exposición a la luz. Se continuó regando de dos a tres veces por semana. A los dos meses de edad, aproximadamente, se inició el riego una o dos veces a la semana con solución nutritiva de Hoagland (Tabla 2).

Tabla 2. Composición y preparación de la solución de Hoagland.

MACRONUTRIENTES				
REACTIVOS	Peso molecular (g/mol)	1X g/L	10X g/L	10X g/5L
6 mM KNO₃	101.1	0.6066	6.066	30.33
4 mM Ca (NO₃)₂-4H₂O	236.2	0.9448	9.448	47.24
1 mM NH₄H₂PO₄	115.03	0.1150	1.150	5.75
2 mM MgSO₄-7H₂O	246.5	0.4930	4.930	24.65

MICRONUTRIENTES				
REACTIVOS	Peso molecular (g/mol)	1X g/L	10X g/L	10X g/2L
0.009 mM MnCl₂-4H₂O	197.91	0.000178	0.178	0.3560
0.046 mM H₃BO₃	67.83	0.00284	0.2844	0.5688
0.0008 mM ZnSO₄-7H₂O	287.54	0.00023	0.0230	0.0460
0.0003 mM CuSO₄-5H₂O	249.68	0.000749	0.0749	0.1498
0.0001 mM H₂MoO₄-H₂O	179.98	0.0000179	0.00179	0.00358

MEDIO DE HOAGLAND				
SOLUCIONES	Volumen	1 L	5 L	20 L
Macronutrientes (10X)		100 mL	500 mL	2 L
Micronutrientes (100X)		10 mL	50 mL	200 mL
Fe-EDTA (1 g/ 200 mL)		1 mL	5mL	L

3.3. COSECHA DE HOJAS

Una vez que las plantas alcanzaron la edad y tamaño deseado (al cabo de dos meses y medio aproximadamente), se procedió a cosechar las hojas, cortando con tijeras toda el área foliar que incluye tanto hojas jóvenes como adultas, pero no tallos ni raíces. En caso de que se presentaran hojas con clorosis, no se consideraron o se removió la parte afectada con tijeras, dejando la parte sana de la hoja. Una vez cosechadas la hojas, se pesaron paquetes de 25 g aproximadamente y se envolvieron en papel aluminio anotando el peso neto y se congelaron con N₂ líquido inmediatamente. Los paquetes se almacenaron en

bolsas a -70°C hasta su uso para la obtención de vesículas de membrana plasmática.

3.4. OBTENCIÓN DE FRACCIÓN MICROSOMAL

Las fracciones microsomales, que son las vesículas de todas las membranas y organelas de la célula, se obtuvieron a partir de un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial descrita por Carmona-Salazar *et al.* (2011).

3.5. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Las vesículas de membrana plasmática se aislaron apartir de las fracciones microsomales utilizando un sistema de distribución de las membranas subcelulares en un sistema de dos polímeros acuosos (polietilenglicol y dextran X-100) [Carmona-Salazar *et al.*, 2011].

3.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Las proteínas de las vesículas de membrana plasmática se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS de acuerdo a la técnica descrita por Shägger y Von Jagow (1987). El procedimiento que se utilizó fue el siguiente:

- A. Se limpiaron los lados de los vidrios que van a estar en contacto con el gel con un poco de Dodecirl sulfato de sodio (SDS) al 3%.
- B. Los vidrios se montaron en el soporte cuidando que el ensamblado no tuviera fugas, comprobándolo con un poco de H_2O destilada. Se retiró el agua y se secó el interior de los vidrios con ayuda de papel filtro.
- C. Preparación del gel separador. En un vaso de precipitados se añadieron los siguientes reactivos en el orden descrito:
 - a. 1631.9 μL de acrilamida-bis acrilamida (10-0.3%).
 - b. 1631.9 μL de amortiguador del gel (Tris-SDS pH= 8.9).
 - c. 660.16 μL de glicerol.
 - d. 990.98 μL de H_2O desionizada.

- e. 25 μ L de persulfato de amonio al 10%.
- f. 2 μ L de Tetrametiletildiamina (Temed).

Se mezclaron los reactivos una vez que todos fueron añadidos e inmediatamente se vertió la mezcla entre los vidrios. Una vez lleno el espacio entre los vidrios, se añadió un poco de SDS 0.3% sobre el gel para evitar la formación de una superficie cóncava de menisco y se dejó polimerizar 30 min.

- D. Una vez que polimerizó este gel (gel separador), se retiró el SDS y se enjuagó con un poco de H₂O desionizada, secando el exceso de líquido con ayuda de tiras de papel filtro.
- E. Se preparó el gel concentrador en un vaso añadiendo los reactivos en el orden descrito:
 - a. 264.25 μ L de acrilamida-bis acrilamida (10-0.3%).
 - b. 495.5 μ L de amortiguador del gel (Tris-SDS pH= 8.9).
 - c. 1221.15 μ L de H₂O desionizada.
 - d. 16.5 μ L de persulfato de amonio 10%.
 - e. 1.65 μ L de Tetrametiletildiamina (Temed).
- F. Se vació un poco del gel concentrador encima del gel separador y se colocó el peine de 15 o 10 pozos (dependiendo del número de muestras experimentales) introduciéndolo casi hasta el final de la marca en donde terminan los pozos marcados por el peine.
- G. Se dejó polimerizar entre 45 min y 1 h a temperatura ambiente, observando que no se contrajeran los carriles, si esto ocurría, se agregó más gel concentrador.
- H. Una vez que el gel polimerizó, se retiró el peine cuidadosamente para no dañar los carriles formados.

- I. Las placas de vidrio conteniendo el gel entre ellas, se fijaron al soporte de la cámara de electroforesis.
- J. Se llenó la cámara superior del soporte con el amortiguador del cátodo casi hasta arriba de las placas de vidrio.
- K. Se cargaron marcadores comerciales de pesos moleculares en el primer carril del gel concentrador y en los siguientes las muestras correspondientes, cuidando que se cargaran no solo cantidades iguales de proteína, sino que ellas estuvieran contenidas en aproximadamente el mismo volumen, ajustando la diferencia con buffer de ajuste de peso, para evitar distorsión en los carriles.
- L. Se colocó el amortiguador del ánodo en la cámara de electroforesis hasta cubrir por completo los primeros tornillos de las placas del gel.
- M. 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. Se dejó correr el gel a 60 volts por 30 min (para que las muestras se apilaran en una línea en el gel concentrador) y posteriormente a 100 volts por 2 a 3 h (se sobrecorrió el gel para poder visualizar la banda de ATPasa).

3.7. TINCIÓN DE GELES CON AZUL DE COOMASSIE

Después de la separación de las proteínas por electroforesis, se realizó la tinción de proteínas con azul de Coomassie (Azul brillante G 250). Primero se fijaron las proteínas al gel con una solución de metanol 50% y ácido acético 10% durante 2 h con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñó el gel con la solución azul de Coomassie por 30 min con agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se destiñó con una solución de metanol al 50% y de ácido acético al 10% manteniendo en agitación constante hasta que aparecieron las bandas. Se almacenó en una solución de glicerol 5%.

3.8. SECADO DE GELES

Los geles recién teñidos se escanearon en el Fotodocumentador ChemiDoc y posteriormente se secaron para preservarlos. Por último, el gel se colocó entre una hoja de papel absorbente 3M y papel celofán previamente humedecidos y se

alisó la superficie para eliminar burbujas, luego fue puesto en el equipo Gel Dryer (Model 583 Bio-Rad) durante 2 h a 80°C.

3.9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ATPASA: TÉCNICA DE WESTERN BLOT O INMUNORÉPLICA

Una vez que las proteínas se separaron en los geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) como se describe a continuación:

- A. Una vez que se corrió la electroforesis el gel se removió de las placas de vidrio y sin fijarlo ni teñirlo, se colocó en un recipiente con solución amortiguadora de transferencia por 15-30 min a temperatura ambiente y en agitación constante.
- B. Se armó un cassette que contenía una capa de esponja saturada con solución amortiguadora de transferencia. Sobre la esponja se colocó un cuadro de papel filtro empapado en disolución amortiguadora de transferencia, encima del papel se colocó el gel ya incubado en solución amortiguadora de transferencia y sobre éste se puso una membrana de PVDF del tamaño del gel o de los carriles a transferir y previamente humedecida con metanol y solución amortiguadora de transferencia; sobre la membrana se colocó otro papel filtro humedecido con solución amortiguadora de transferencia, se añadió otra esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia y se cerró la rejilla para completar el cassette.
- C. Se colocó el cassette en la cámara de electrotransferencia de tal manera que el gel estuviera orientado hacia el cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo. La cámara tenía solución amortiguadora de transferencia cubriendo el cassette.
- D. Se encendió la fuente de poder y se realizó la electrotransferencia a 22 volts por 2 h 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se apagó la cámara, se removió el cassette y se removió la membrana de PVDF a un recipiente. Se realizó un lavado rápido con H₂O destilada y se añadieron 4 mL del primer reactivo Pierce® Western Blot Signal Enhancer, que se deja actuar

por 2 min. Después se realizaron 5 lavados rápidos con H₂O desionizada. Una vez realizados los lavados, se añadieron 4 mL del segundo reactivo Pierce® Western Blot Signal Enhancer y se incubó por 10 min. Al finalizar, se realizaron 5 lavados rápidos con H₂O desionizada.

E. Posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

a. Bloqueo: La membrana fue colocada en una solución de leche descremada en polvo Svelty™ al 2% en Tampón tri salino (TBS) por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente.

b. Primer anticuerpo: Se colocó la membrana en una bolsita de plástico a la medida y que contenía el primer anticuerpo (anti-ATPasa de H⁺ de Agrisera, 1:1000 v:v de solución bloqueadora; o el anti-14-3-3 de *Arabidopsis* 1:15000 v:v de solución bloqueadora) disuelto en una solución 2% de leche desgrasada en TBS durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad.

c. Segundo anticuerpo: Se colocó la membrana en una solución con el segundo anticuerpo (Fosfatasa alcalina 1:1000 en 2% de leche desgrasada-TBS) por 2 h en agitación constante a temperatura ambiente.

d. Revelado: Se añadió la solución para desarrollar color (BCIP-NBT).

3.10. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Una vez que las membranas de PVDF se revelaron, se realizó el análisis densitométrico de cada una de las diferentes bandas correspondientes a la ATPasa de H⁺ (100 kDa) y de la proteína 14-3-3 (32kDa) de cada una de las membranas de PVDF, para lo que se utilizó el programa QuantityOne de Bio Rad. Se obtuvo una tabla con resultados de la densidad de cada una de las bandas de las diferentes muestras. Se tomó como referencia la columna correspondiente a “suma de las intensidades” para realizar los gráficos.

4. SOLUCIONES PARA LOS GELES DE POLICARILAMIDA-SDS Y LA TRANSFERENCIA EN WESTERN

- a. Amortiguador del gel (Tris-SDS pH 8.9).
- b. Glicerol.
- c. H₂O desionizada.
- d. Persulfato de amonio 10%.
- e. Tetrametiletildiamina (Temed).
- f. Amortiguador del cátodo [Tris 0.1 M (12.1g/L); Tricina 0.1 M (17.93g/L); SDS 0.1% (1g/L)].
- g. Amortiguador del ánodo [Tris 0.2 M (24.23 g/L) pH 8.9 ajustado con HCl].
- h. Solución teñidora de azul de Coomassie [1.5 g azul de Coomassie; 375 ml metanol; 200 ml ácido acético; 950 ml agua destilada].
- i. Solución fijadora [10% ácido acético (10 ml); 90 ml agua destilada].
- j. Solución desteñidora [375 ml etanol; 75 ml ácido acético; 375 ml agua destilada].
- k. Glicerol al 5% [5 ml glicerol; 95 ml agua destilada].
- l. Disolución amortiguadora de transferencia para Western Blot [15 ml solución 1 M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8; 200 ml de metanol; 5 ml sol. SDS al 10%. Aforar todo a 1 L].
- m. Disolución amortiguadora a pH 7.5 (Tris-solución salina, TBS) [Tris 0.2 M (2.4228 g/L); NaCl 0.150 M (8.766 g/L) ajustar pH con HCl].
- n. Disolución amortiguadora TBS con Tween 20 (TTBS) [100 ml TBS; 0.1 ml Tween 20 al 0.1% v/v).
- o. Solución bloqueadora [30 ml TBS, 0.6 g leche descremada Svelty].
- p. Solución primer anticuerpo [0.06 g leche descremada Svelty; 3 ml TBS; 3 µl de la ATPasa de H⁺ de *Agrisera* durante toda la noche].
Solución segundo anticuerpo [0.2 g leche descremada Svelty; 10 ml TBS; 4 µl anticuerpo anti fosfatasa alcalina del proveedor *Millipore* por 2 h].
- q. Solución de NBT para desarrollar color [30 mg NBT en 1 ml de dimetilformamida al 70%].
- r. Solución de BCIP para desarrollar color [15 mg BCIP en 1 ml de dimetilformamida].
- s. Mezcla para desarrollar color [100 µl NBT y 100 µl BCIP en 10 ml TBS].

VIII. RESULTADOS

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la detección de la proteína membranal ATPasa de H⁺ mediante la técnica de Western Blot, utilizando vesículas de membrana plasmática de plantas silvestres (*wt*) y de plantas de diferentes líneas mutantes en genes que codifican proteínas de vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*). Las plantas fueron tratadas con y sin aclimatación. Para hacer el análisis comparativo de los niveles de enzima en las diferentes muestras membranales, se realizó inicialmente un control de carga consistente en llevar a cabo una estandarización de cantidades equivalentes de proteína de las diferentes muestras membranales en los geles desnaturizantes de poliacrilamida. Una imagen representativa del ajuste final de la cantidad de proteína que se aplicó en cada carril se presenta en la Figura 5.

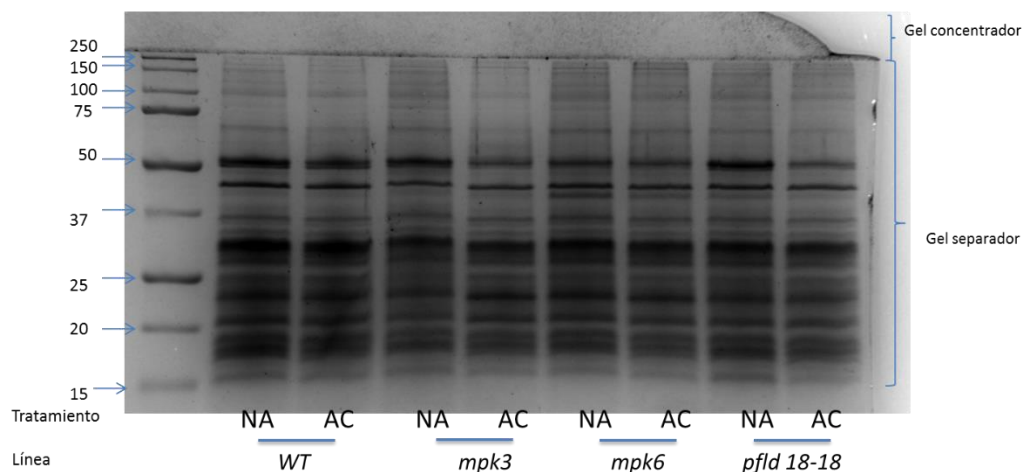


Figura 5. Perfil electroforético de vesículas de membrana plasmática de plantas del genotipo silvestre y líneas mutantes en vías de señalización (*wt*, *mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*) de *Arabidopsis thaliana* no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC). Proteínas separadas en un gel de poliacrilamida SDS representativo (control de cargado). Se cargó en cada carril lo correspondiente a 10 µg de proteína membranal, el gel se tiñó con azul de Commassie. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular. Experimento representativo de tres réplicas independientes.

Se ajustó la cantidad de proteína en las muestras de preparaciones de vesículas de membrana plasmática de las diferentes líneas en los carriles, procurándose que fuera equivalente, lo cual se pudo verificar por la intensidad de las bandas determinada por densitometría.

1. INMUNODETECCIÓN DE LA ATPASA DE H⁺

En un primer intento para llevar a cabo la inmunoréplica con las diferentes muestras (Figura 6), se pudo observar que la detección de la ATPasa de H⁺ con el anticuerpo fue específica, ya que se logró identificar una banda en la masa molecular esperada de aproximadamente 100 kDa (la cual se encuentra marcada por el recuadro). Sin embargo, también se detectó una banda correspondiente a una mayor masa molecular. Adicionalmente, se encontró que no se podía transferir completamente la ATPasa de H⁺ del gel a la membrana. Por eso, se llevó a cabo un experimento en el que las muestras de vesículas de membrana plasmática se expusieron a 90°C por dos periodos de tiempo (2 y 5 min) con el amortiguador de digestión antes de cargarse al gel. El resultado se presenta en la Figura 6. En la Figura 7b se observaron bandas correspondientes a la ATPasa de H⁺ (aprox. 100 kDa) en los carriles control mientras que en los carriles en los que se aplicaron las muestras de proteína calentadas a 90°C por 2 min y 5 min no se apreciaron bandas reconocidas por el anticuerpo, mientras que en la Figura 7c se muestra el gel teñido con azul de Coomassie después de haber sido transferido.

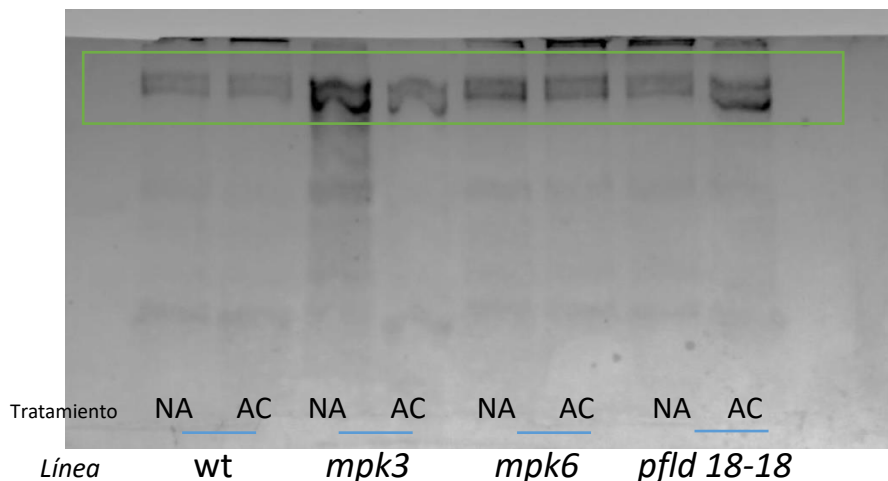


Figura 6. Detección de la ATPasa de H⁺ por Western blot. Se cargaron 15 µg de proteína por cada muestra. Se utilizó un lote de muestras de vesículas de membrana plasmática del genotipo silvestre, así como de líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pfl18-18*) no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC).

Se observó que en los carriles control no se alcanzó a teñir ninguna banda mientras que en los carriles restantes en los que se cargaron las muestras con tratamiento a 90°C, 2 y 5 min de genotipo silvestre, sí se observaron bandas teñidas con el azul de Coomassie. Lo anterior determinó que la exposición de las

muestras de vesículas de membrana plasmática al tratamiento térmico (90°C) no ayudaba a que las proteínas se solubilizaran y entraran debidamente al gel concentrador para ingresar completamente al gel separador. Por ello, se optó por hacer el corrimiento electroforético por más tiempo, el cual fue de 3 h.

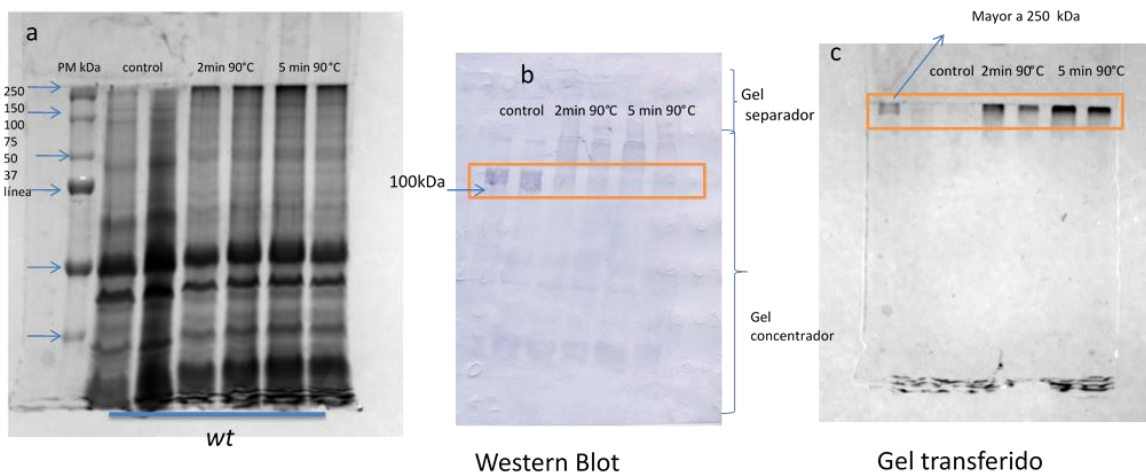


Figura 7. Efecto del calentamiento de la muestra de proteína en la detección de la ATPasa de H⁺ por inmunoréplica. (a) Gel teñido con azul de Coomassie. Se observan los carriles correspondientes a los diferentes tiempos de exposición a 90°C con muestras de membranas de las plantas *wt*. De izquierda a derecha, el primer carril corresponde al marcador de masa molecular, los siguientes dos carriles corresponden al control, que es la muestra sin ser expuesta a 90°C, los dos carriles siguientes corresponden a la muestra expuesta 2 min a 90°C y por último los carriles correspondientes al tratamiento de 90°C por 5 min. (b) Inmunodetección de la ATPasa de H⁺, utilizando la muestra *wt* NA. Se observa el Western Blot con las muestras expuestas a 90°C en tiempos de 2 min y 5 min, (c) Gel después de haber sido transferido y posteriormente teñido con azul de Coomassie. Se cargaron 10 µg de proteína

Después de haber encontrado las condiciones óptimas para la detección de la ATPasa de H⁺, se realizó el control de cargado de las proteínas membranales de las plantas silvestres y de las líneas mutantes en vías de señalización de *Arabidopsis thaliana* como se presenta en la Figura 8. Esto se hizo para poder comparar que la misma cantidad de proteína total se aplicara en todos los carriles en donde se depositaron las muestras, para poder así garantizar que la cantidad de ATPasa detectada se debía únicamente a la menor o mayor cantidad de ATPasa de H⁺ presente en la membrana y no a la cantidad de proteína cargada en el carril. Después de la separación de las proteínas por electroforesis, se realizó la tinción de proteínas con azul de Coomassie.

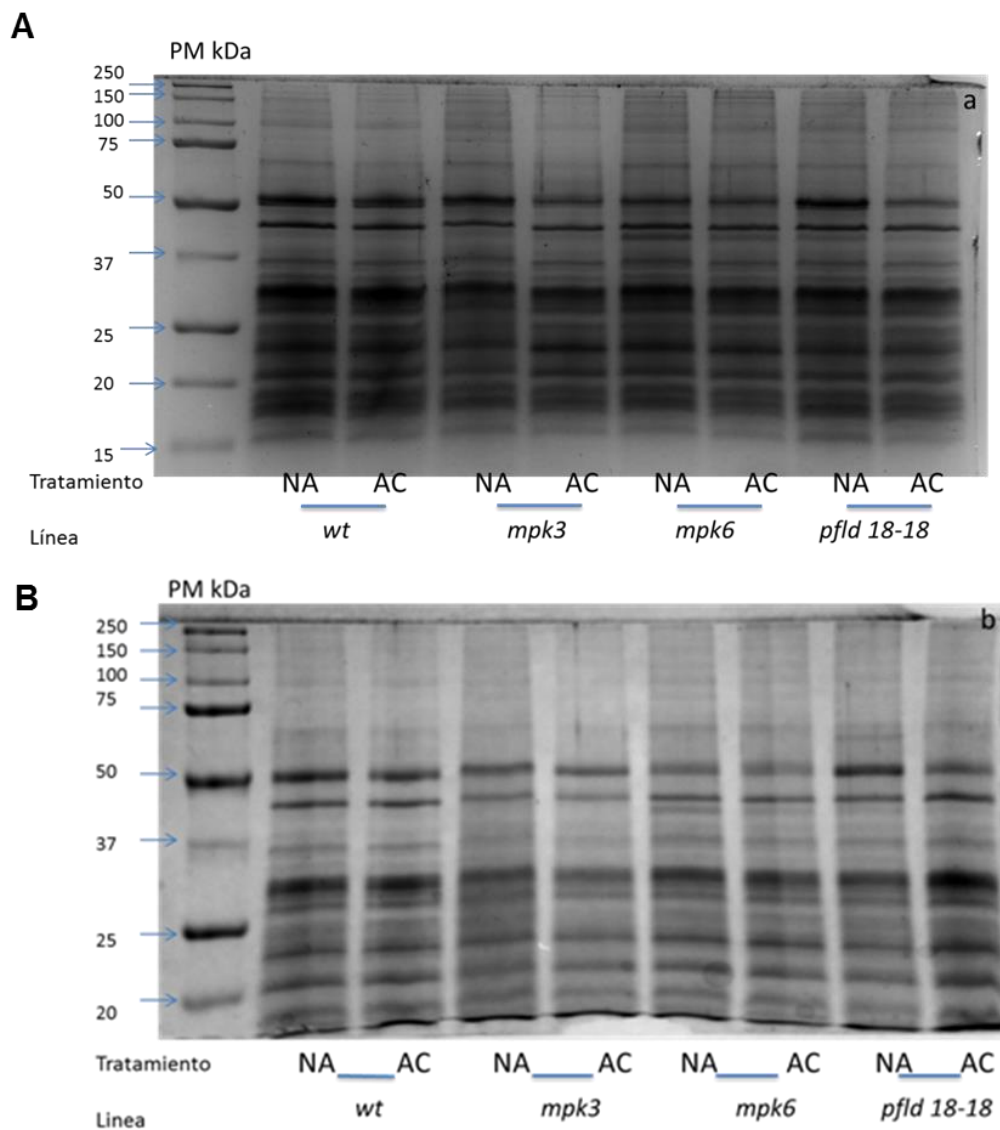


Figura 8. Gel de control de carga para dos diferentes preparaciones, a y b, de vesículas de membrana plasmática en plantas silvestres y líneas mutantes en vías de señalización de *Arabidopsis thaliana*. Se presenta el marcador de peso molecular y se cargaron 15 μ g de proteína total membranal de cada una de las diferentes muestras con y sin tratamiento de aclimatación en diferentes carriles. NA: No Aclimatada; AC: Aclimatada.

Como se puede ver en los gels de la Figura 8, las bandas de las diferentes muestras se ven razonablemente similares en intensidad en cada gel, lo cual se logró después de hacer algunos ajustes en las cantidades de proteínas totales en los diferentes carriles. Una vez obtenidos estos controles de carga con la cantidad de proteína total similar para cada muestra de genotipos silvestre y mutantes se procedió a realizar la inmunodetección de la ATPasa de H^+ . Para ello, se

realizaron 6 réplicas independientes a partir de dos preparaciones membranales de vesículas de membrana plasmática diferentes de cada línea con y sin tratamiento de aclimatación como se presenta en la Figura 9.

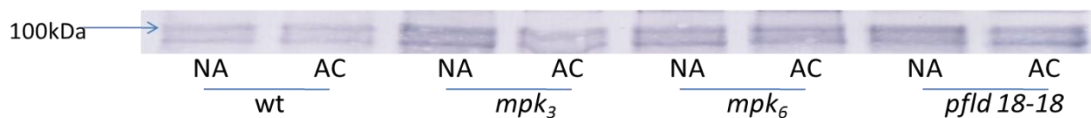


Figura 9. Inmunodetección de la ATPasa de H⁺ en las preparaciones membranales de plantas del genotipo silvestre y líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pfl18-18*) de plantas NA y AC. En cada réplica se cargó un equivalente a 15 µg de proteína membranal por carril, posteriormente las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas de PVDF. La inmunodetección de la proteína se realizó con el anticuerpo anti ATPasa de H⁺ de Agrisera. Imagen representativa de 6 inmunoréplicas realizadas con 2 preparaciones membranales independientes de cada línea. NA: No Aclimatada; AC: Aclimatada.

En la Figura 9, se presentan los resultados de una inmunoréplica representativa, observándose que las bandas correspondientes a la señal reactiva al anticuerpo de la ATPasa de H⁺ en el genotipo silvestre (*wt*) con y sin aclimatación presentaron una intensidad muy parecida entre ellas, indicando que ambas preparaciones membranales tenían la misma cantidad de ATPasa de H⁺. En el caso de la línea *mpk3* se encontró que la banda correspondiente a la muestra no aclimatada presentó una mayor intensidad que la banda correspondiente a la muestra aclimatada. Los resultados revelaron que la cantidad de ATPasa fue similar en las muestras de plantas aclimatadas y no aclimatadas de la línea *mpk6*. Lo mismo se observó en las muestras *pfl18-18* aclimatadas y no aclimatadas

En la inmunoréplica presentada en la Figura 9 se apreció un par de bandas con pesos moleculares cercanos a 100 kDa, correspondiente al descrito para la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática. Para esta proteína se conocen 12 isoformas diferentes, una de ellas parece no expresarse (Yuan *et al.*, 2017). En la Tabla 3 se presentan 11 isoformas, cuyos pesos moleculares se encuentran entre 104 y 106 kDa. Para explorar si las dos diferentes bandas detectadas por el anticuerpo correspondían a isoformas específicas de la ATPasa de H⁺, se determinaron los pesos moleculares de las bandas a partir del cálculo de su R_f, utilizando como referencia los pesos moleculares de las proteínas del estándar

(Figura 10). Se encontró que una banda correspondía a un peso molecular de 109 kDa y otra a uno de 96 kDa.

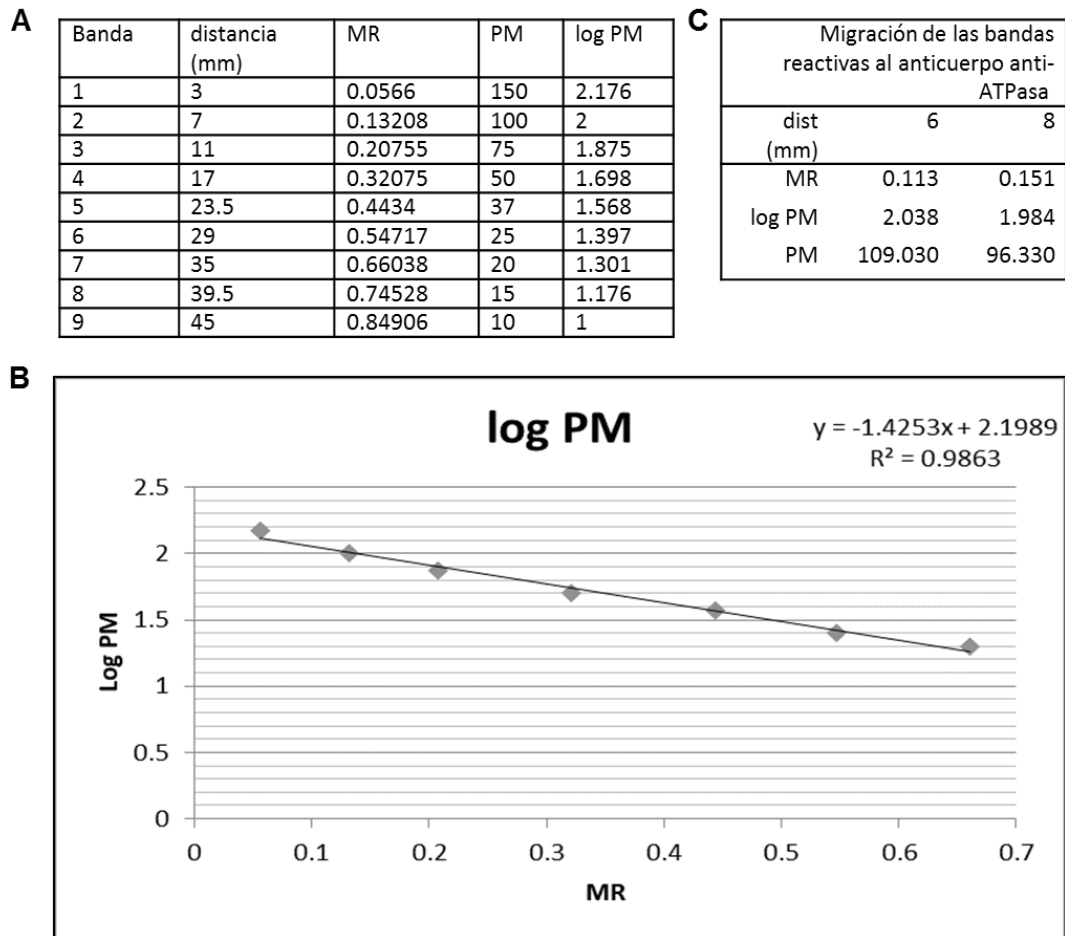


Figura 10. Cálculo de los pesos moleculares de cada una de las bandas reactivas al anticuerpo anti-ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las preparaciones membranales de las plantas de genotipos silvestre y mutantes en vías de señalización (*mpk₃*, *mpk₆* y *pfl₁₈₋₁₈*) con y sin tratamiento de aclimatación. (A) Cálculo del MR (distancia total del gel/ distancia del inicio del gel a la banda), (B) Migración de las bandas de acuerdo a su masa molecular. (C) Cálculo de las masas moleculares de las bandas reactivas al anticuerpo anti-ATPasa de H⁺.

Tabla 3. Masas moleculares correspondientes a las 11 isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*, descritas en la literatura. Cada uno de los pesos está en kDa y se calculó según el procedimiento en <http://enzyme.expasy.org/EC/3.6.3.6>.

Isoformas de la ATPasa de H ⁺ de <i>Arabidopsis thaliana</i>	kDa
Q9LV11, PMA11_ARATH	105.123
Q9SJB3, PMA5_ARATH	104.739
Q9M2A0, PMA8_ARATH	104.131
P19456, PMA2_ARATH	104.401
Q9SU58, PMA4_ARATH	105.718
Q9SH76, PMA6_ARATH	105.012
Q42556, PMA9_ARATH	105.208
Q43128, PMA10_ARATH	104.815
P20649, PMA1_ARATH	104.224
P20431, PMA3_ARATH	104.45
Q9LY32, PMA7_ARATH	105.52

De acuerdo a la Tabla 3 se puede observar que la isoforma PMA8_ARATH tiene un peso de 104.401 kDa, el cual es menor comparado con el del resto de las isoformas, mientras que la isoforma con mayor peso molecular es PMA4_ARATH con 105.718 kDa. Los valores de las bandas reactivas al anticuerpo que fueron de 96 y 109 kDa. Estas masas moleculares están cercanas a la de la isoforma más ligera con una diferencia de 5 y 8 kDa, respectivamente. Esta es una diferencia pequeña para poder resolverse bien, pues los geles que nosotros usamos (Shägger and Von Jagow 1987), no tienen una buena capacidad de resolución en este intervalo de masas moleculares, como se aprecia en la separación de estándares en la Figura 8. Por ello, no es fácil adjudicar inequívocamente las masas moleculares en un intervalo de 10 kDa. Sin embargo, los patrones de bandas en estos geles son muy homogéneos y las bandas son muy regulares y sin distorsiones, lo cual permite compararlas mejor y hacer un análisis densitométrico más preciso. Otros sistemas de geles desnaturalizantes, como el de Laemmli (1970) permiten separar muy bien proteínas de masas moleculares altas (>100 kDa), pero no es fácil obtener patrones regulares. Otra posibilidad que puede explicar la aparición de dos bandas reactivas al anticuerpo anti ATPasa de

H⁺ es que en nuestras condiciones electroforéticas, parte de las moléculas de la ATPasa esté sufriendo alguna modificación covalente que cambie su migración. Una posibilidad más es que la banda de ATPasa pueda tener una degradación parcial en nuestras condiciones, originando una banda de menor masa molecular. Es difícil que una de las dos bandas observadas sea de una proteína diferente a la ATPasa, ya que este anticuerpo es muy específico y por eso es usado para hacer inmunoprecipitaciones.

Después de que se obtuvieron las inmunoréplicas de las diferentes preparaciones membranales de las plantas NA y AC, se determinó la intensidad de las bandas (densitometría) en todas las membranas de PVDF con objeto de hacer una estimación semicuantitativa de los niveles de ATPasa en todos los experimentos. Con ayuda del software QuantityOne de Bio-Rad, se llevó a cabo el análisis para determinar la intensidad de las bandas. El análisis se hizo primero tomando como referencia el nivel de enzima detectado en las plantas silvestres NA y comparando este con todas las demás bandas, las de todos los genotipos en condiciones tanto NA como AC (Figura 11).

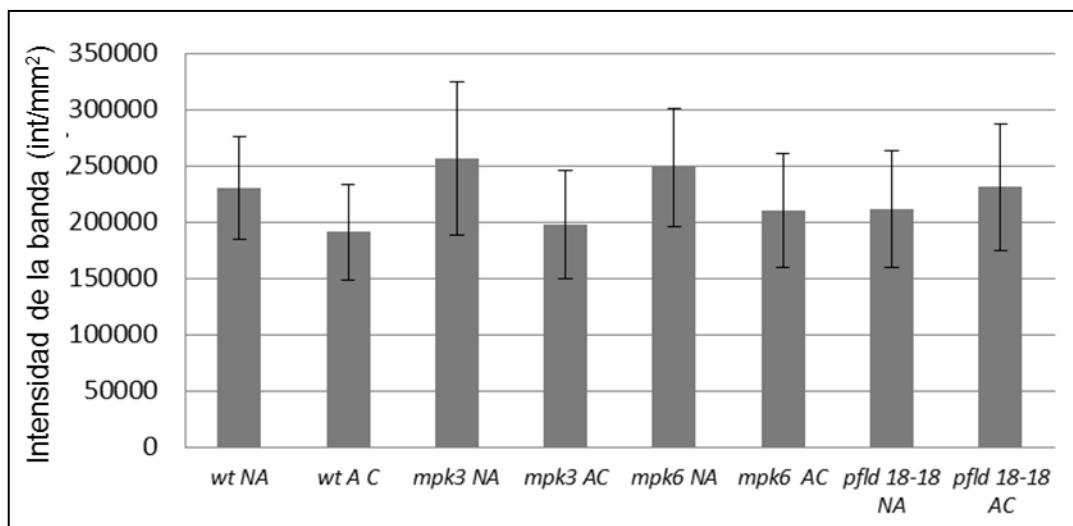


Figura 11. Detección de niveles de ATPasa en preparaciones membranales de diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC). Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la ATPasa de H⁺, y se realizó el análisis densitométrico utilizando el programa QuantityOne de Bio Rad utilizando para este análisis ambas bandas identificadas. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad relativa +/- EE, considerando la wt NA como el valor de referencia tanto para la planta silvestre como para cada línea mutante en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pfl18-18*) aclimatadas y no aclimatadas. Se usaron 6 inmunoréplicas de 2 preparaciones membranales independientes de cada línea.

En la Figura 11 se presenta la intensidad de cada una de las bandas inmunodetectadas en las diferentes muestras tanto del genotipo silvestre como de las líneas mutantes en vías de señalización aclimatadas (AC) y no aclimatadas (NA). Se observó en el caso del genotipo silvestre (wt) y de los genotipos *mpk3*, *mpk6* y *pflid 18-18*, que la cantidad de ATPasa de H⁺ no cambió después de haber expuesto las plantas al tratamiento de aclimatación. Sin embargo, la dispersión de las muestras fue muy alta.

La Figura 11 se construyó con los valores de la densidad absoluta de cada banda como fue obtenida directamente de las inmunoréplicas. Con el propósito de visualizar si había una diferencia entre los niveles de ATPasa en las muestras tanto NA como AC con respecto al control de controles, o sea al nivel de ATPasa de las plantas silvestre NA, se hizo un análisis comparativo tomando a estas últimas como el 100% y los valores se presentan en la Figura 12.

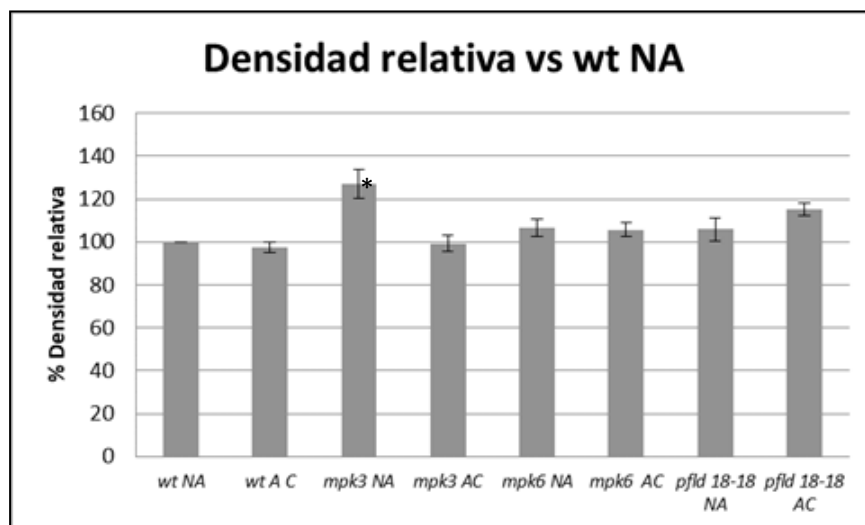


Figura 12. Detección de niveles de ATPasa en preparaciones membranales para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) comparadas con los niveles de las plantas wt NA. Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la ATPasa de H⁺, utilizando el programa QuantityOne de Bio Rad para el análisis densitométrico utilizando las dos bandas identificadas. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad relativa en porcentaje +/- EE, considerando a la wt NA como el valor de referencia tanto para las plantas silvestres como para cada línea mutante en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*) con y sin tratamiento de aclimatación. Se analizaron 6 inmunoréplicas de 2 preparaciones membranales independientes de cada línea. Se hizo un análisis de varianza a todos los datos. El asterisco (*) muestra una diferencia significativa entre las muestras *mpk3* NA y AC, de acuerdo al análisis de varianza de un factor $\alpha = 0.05$.

Se observa que la muestra *mpk3* NA presentó una mayor cantidad de ATPasa de H⁺ al tener una intensidad más alta, de aproximadamente el 20% comparada con la línea silvestre no aclimatada (NA) y con el resto de las mutantes, ya fuera en condiciones de NA o AC. Esta diferencia fue encontrada estadísticamente significativa.

En la Figura 13 se hizo otra comparación, pero esta vez entre las muestras aclimatadas (AC) de cada uno de los genotipos (tanto silvestre como en vías de señalización) con su respectiva muestra no aclimatada (NA). La única diferencia significativa observada entre todos los genotipos y condiciones fue la de las plantas de la línea *mpk3*, en las que hubo una disminución de un 20% aproximadamente de la muestra *mpk3* AC con respecto a la *mpk3* NA.

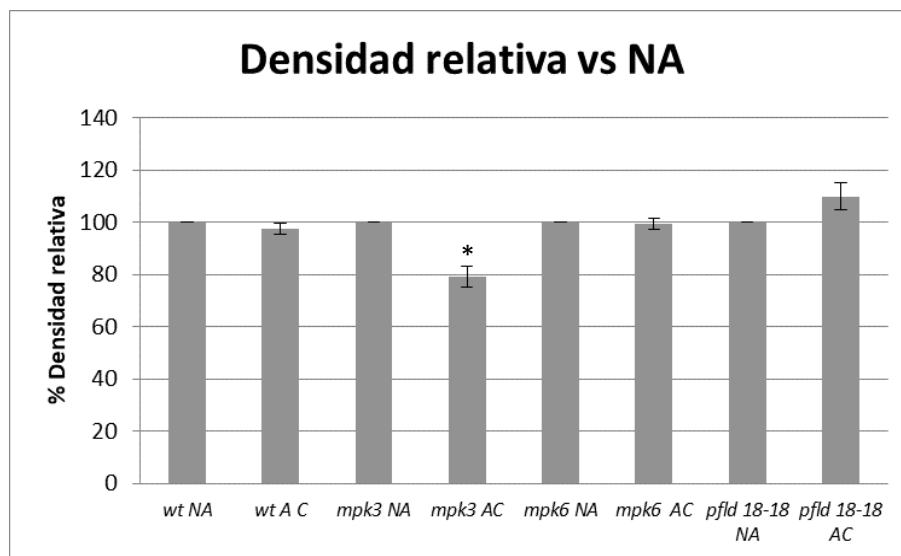


Figura 13. Detección de niveles de ATPasa en preparaciones membranales para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) comparadas con los niveles de las plantas NA para cada genotipo. Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la ATPasa de H⁺, utilizando el programa QuantityOne de Bio Rad realizando el análisis densitométrico, utilizando para este análisis ambas bandas identificadas. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad relativa en porcentaje +/- EE, considerando el valor de NA respectivo para cada línea como un 100% tanto para la planta silvestre como para cada línea mutante en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*) con y sin tratamiento de aclimatación. Se usaron 6 inmunoréplicas de 2 preparaciones membranales independientes de cada línea. Se hizo un análisis de varianza a todos los datos. El asterisco (*) muestra una diferencia significativa en la muestra *mpk3* AC, de acuerdo al análisis de varianza de un factor $\alpha = 0.05$.

Este resultado indica que las plantas *mpk3* NA tienen una mayor cantidad de ATPasa de H⁺ que las AC. Las plantas *pflid 18-18* AC presentaron un aumento

de aproximadamente el 10% en la muestra aclimatada con respecto a la *pflid 18-18* no aclimatada (NA).

2. Estimación de los niveles de proteína 14-3-3 en las membranas plasmáticas de las plantas aclimatadas y no aclimatadas de los genotipos silvestre y *mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*

Se sabe que la ATPasa de H⁺ puede estar regulada por diferentes mecanismos o factores que pueden modificar a la actividad de la proteína, como es el caso de la proteína 14-3-3 que al unirse a la región del carboxilo terminal de la ATPasa de H⁺ cuando está fosforilada, estabiliza el efecto activador de la fosforilación (Jahn *et al.*, 1998). Para ello se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína 14-3-3, pues era posible que esta proteína estuviera implicada en el descenso de la actividad en la ATPasa de H⁺ observado en las condiciones de AC. Se determinó la presencia de la proteína 14-3-3 en las muestras membranales de los 4 genotipos tanto en condiciones de aclimatación y de no aclimatación.

En la Figura 14 se presenta la inmunoréplica para detectar a la proteína 14-3-3 usando el anticuerpo anti 14-3-3 de *Arabidopsis*. Se puede apreciar una banda con una masa molecular de aproximadamente 32 kDa. Este peso es el descrito para dicha proteína. Se aprecia que la intensidad de las bandas en cada una de las muestras de líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*) con y sin tratamiento de aclimatación y las muestras wt AC y NA son muy parecidas entre sí. Comparando las intensidades de las bandas entre las mutantes (*mpk3*, *mpk6* y *pflid 18-18*) y las silvestres (wt), con y sin tratamiento de aclimatación, se observó que no había una diferencia entre las intensidades en ninguno de los casos.

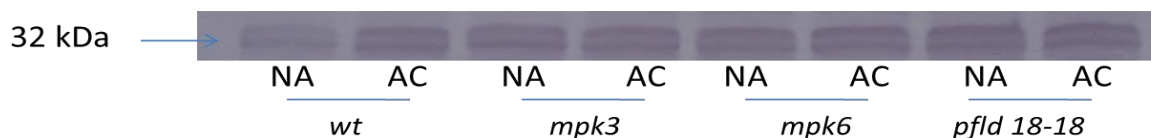


Figura 14. Inmunodetección de la proteína 14-3-3 en preparaciones membranales de plantas NA y AC de los genotipos *mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18* y silvestre wt. Se cargó lo equivalente a 15 µg de proteína membranal por carril, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y luego transferidas a membranas PVDF, para posteriormente realizar la inmunodetección de la proteína 14-3-3 con el anticuerpo homólogo. Se muestra el experimento representativo de 4 inmunoréplicas realizadas con 2 preparaciones independientes de cada línea.

En la Figura 15, se presenta el análisis densitométrico que se llevó a cabo para la banda de 32 kDa de la proteína 14-3-3 de cada una de las 4 inmunoréplicas realizadas, comparando todas las muestras de los genotipos mutantes en vías de señalización, con y sin tratamiento de aclimatación, así como la silvestre aclimatada contra la silvestre no aclimatada. Se realizó un análisis de varianza de un factor, $\alpha = 0.05$, para las muestras wt aclimatada, *mpk3* no aclimatada y *mpk3* aclimatada con respecto a la silvestre (wt) no aclimatada. Se observó que no hay una diferencia significativa, a pesar de que en la Figura 16 se puede observar que hay un ligero aumento de proteína en comparación con la silvestre no aclimatada, para la *mpk6* no hay una diferencia significativa en cantidad de proteína en ninguna de las dos muestras, tanto aclimatada como no aclimatada. Por último para la mutante *pflid 18-18* aclimatada y no aclimatada se observa que no hay una diferencia significativa, todo esto con respecto a la wt no aclimatada.

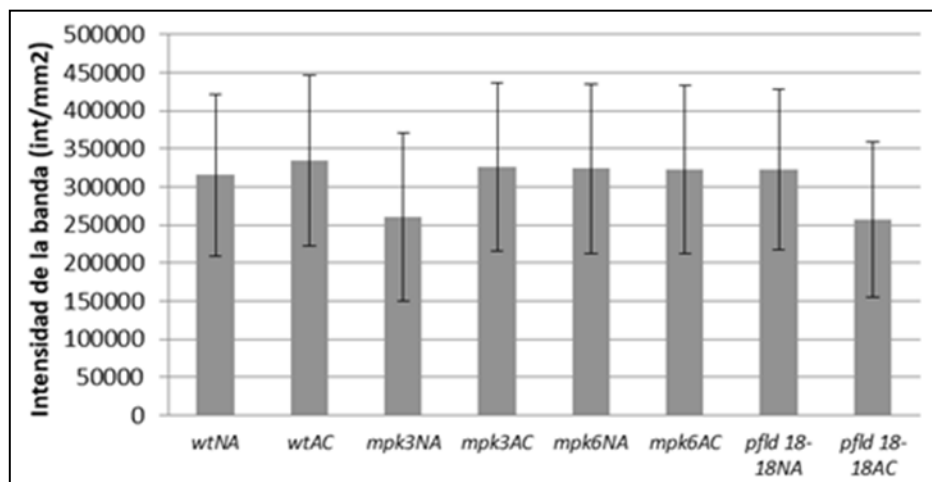


Figura 15. Detección de niveles de proteína 14-3-3 en preparaciones membranales para diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC). Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la 14-3-3, utilizando el programa QuantityOne de Bio Rad realizando el análisis densitométrico a la banda de 32kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad relativa +/- EE, considerando la wt NA como el valor de referencia tanto para la planta silvestre como para cada línea mutante en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18*) con y sin tratamiento de aclimatación, 4 inmunoréplicas realizadas con 2 preparaciones independientes de cada línea. Se realizó un análisis de varianza de un factor, $\alpha = 0.05$.

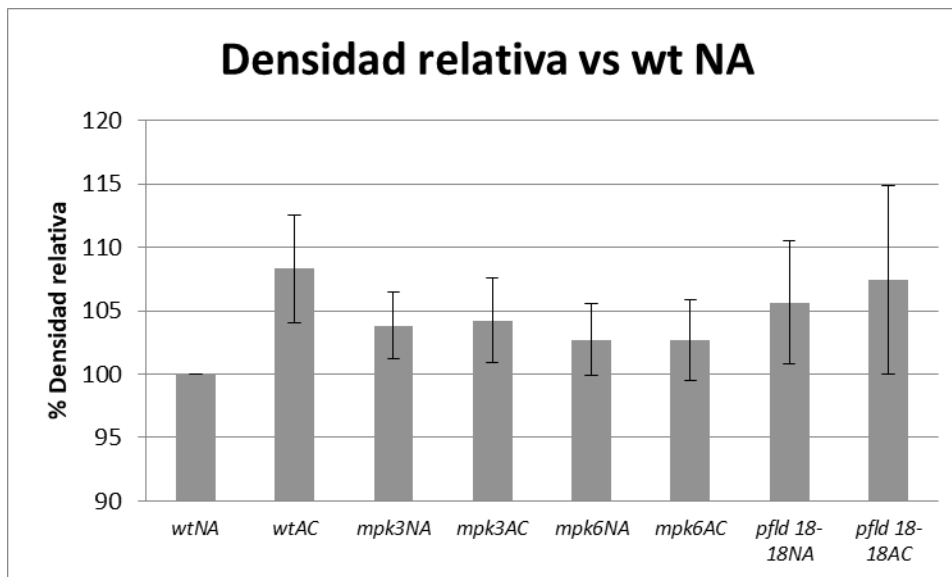


Figura 16. Detección de niveles de proteína 14-3-3 en preparaciones membranales para diferentes líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*) y muestra silvestre (wt) de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC). Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunoréplicas de la 14-3-3, utilizando el programa QuantityOne de Bio Rad realizando el análisis densitométrico a la banda de 32kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad relativa +/- EE, considerando la wt NA como el 100% y como valor de referencia tanto para la planta silvestre como para cada línea mutante, 4 inmunoréplicas realizadas con 2 preparaciones independientes de cada línea. Se realizó un análisis de varianza de un factor, $\alpha = 0.05$.

Por último, en la Figura 17 se hace la comparación de las muestras AC de cada una de las líneas tanto silvestre como en vías de señalización con su respectiva muestra NA. Se observa que en el caso de la silvestre (wt) aclimatada hay un aumento con respecto a la (wt) no aclimatada. Sin embargo, se realizó un análisis de varianza de un factor, $\alpha = 0.05$, y se encontró que esa diferencia no era significativa, muy probablemente debido a la gran dispersión de los valores de las intensidades de las diferentes muestras. En las mutantes en vías de señalización, tampoco se apreció una diferencia significativa en cantidad de proteína 14-3-3 en las condiciones de NA o de AC.

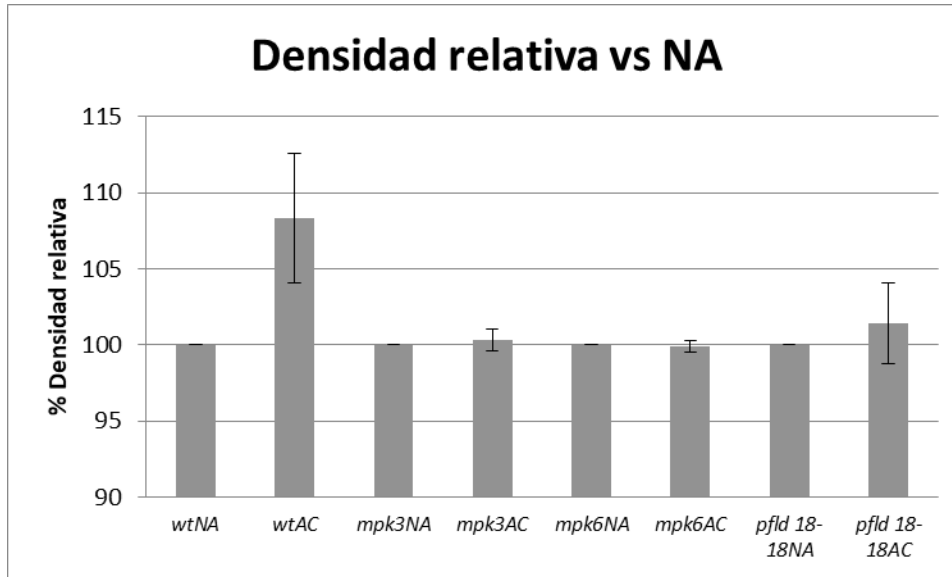


Figura 17. Detección de niveles de proteína 14-3-3 en preparaciones membranales para diferentes líneas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*) y silvestre (*wt*) de *Arabidopsis thaliana* de plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC). Se escanearon las membranas de PVDF de las inmunorélicas para la proteína 14-3-3, utilizando el programa QuantityOne de Bio Rad para realizar el análisis densitométrico a la banda de 32 kDa. La gráfica muestra los valores promedio de la densidad relativa en porcentaje +/- EE, considerando el valor de NA respectivo para cada línea como un 100% tanto para la planta silvestre como para cada línea mutante en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6*, *pfl18-18*) con y sin tratamiento de aclimatación, 4 inmunorélicas realizadas con 2 preparaciones independientes de cada línea. Se realizó un análisis de varianza de un factor, $\alpha = 0.05$.

IX. DISCUSIÓN

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es una bomba de protones que desempeña un papel central en las funciones fisiológicas de las células de las plantas. Entre estas funciones están la absorción de nutrientes, la regulación del pH intracelular, la apertura estomática y el crecimiento celular. Esta enzima también desempeña un papel en la adaptación de las plantas a condiciones cambiantes, especialmente las extremas que resultan en un estrés (Janicka *et al.*, 2017). Se sabe que la actividad de la bomba de protones de la membrana plasmática regulada por ácidos grasos está implicada en la respuesta celular a la aclimatación en frío (Martz *et al.*, 2006). La ATPasa de H⁺ presenta varias formas de regulación de su actividad enzimática, tales como la fosforilación, la expresión de isoformas, la interacción con proteínas específicas y la interacción con lípidos membranales (Fuglsang *et al.*, 1999, 2007; Duby y Boutry 2009; Duby *et al.*, 2009; Haruta *et al.*, 2015).

En el laboratorio se ha estudiado el estrés por las bajas temperaturas en las plantas y un aspecto específicamente abordado es el efecto de la aclimatación al frío en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Se encontró que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática disminuye después de la aclimatación (AC) tanto en la planta silvestre como en las mutantes *lcb2a-1*, *hp-*, *hp+* y *sbh1-1*. En todos los casos la actividad disminuyó entre un 40 a 71% con respecto a las plantas que no fueron expuestas al proceso de aclimatación (Peña Moral 2015). Posteriormente se estimó la cantidad de ATPasa mediante inmunodetección en estos genotipos, encontrándose que no había una relación directa entre cantidad y actividad de ATPasa (Rueda Luna 2015).

En el caso de mutantes en vías de señalización, *mpk3* y *mpk6*, se había encontrado que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática disminuía un 75% con respecto a las plantas que no habían sido expuestas al tratamiento de aclimatación, pero para la mutante *pfl1 18-18* se observó que la actividad aumentaba un 30% con respecto a las plantas no expuestas a la aclimatación. En este trabajo de tesis se buscó si en el contexto de la aclimatación

a las bajas temperaturas había una relación entre las proteínas MPK3, MPK6 y las ERO del cloroplasto que participan en cascadas de fosforilación de proteínas con la actividad de la ATPasa de H⁺, así como ver qué relación había entre la cantidad de ATPasa y su actividad. Por ello, se utilizaron plantas silvestres (wt) así como plantas mutantes en vías de señalización (*mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*). Para saber si la cantidad de ATPasa de H⁺ presente en muestras de membrana plasmática de las plantas de *Arabidopsis thaliana* estaba relacionada con la actividad de la enzima, se realizaron experimentos para estimar la cantidad de ATPasa y de la proteína reguladora 14-3-3 mediante inmunodetección. Por tanto, la idea para realizar este trabajo fue explorar si había una relación entre los niveles de la ATPasa de H⁺ en la membrana con los de su proteína asociada, la proteína 14-3-3, así como ver si había una relación entre la actividad de la ATPasa de H⁺ (la cual ya había sido determinada previamente) en plantas del genotipo silvestre y de las líneas mutantes en la vía de señalización con o sin exposición a bajas temperaturas.

1. IDENTIFICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES RELEVANTES

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron vesículas de membrana plasmática aisladas de las plantas de los diferentes genotipos expuestas o no a las bajas temperaturas. En las vesículas purificadas de membrana plasmática hay un enriquecimiento de la ATPasa de H⁺, ya que la ATPasa se encuentra embebida en la membrana plasmática de las células y por lo tanto son las únicas proteínas presentes en las muestras y se encontrarían proteínas del citoplasma en cantidades muy bajas. De igual forma, en estas membranas no hay presencia significativa de ATPasa de alguna otra membrana como la de cloroplasto, pues son membranas purificadas. Debido a que se buscaba saber si había una relación entre la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y su cantidad y de igual forma ver si había una relación entre proteínas señalizadoras y la ATPasa, se utilizaron plantas de los genotipos silvestre (wt), *mpk3*, *mpk6* y *pfl18-18*, ya que estos genotipos de plantas de *Arabidopsis thaliana* están alterados en genes que codifican para moléculas señalizadoras, por lo tanto no expresan las proteínas MAP cinasas MPK3 y MPK6 y para el caso de la *pfl18-18* hay una reducción en

las especies reactivas de oxígeno generadas en los cloroplastos debido a la inserción del gen bacteriano de la flavodoxina en las plantas de Arabidopsis.

Verificación de la reactividad del anticuerpo contra la banda de la ATPasa de H⁺

La verificación de la reactividad del anticuerpo se realizó porque era necesario saber si era específico para una de las proteínas que se estaban buscando en este trabajo, la ATPasa de H⁺ (la otra es la proteína 14-3-3). Se utilizó el anticuerpo comercial de Agrisera, (Suecia) dirigido contra la ATPasa de H⁺. Se identificaron dos bandas muy cercanas a la altura de la banda de 100 kDa, el cual corresponde al peso de la ATPasa de H⁺. Esta determinación se hizo por la comparación con respecto a un marcador de peso molecular conocido. No se identificó ninguna otra banda que haya reaccionado al anticuerpo, por lo cual se dedujo que el anticuerpo era específico para ese único par de bandas que podrían corresponder a isoformas de la enzima o a formas glicosiladas de la misma por ejemplo, como se mencionó en la sección de Resultados.

a. Solubilización completa de la ATPasa de H⁺ para su separación electroforética

Se llevaron a cabo una serie de experimentos para averiguar si el total de las proteínas presentes en las vesículas de membrana plasmática, incluyendo a la ATPasa de H⁺ lograba solubilizarse y entrar completamente al gel separador durante la electroforesis. Esto se hizo ya que se observó que al realizar la técnica de Western Blot, cuando se corría el gel, muchas proteínas no entraban al gel separador y por tanto no se transferían del gel a la membrana de PVDF. Por lo tanto se expusieron las muestras de proteínas membranales a 90°C por 2 y 5 min para mejorar su solubilización antes de ser cargadas al gel. Se observó que al calentar las muestras no se lograba la solubilización completa de las proteínas, inclusive las muestras se agregaban en mayor cantidad. Por lo tanto para lograr que la ATPasa de H⁺ entrara al gel separador durante la electroforesis, fue necesario realizar un corrimiento electroforético de mayor tiempo, ya que la técnica permite separar moléculas cargadas de acuerdo a su masa, a través de su migración de ánodo a cátodo cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico, en presencia de moléculas desnaturizantes como el detergente SDS o

agentes reductores como el Beta-mercaptoetanol (Laemmli 1970). Se encontró que toda la cantidad de ATPasa entraba al gel separador y por tanto podía ser estimada confiablemente.

b. Ajuste de la cantidad de proteína de las muestras de membranas que son separadas electroforéticamente.

La expresión cuantitativa de la proteína de interés puede analizarse a partir de una normalización por medio de la cual se asegure que la cantidad de proteína total sea igual en todas las muestras por ser comparadas. Esto se hace a través del control de carga. De esa manera se asegura que la misma cantidad de proteína para cada muestra en cada uno de los carriles sea la misma para el corrimiento electroforético y que estas sean la que se transfieren a la membrana de PVDF por la técnica de Western blot. Así, es posible cerciorarse de que al cargarse la misma cantidad de muestra, la reacción del anticuerpo con la ATPasa cuantificará las diferencias en la cantidad de ATPasa entre las muestras y no por que se haya cargado una menor o mayor cantidad de proteína total.

Como norma general se consideran aquellas proteínas que en el gel se ven con niveles de expresión constante en todas las muestras, como las bandas que indican que la cantidad de muestra de proteína total es la misma en todos los carriles. En nuestro caso, se hicieron los controles de cargado necesarios y la estimación densitométrica también consideró bandas de referencia que no cambiaran para hacer los ajustes necesarios.

2. ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO DE LAS LÍNEAS MUTANTES Y LA CANTIDAD DE ATPASA DE H⁺ EN CONDICIONES DE ACLIMATACIÓN Y DE NO ACLIMATACIÓN

En estudios realizados anteriormente se había encontrado que la actividad de la ATPasa de H⁺ variaba de acuerdo al genotipo de plantas mutantes con defectos en vías de señalización por MAP cinasas o que producían menos ERO en sus cloroplastos (Peña Moral 2015). También se había estudiado como afectaba la aclimatación la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de cada una de las diferentes mutantes.

Comparación de la cantidad de ATPasa de plantas de los genotipos *mpk3*, *mpk6*, *pflid 18-18* con la actividad de las plantas *wt*, todas en condiciones de no aclimatación y de aclimatación

Se había establecido que la aclimatación disminuía cerca de un 75% la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas silvestres y en las que carecían de MPK3 y MPK6, por lo que se esperaba que la cantidad de ATPasa de H⁺ también disminuyera. Sin embargo, esto no ocurrió con las plantas AC *wt* y *mpk6*, ya que sus membranas plasmáticas presentaron aproximadamente la misma cantidad de proteína que sus controles NA. Estos resultados indicaban que la disminución de la actividad de la ATPasa de H⁺ por efecto de la aclimatación en las plantas silvestres y *mpk6*, no era dependiente de un aumento de la enzima en la membrana, sino de algún otro mecanismo regulatorio de la actividad. En el caso de la mutante *mpk6*, línea de *Arabidopsis* que no expresa a esa MPK, pareciera que la ausencia o presencia de la cinasa no modifica la cantidad de ATPasa en la membrana tampoco.

Sin embargo, en el caso de la mutante *mpk3* NA, que había presentado una actividad de ATPasa mayor que la de su tratamiento AC, sí presentó un aumento de enzima correspondiente por tanto al incremento en la actividad. La *mpk3* en condiciones de NA fue la única mutante en la cual se vio un incremento en la cantidad de ATPasa, con respecto tanto a la línea *mpk3* AC, como a la línea silvestre y a las mutantes *mpk6* y *pflid 18-18* con y sin tratamiento de aclimatación. Este aumento de la cantidad de ATPasa en la línea *mpk3* en condiciones de NA, sí correspondió claramente al aumento encontrado en la actividad de la enzima. Este resultado sugiere que la ausencia de MPK3 promueve un aumento en la actividad y cantidad de la ATPasa de H⁺ y que por tanto en las plantas silvestres, la presencia de MPK3 regula negativamente a la enzima en ambos parámetros.

En el caso del genotipo *pflid 18-18*, con y sin tratamiento de aclimatación, los contenidos de ATPasa tampoco fueron distintos entre sí, aún y cuando la actividad de ATPasa de H⁺ había aumentado cerca de un 50% con el tratamiento de AC (Peña Moral, 2015). En este caso, se interpreta que las ERO producidas por el cloroplasto y que están disminuidas en esta mutante, están involucradas en una regulación positiva de la actividad de la ATPasa de H⁺ durante el tratamiento

de aclimatación que sin embargo, no es dependiente de un aumento de la enzima en la membrana.

Resumiendo, la comparación entre actividad y cantidad de ATPasa de H⁺ no presentó coincidencia más que en el caso de la línea *mpk3* NA, ya que en el caso de la wt y la mutante *mpk6* aclimatadas y no aclimatadas, la cantidad de proteína no cambió.

3. INFLUENCIA DEL GENOTIPO DE LAS LÍNEAS MUTANTES SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNA 14-3-3 EN CONDICIONES DE ACLIMATACIÓN Y DE NO ACLIMATACIÓN

Se sabe que la ATPasa de H⁺ tiene diferentes sitios de fosforilación en la región de su carboxilo terminal, estos sitios son fosforilados por cinasas, lo que produce una activación de la ATPasa (Nguyen *et al.*, 2015). Cuando la ATPasa se encuentra fosforilada, las proteínas 14-3-3, que son de bajo masa molecular (36 kDa), se unen al sitio fosforilado, causando que la activación de la ATPasa sea más estable (Roberts *et al.*, 2002; Piette *et al.*, 2011). Ya que se habían encontrado cambios en la actividad de ATPasa en las condiciones de no aclimatación y de aclimatación en las plantas silvestres y en las tres líneas mutantes, se pensó que esto se debía a un estado de fosforilación diferente en la enzima. Por esto, se decidió estudiar mediante Western blot la cantidad de proteína 14-3-3 presente en las membranas plasmáticas de las plantas silvestres y de las líneas mutantes en vías de señalización. Para ello se utilizó el anticuerpo dirigido a las proteínas 14-3-3 de Arabidopsis. Después de hacer el análisis densitométrico de todas las inmunoréplicas y de aplicar los correspondientes análisis estadísticos, se encontró que ni en las plantas silvestres ni en las líneas mutantes hubieron diferencias entre la cantidad de proteína 14-3-3 unida a las membranas plasmáticas y que esto ocurrió tanto para las plantas aclimatadas como no aclimatadas. Este resultado puede interpretarse como que las diferencias entre las actividades de ATPasa de H⁺ en los diferentes genotipos y en las condiciones de NA y AC no se deben a una asociación diferencial de la proteína 14-3-3 a la ATPasa de H⁺ y por tanto que los estados de fosforilación no contribuyen a la diferente actividad de la enzima. Sin embargo, esta interpretación debe ser cautelosa, pues la proteína 14-3-3 solo se une a un sitio de fosforilación,

la Treo 948 que está en la región del carboxilo terminal de la enzima y se han descrito otros sitios de fosforilación que también tienen repercusión en la actividad de la ATPasa de H⁺ y a los que la proteína 14-3-3 no se une. La otra posibilidad es que ya que *Arabidopsis thaliana* contiene trece isoformas de la proteína 14-3-3, es posible que el anticuerpo que usamos no reconociera a aquella isoforma que se une a la Treo 948 fosforilada (Roberts *et al.*, 2002).

4. CONSIDERACIONES GENERALES

El proceso de aclimatación al frío es exitoso cuando promueve en la planta una tolerancia a la congelación. Para que este resultado ocurra se llevan a cabo numerosos eventos celulares (Zuther *et al.*, 2019) donde la mayoría de ellos están programados para ocurrir tras la recepción de la señal de frío. La recepción de esta señal parece estar dada por los cambios de fluidez de la membrana plasmática, cuya matriz lipídica es espontáneamente sensible a la temperatura. Posteriormente a la recepción del estímulo de frío debe haber una transmisión intracelular que está mediada por transductores de la señal de frío entre los que están incluidas las cascadas de MAP cinasas. Hasta ahora, se ha descrito que las MPK 3, 4 y 6 son las que participan en la respuesta a bajas temperaturas (Barrero-Gil y Salinas 2013). El mecanismo por medio del cual estas cinasas responden al frío involucra la migración de estas enzimas desde el citosol al núcleo en donde fosforilan a proteínas específicas que son factores de transcripción, las cuales a su vez activan a genes específicos. Estos genes codifican a proteínas que tienen un papel de resistencia al frío como las proteínas de la familia COR, las cuales evitan la formación de estructuras que destruyen la estructura de las membranas del cloroplasto y de la membrana plasmática (Colcombet y Hirt 2008). Sin embargo, en todos los reportes de trabajos sobre la función de las MAP cinasas, no hay ninguno que mencione a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática como uno de sus blancos (Yang *et al.*, 2003). La importancia fisiológica de esta enzima permite elucubrar que en condiciones de aclimatación esta enzima debe permanecer menos activa, ya que las demandas de nutrición celular disminuyen, así como la producción del sustrato de la enzima (ATP). Sin embargo, la contribución de la función de la ATPasa de H⁺ a la aclimatación de las plantas al frío se desconoce.

X. SÍNTESIS DE RESULTADOS

La disminución de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en condiciones de aclimatación no se debe a una disminución en la cantidad de enzima en la membrana en las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

La MPK3 parece ser un regulador negativo de la actividad de la ATPasa de H^+ en condiciones de no aclimatación.

El aumento en la actividad de la ATPasa de H^+ en condiciones de aclimatación en las plantas que tienen bajos niveles de ERO no está aparejado a un aumento en la cantidad de enzima, lo que revela que la actividad de la enzima en esta condición es regulada por otro(s) mecanismo(s), diferente(s) al de aumento de enzima.

La detección de los niveles de la proteína 14-3-3 indicó que esta no cambió en ninguna condición ni en ningún genotipo. Esto se puede interpretar como que los cambios de actividad de la ATPasa de H^+ producidos por la ausencia de las MPK3, MPK6 o la disminución de las ERO del cloroplasto, no están relacionados con cambios en la fosforilación de la enzima, por lo menos con aquella estabilizada por la proteína 14-3-3.

XI. CONCLUSIONES GENERALES

La magnitud de la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas con los genotipos wt, *mpk6* y *pfl18-18*, que es mayor en las plantas no aclimatadas no está asociada a los niveles de la proteína. Sólo las plantas *mpk3* NA tienen una mayor cantidad de enzima que sí correlaciona con la mayor actividad de ATPasa. Esto se interpreta como que la ausencia de la MPK6 o de altos niveles de ERO no están relacionados con los niveles de la enzima en la membrana, ni con la actividad de la enzima.

La aclimatación produce una disminución en la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas de los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6*. Sin embargo, los resultados de los inmunoblots revelaron que esta disminución no está relacionada con una disminución de la enzima en la membrana plasmática. En el caso del genotipo *pfl18-18* que mostró con la aclimatación un aumento en la actividad de la enzima, los niveles de esta tampoco aumentaron. Lo anterior implica que la aclimatación sí cambia la actividad de la enzima pero no a través de un proceso que involucre cambios en los niveles de la enzima en la membrana. Este mecanismo sí puede operar en el caso del genotipo *mpk3*, en el cual la ausencia de la MPK3 permite que la actividad de la ATPasa de H⁺ sea regulada por una vía que se expresa en ausencia de MPK3, sugiriendo que la MPK3 es un regulador negativo de una vía que activa a la ATPasa de H⁺.

Los resultados conjuntos del estudio de la actividad-cantidad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática revelan que esta enzima está regulada en condiciones de AC por las ERO y en condiciones de NA por la MPK3. Esta regulación puede ser por el mecanismo de síntesis de enzima e incorporación a la membrana o por mecanismo(s), diferente(s).

XII. PERSPECTIVAS

Determinar si la aclimatación produce una menor expresión del gen de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en las plantas silvestres, como un primer mecanismo por ser abordado.

Determinar si el efecto de regulación negativa de la MPK3 en la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se debe a una disminución en la transcripción del gen de la ATPasa.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Amolkumar US y Sharma KA (2008) Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol Mol Biol Plants* 14:69-79.
- Apel K y Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.
- Axelsen K y Palmgren M (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:696-706.
- Barrero-Gil J y Salinas J (2013) Post-translational regulation of cold acclimation response. *Plant Sci* 205-2016:48-54
- Becker D, Zeilinger C, Lohse G, Depta H and Hedrich R (1993) Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 190:44–50.
- Briskin DP y Reynolds-Niesman I (1989) Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol* 90:394-397.
- Cano Ramirez D (2014). Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Carmona-Salazar L, El Haifidi M, Enríquez-Arredondo C, Vázquez-Vázquez C, González de la Vara LE y Gavilanes-Ruíz M (2011) Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Anal Biochem* 417:220-227.
- Chen M y Thelen JJ (2013) Acyl-lipid desaturase 2 is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1430–1444.
- Colcombet J y Hirt H (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413:217-226.
- Cote GG (1995) Signal transduction in leaf movements. *Plant Physiol* 109:729-734.
- Dickinson BC y Chang CJ (2011) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* 7:504-511.
- Dreyer A y Dietz KJ (2018) Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation. *Antioxidants* 7:169.

- Duby G y Boutry M (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch* 457:645-655.
- Duby G, Poreba W, Piotrowiak D, Bobik K, Derua R, Waelkens E y Boutry M (2009) 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.
- Fairley-Grenot K y Assmann SM (1991) Evidence for G-Protein regulation of inward K⁺ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 3:1037-1044.
- Fulgsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S y Schumaker KS (2007) Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* 19:1617-1634.
- Fulgsang AT, Visconti S, Drum K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P y Palmgren MG (1999) Binding of the 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.
- Guy C (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol* 41:187-223.
- Hager A (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res* 116:483-505
- Haruta M, Gray WM y Sussman MR (2015) Regulation of the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation. *Curr Opin Plant Biol* 28:68-75.
- Hilker M y Schmölling T (2019) Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant Cell Environ* 42:753-761.
- Hughes M y Dunn M (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot* 47:291-305.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW,

- Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Munsy J, Ohashi Y y Walker JC (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7:301-308.
- Jahn T, Baluska F, Michalke W, Harper J y Volkmann D (1998) Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal. *Cell Physiol Plant* 104:311-316.
 - Janicka M, Wdowikowska A y Klobus G (2017) Assay of plasma membrane H⁺-ATPase in plant tissues under abiotic stresses. In: Mock HP, Matros A, Witzel K (eds) *Plant membrane proteomics. Methods in molecular biology*, Vol 1696. New York, pp 205–215
 - Kanczewska J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud JL, Boutry M (2005) Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11675–11680.
 - Kasamo K (2003). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res* 116:517–523.
 - Knighth M y Knighth H (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist* 195: 737–751.
 - Kurkdjian A and Guern J (1989) Intracellular pH-measurement and importance in cell activity. *Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:271-303.
 - Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 - Levitt J. (1980) Chilling, freezing, and high temperature stress. In responses of plants to environmental stress. Vol. I. New York: Academic Press.
 - Lindberg S, Banas A y Szymne S (2005) Effects of different cultivation temperatures on plasma membrane ATPase activity and lipid composition of sugar beet roots. *Plant Physiol Biochem* 43:261-268.
 - Ling HH (2015). Functional roles of plant protein kinases in signal transduction pathways during abiotic and biotic stress. *J Biodivers Bioprospect Dev*, 2: 147.

- Logan H, Basset M, Véry A-A y Sentenac H (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. *Physiol Plant* 100:1-15.
- Luckey M (2014) *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Luo H, Morsomme P y Boutry M (1999) The two major types of plant plasma membrane H⁺-ATPases show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth. *Plant Physiol* 119:627-634.
- Lv X, Li H, Chen X, Xiang X, Guo Z, Yu J y Zhou Y (2018) The role of calcium-dependent protein kinase in hydrogen peroxide, nitric oxide and ABA-dependent cold acclimation. *Exp Bot* 69:4127-4139
- MacRobbie EA (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:1475–1488.
- Mahajan S y Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139-158
- Martz F, Sutinen M, Kiviniemi S y Palta J (2006) 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.
- Meskiene I y Hirt H (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol* 42:791-806.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M y Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490–498.
- Nguyen TT, Volkening JD, Rose CM, Venkateshwaran M, Westphall M S, Coon JJ, Ané JM, Sussman MR (2015) Potential regulatory phosphorylation sites in a *Medicago truncatula* plasma membrane proton pump implicated during early symbiotic signaling in roots. *FEBS Lett* 589:2186-2193.
- Niu X, Zhu JK, Narasimhan ML, Bressan RA Hasegawa PM (1993) Plasma-membrane H⁽⁺⁾-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta* 4:433–438.
- Palmgren MG (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:817-845.

- Parets-Soler A, Prado J y Serrano R (1990) Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 93:1654-1658.
- Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Morth JP, Palmgren MG y Nissen P (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450:1111-1115.
- Peña Moral A (2015). Estudio de la actividad de ATPasa en plantas con diferente capacidad de aclimatación. Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.
- Piette AS, Derua R, Waelkens E, Boutry M y Duby G (2011) 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.
- Portillo F (2000) Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469:31-42.
- Raymond J y Segrè D (2006) The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* 311:1764–1767.
- Reuveni M, Bressan RA y Hasegawa PM (1993). Modification of proton transport kinetics of the plasma membrane H⁺-ATPase after adaptation of tobacco cells to NaCl. *J Plant Physiol* 142:312-318.
- Roberts MR, Salinas J y Collinge DB (2002) 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol Biol* 50: 1031-1039.
- Rueda Luna AJ (2015) Relación entre el nivel de proteína y actividad de la ATPasa de plantas expuestas a bajas temperaturas y deficientes en la vía de síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A y Hurry V (2009) Cold signalling and cold acclimation in plants. *Adv Bot Res* 49:35–150.
- Saucedo-Garcia M, Gavilanes-Ruiz M. y Arce-Cervantes O. (2015) Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 6, 1-14.

- Schippers JHM, Nguyen HM, Lu D, Schmidt R y Mueller-Roeber B (2012) ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cell Mol Life Sci* 69:3245-3257.
- Shägger H y Von Jagow G (1987) 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.
- Serrano R (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:61-94.
- Serrano R (1990) In: THE PLANT PLASMA MEMBRANE-STRUCTURE, FUNCTION AND MOLECULAR BIOLOGY (Larsson C and Moller IM, eds) pp. 127-153 Springer-Verlag, Berlin.
- Skou JC y Esmann M (1992) The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24:249-261.
- Speth C, Jaspert N, Marcon C y Oecking C (2010) Regulation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by its C-terminal domain: What do we know for sure? *Eur J Cell Biol* 89: 145-151.
- Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol* 35:543-584.
- Stillwell W (2013) An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts. Academic Press, Elsevier, San Diego.
- Uemura M y Yoshida S (1984) Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv *Puma*). *Plant Physiol* 75:818-826.
- Uemura M, Joseph RA y Steponkus PL (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol* 109:15-30.
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou H, Rajashekar C, Williams T y Wang X (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *The J Biol Chem* 277: 31994-2002.

- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB y Johnson GL (1999). Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-180.
- Yang S, Sharrocks A y Whitmarsh A (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320: 3-21.
- Yuan W, Zhang D, Song T, Xu F, Lin S, Xu W, Li Q, Zhu Y, Lian J y Zhang J (2017) Arabidopsis plasma membrane H⁺-ATPase genes *AHA2* and *AHA7* have distinct and overlapping roles in the modulation of root tip H⁺ efflux in response to low-phosphorus stress. *J Exp Bot* 68:1731–1741.
- Zuther E, Schaarschmidt S, Fischer A, Erban A, Pagter M, Mubeen U, Giavalisco P, Kopka J, Sprenger H y Hinch DK (2019) Molecular signatures associated with increased freezing tolerance due to low temperature memory in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 42:854-873.