



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACION DE LAS CASPASAS DURANTE LA  
MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN *Arabidopsis*  
*thaliana*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A :

**ARMANDO BRAVO GARCIA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORAN ANDRADE  
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. HELENA PORTA DOCOING



2004





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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Armando Bravo  
García

FECHA: 9- Enero - 2004

FIRMA: [Signature]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Participación de las caspasas durante la muerte celular programada en Arabidopsis thaliana"

realizado por **Armando Bravo García**

con número de cuenta 9655624-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario **Dr. Julio E. Morán Andrade**

Co-director de Tesis  
Propietario **Dra. Helena Porta Ducoing**

Propietario **Dr. Mario Rocha Sosa**

Suplente **Dr. Silvestre Alavéz Espidio**

Suplente **Dra. Rosa E. Navarro González**

*[Handwritten signatures of Helena Porta Ducoing, Mario Rocha Sosa, and Rosa E. Navarro González]*

**Consejo Departamental de Biología**

*[Handwritten signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

*A mis padres,*

*...por todo el amor, la confianza, el apoyo, la paciencia y un sinnúmero de cosas que me han brindado en la vida; porque mis logros se los debo a ellos, desde el primero hasta este último, y es gracias a lo que me han enseñado que he llegado hasta aquí. Porque ustedes todo me lo han dado y me han servido de ejemplo.*

*A mis hermanos, Mónica y Alberto,*

*...por el apoyo incondicional, por estar siempre, porque los quiero y admiro mucho. Siempre he podido contar con ustedes y este logro también es suyo.*

*A mi novia, Deyita,*

*...por todo lo que he aprendido y vivido con ella, por lo especial que ha hecho cada momento de mi vida desde que la conozco. Tú le has dado un brillo especial a mi existencia. Gracias por haber estado todo este tiempo a mi lado.*

# AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Julio Morán Andrade por haberme apoyado y motivado constantemente durante la realización de este trabajo, por haberlo aceptado en un principio, así como por su confianza y guía, no sólo en el proyecto sino en mi vida académica.

A mi co-tutora, la Dra. Helena Porta Ducoing por su guía, paciencia e interés en mi proyecto, por todo el trabajo y tiempo que invirtió conmigo y porque sin su ayuda no habría sido posible este trabajo.

Al Dr. Mario Rocha Sosa por haberme aceptado en su laboratorio con un proyecto tan ajeno, por sus valiosas aportaciones y comentarios, al igual que por la confianza y el apoyo.

A la Dra. Rosa Navarro y en especial al Dr. Silvestre Alavéz por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por su valiosa crítica.

A la Biol. Patricia Rueda por su esencial trabajo en el apoyo técnico con las plantas y los cultivos celulares y a la Técnico laboratorista Martha Trujillo y la Biol. Guadalupe Domínguez por el apoyo técnico.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, tanto del Instituto de Fisiología Celular (Ari, Toño, Sugela, Silvestre, Andrea, Miriam, Alette, Lupita, Carmen y Marcelino), como del Instituto de Biotecnología (Baldemar, Julio, Ricardo, Teresa y Rossy) por su gran ayuda.

A DGAPA y Probetel por las becas proporcionadas durante la elaboración de este trabajo.

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
1. Las Caspasas	4
2. Mecanismos de Activación de las Caspasas	5
3. Modelos de Acción de las Caspasas	7
4. Mecanismos de Regulación de las Caspasas	9
5. MCP en Plantas	10
6. La Participación de la MCP en el Desarrollo de las Plantas	10
7. La MCP y la Reproducción de las Plantas	12
8. La MCP y las Interacciones de la Planta con el Ambiente	12
9. Conservación Funcional del Proceso	13
<b>Capítulo II ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo III OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo IV METODOLOGÍA</b>	<b>21</b>
1. Clonación	
1.1 Diseño de Oligos	21
1.2 Cinética de Tratamientos para Plantas	21
1.3 Extracción de ARN de Plantas	21
1.4 RT-PCR	22
1.5 PCR	22
1.6 Clonación en TOPO TA	22
1.7 Transformación en <i>Escherichia coli</i>	23
1.8 PCR en Colonia	23
1.9 Extracción de ADN de Bacterias (Mini Preps)	24
1.10 Digestión de ADN	24
1.11 Secuenciación	24
2. Sobreexpresión de Proteínas	24
2.1 Construcción de Vectores	24
2.2 Ligación de ADN	25
2.3 Transformación del Producto de Ligación en <i>Escherichia coli</i>	25
2.4 "Screening" en colonia por radioactividad	26
2.5 Inducción de Sobreexpresión de Proteínas en <i>E. coli</i> cepa BL21	26
2.6 Cuantificación de Proteína	26
2.7 Análisis de Expresión de Proteínas	27
2.8 Análisis de Proteínas por Western Blot	27
2.9 Medición de Actividad de Caspasas	27
3. Cultivos en Suspensión	28
3.1 Cinéticas de Tratamientos para cultivos en Suspensión	28
3.2 Valoración de Muerte Celular	28
3.3 Extracción de ARN de Células en Suspensión	28

3.4	Condensación de Núcleos	29
4.	Expresión Transitoria	29
4.1	Construcción de Vectores	29
4.2	Formación de Extremos Romos	29
4.3	Extracción de ADN y Transformación en <i>A. Tumefasciens</i>	30
4.4	PCR en Colonia de <i>A. Tumefasciens</i>	30
<b>Capítulo V</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
1.	Clonación de Metacaspasas	31
1.2	Diseño de Oligonucleótidos Degenerados	31
1.3	Rastreo de Genes	32
1.4	Diseño de Oligonucleótidos Específicos	33
2.	Análisis de la Expresión de AtMCA1	34
2.1	Infección con Bacterias	34
2.2	Infección con Hongos	34
2.3	Herida Mecánica	35
2.4	Ácido Salicílico (SA)	35
3.	Actividad Tipo-Caspasas de AtMCA1	36
2.5	Clonación de los Genes en un Vector de Expresión en <i>E. Coli</i>	36
2.6	Actividad Tipo-Caspasas	37
2.7	Detección de Proteínas por Western Blot	39
4.	Análisis de la Expresión de AtMCA1 en Presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Estaurosporina en Cultivo en Suspensión	40
2.8	Peróxido de Hidrógeno	41
2.9	Estaurosporina	43
5.	Expresión Transitoria de AtMCA1 en Células en Suspensión	46
<b>Capítulo VI</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
6.	Aislamiento del Gen	51
7.	Análisis de la Expresión de AtMCA1	51
8.	Actividad Tipo-Caspasas de AtMCA1	53
9.	Análisis de la Expresión de AtMCA1 en Presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Estaurosporina en Cultivo en Suspensión	54
10.	Expresión Transitoria de AtMCA1 en Células en Suspensión	55
<b>Capítulo VII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
	<b>APÉNDICE</b>	<b>59</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>

---

## RESUMEN

La Muerte Celular Programada (MCP) es un proceso dedicado a la eliminación de células como parte de la vida normal de un organismo multicelular. En las células animales, la MCP está caracterizada por varias características morfológicas y bioquímicas, incluyendo la condensación del citoplasma, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos que contienen los restos celulares, y es mediada por una familia de proteasas de cisteína específicas de aspartato, denominadas caspasas (Cohen, 1997). En plantas, la Respuesta Hipersensible (HR) es el resultado de la respuesta de las plantas a la infección de ciertos patógenos, y está relacionada con la MCP. Además, las especies reactivas de oxígeno y las fitohormonas tienen un papel regulador en la HR (Hoeberichts y Woltering, 2002). A la fecha, no han sido clonados homólogos de caspasas en plantas; sin embargo, los análisis de secuencias han detectado una familia de homólogos distantes llamados "Metacaspasas" (Aravind y cols., 2001). En este trabajo se clonó el primer gen de metacaspasa de *Arabidopsis thaliana* (AtMCA1), aislado mediante RT-PCR en hojas de *A. thaliana* infectadas con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae*.

Se analizó la expresión del gen AtMCA1 bajo diferentes condiciones relacionadas a la MCP en plantas, como la herida mecánica, el tratamiento con ácido salicílico (SA) y la infección con hongos y bacterias patógenas, indicando su participación. Adicionalmente, la expresión de AtMCA1 fue analizada en células de suspensión de *A. thaliana* tratadas con inductores de MCP en animales, como la estaurosporina y el peróxido de hidrógeno. En conjunto con la expresión de la metacaspasa, se observó la muerte celular y la condensación nuclear. La condensación nuclear y la muerte celular fueron estudiadas durante una expresión transitoria del gen AtMCA1 en sentido y antisentido mediada por una transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación mediada por la bacteria produjo una muerte celular que fue aumentada mediante la expresión transitoria de AtMCA1, y reducida por la expresión transitoria del antisentido de AtMCA1. Finalmente, la metacaspasa AtMCA1 recombinante, sobreexpresada en *E. coli* mostró una ligera actividad de caspasa tipo 3.

# INTRODUCCIÓN

Algunas de las características más importantes de los organismos multicelulares son la comunicación y el orden que existen en las células para controlar su crecimiento y el tamaño de su población y así poder formar las estructuras que los componen, optimizar su función y mantener su integridad. La eliminación selectiva de células es una de las formas de control de la población y del crecimiento que tiene el organismo, y esto es llevado a cabo mediante la muerte celular programada, o MCP.

La MCP es un evento activo que requiere de la expresión de genes que controlan este proceso de manera ordenada. Este tipo de muerte constituye un evento involucrado en la eliminación de células bajo diferentes condiciones fisiológicas. Así, la muerte programada ocurre normalmente durante el desarrollo de plantas y animales, como es el caso de la muerte de neuronas que se han producido en exceso durante períodos críticos del desarrollo del cerebro. También ocurre en células que han servido una función específica y que ya no son requeridas, como en algunas células del sistema inmune en animales o en las células del tapete durante el desarrollo de las anteras en plantas, e incluso en las células que se encuentran en los espacios interdigitales en las extremidades durante el desarrollo del embrión. La muerte programada ocurre también dentro del proceso de especialización celular, como es el caso de los queratinocitos de la piel en animales o las células del xilema que formarán los haces vasculares en plantas (Pennell y Lamb, 1997). Sin embargo la MCP también puede causar patologías. Así, durante una infección de VIH las células T-ayudadoras del sistema inmune sufren esta muerte, y ciertas neuronas del cerebro mueren durante enfermedades como el Alzheimer, Huntington y Parkinson. Por esto, la MCP es un proceso fisiológico muy importante en todos los organismos multicelulares para la homeostasis, especialización, desarrollo y durante las enfermedades de células y tejidos.

Uno de los tipos de MCP más conocidos es la apoptosis, la cual contrasta con un tipo de muerte pasivo y no fisiológico conocido como muerte necrótica. Cuando una célula es dañada por algún estímulo que rebasa un límite de intensidad o duración se presenta la muerte necrótica: el resultado de un proceso no ordenado donde la célula pierde la integridad membranal y libera su contenido exponiéndolo al resto de las células no dañadas. En animales esto conlleva a una respuesta inmunitaria que culmina con inflamación y pérdida de otras células adyacentes. La muerte necrótica no es un proceso fisiológico y no se encuentra involucrada en el desarrollo ni requiere de la actividad de proteasas o nucleasas dedicadas al control del desensamblaje de la célula, sino dedicadas a la degradación desordenada de todas las proteínas. Esta muerte no parece requerir la fosforilación de proteínas o de cambios en la concentración de calcio

intracelular, y no opera a través de vías de transducción de señales dependientes de genes (Cohen, 1997; Pennell y Lamb, 1997).

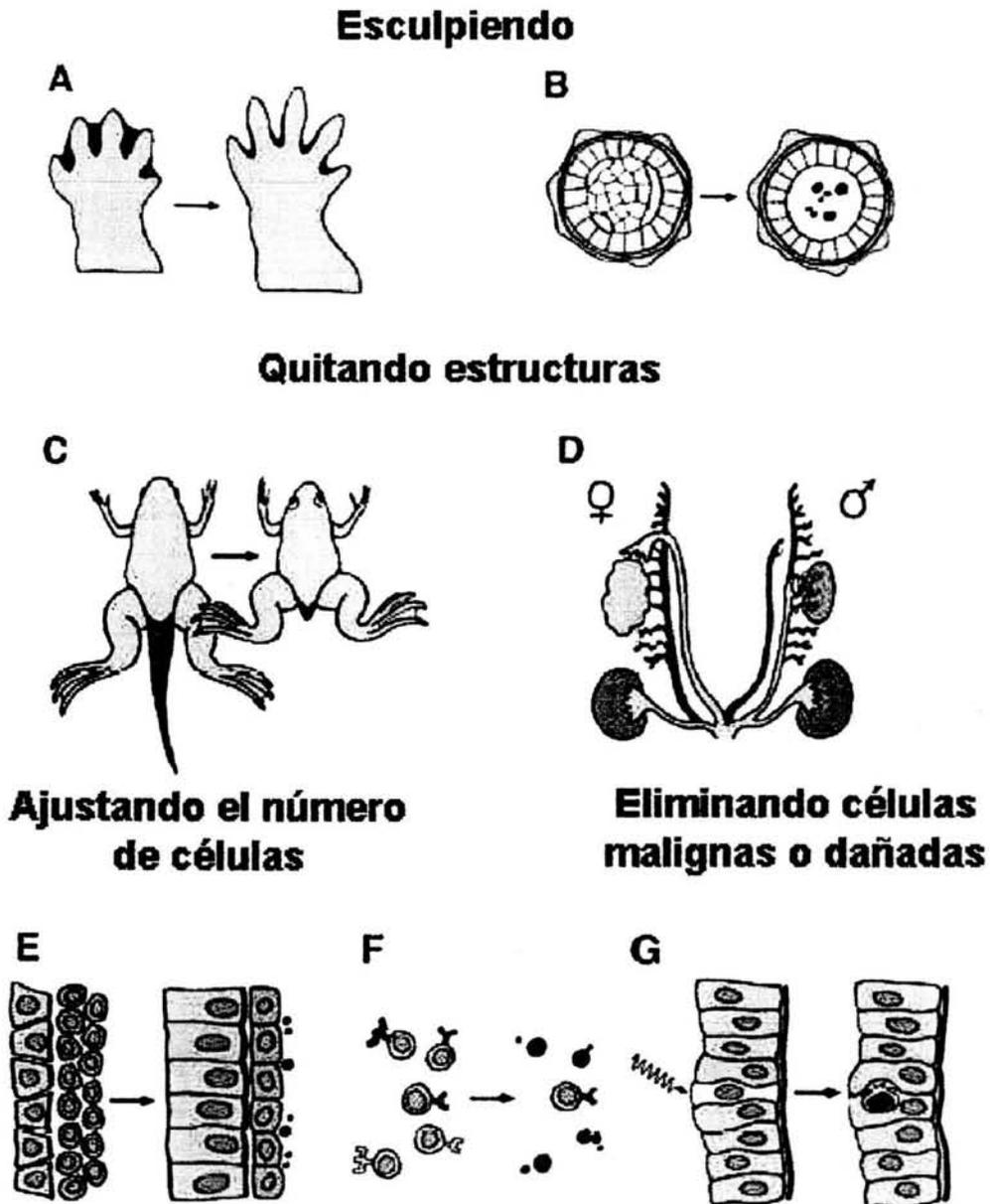


Figura 1. Ejemplos de muerte celular programada en la fisiología de animales. A) Formación de los dígitos en los vertebrados superiores. B) Formación de la cavidad preamniótica en ratón. C) Eliminación de estructuras vestigiales. D) Eliminación del ducto de Müller en machos y del tubo de Wolff en hembras de mamífero. E) Keratinocitos de la piel. F) Eliminación de linfocitos T y B que no han podido producir anticuerpos necesarios. G) Célula dañada por UV. Modificado de Jacobson y cols. (1997).

Durante los últimos años la apoptosis ha sido estudiada exhaustivamente. Algunas de sus características morfológicas y bioquímicas incluyen la condensación de la cromatina nuclear, el encogimiento del soma, la compactación de los organelos citoplasmáticos, la dilatación del retículo endoplasmático, la translocación de fosfatidilserina, así como la degradación del ADN nuclear en fragmentos de alrededor de 50 kb que constituyen los oligonucleosomas y la fragmentación de la célula en vesículas denominadas cuerpos apoptóticos.

A nivel genético la apoptosis se ha estudiado en los animales, particularmente en el gusano acelomado *Caenorhabditis elegans*. Así, se ha descrito que el principal componente de la maquinaria bioquímica de la apoptosis en las células animales es una cascada proteolítica ejecutada por un grupo de proteasas llamadas caspasas, que degradan distintos substratos celulares de manera coordinada y que son distintas de las proteasas que participan en los mecanismos de muerte necrótica.

## LAS CASPASAS

Las **caspasas** son una familia de proteasas de cisteína que reconocen ciertos substratos específicos que incluyen un conjunto de proteínas cuya proteólisis contribuyen a generar la mayoría de los cambios morfológicos observados en la apoptosis. Estas proteasas tienen un alto grado de especificidad en sus substratos y solo cortan después de un ácido aspártico, de ahí su nombre: proteasas de cisteína específicas para aspartato, (**C**ysteine **A**spartate **S**pecific **P**roteases por sus siglas en inglés). Reconocen una secuencia de al menos 4 aminoácidos hacia el extremo amino-terminal de la posición P1 (aminoácido después del cual se rompe el enlace peptídico, en este caso un Asp). Hasta la fecha se han encontrado 11 caspasas humanas, 10 murinas, 4 de aves, 4 de peces, 8 de anfibios, 7 de insectos y 3 de nemátodo. En el caso de las humanas, distintos grupos de investigadores han aislado y nombrado la misma proteasa con distinto nombre (tabla 1), por lo que se creó una nomenclatura unificada que asigna el nombre "caspasa" a los miembros de esta familia, asignándosele un número de acuerdo al orden en que fueron descubiertas (Cohen, 1997; Van de Craen y cols., 1997; Lamkanfi y cols., 2002).

Las caspasas se sintetizan como proenzimas o zimógenos con una actividad proteolítica residual. La proenzima está conformada por 3 partes: un prodominio de longitud variable (entre 30 y 50 kDa), seguido de una subunidad grande de alrededor de 20 kDa llamada p20 que contiene los residuos catalíticos, y una subunidad pequeña de aproximadamente 10 kDa denominada p10.

<b>Caspasa</b>	<b>Otros nombres</b>	<b>Substratos preferidos</b>	<b>Sitio(s) de corte entre subunidades p10 y p20</b>
Caspasa-1	ICE	YEVD ↓ X WEHD ↓ X	TPLD   S FEDD   A AVQD   N
Caspasa-2	Nedd2, ICH-1	VDVAD ↓ X DEHD ↓ X	DQQD   G EESD   A DNKD   G
Caspasa-3	<b>CPP32</b> , Yama, apopain	DMQD ↓ X DEVD ↓ X	IETD   S ESMD   S
Caspasa-4	ICE <sub>rel II</sub> , TX, ICH-2	LEVD ↓ X	WRVD   S
Caspasa-5	ICE <sub>rel III</sub> , TY	(W/ L) EHD ↓ X (W/ L) EHD ↓ X	LEED   A WRVD   S LEAD   S
Caspasa-6	Mch2	VEID ↓ N VEHD ↓ X	DVVD   N TEVD   A TETD   A
Caspasa-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	DEVD ↓ X	IQAD   S DSVD   A
Caspasa-8	MACH, FLICE, Mch5	IETD ↓ X LETD ↓ X	VETD   S LEMD   L REQD   S
Caspasa-9	ICE-LAP6, Mch6	LEHD ↓ X	PEPD   A DQLD   A
Caspasa-10	Mch4	IEAD ↓ X	IEAD   A SQTD   V
Caspasa-13	ERICE	?	?

Tabla 1. Miembros de la familia de las caspasas humanas (Modificado de Cohen, 1997).

## MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

Para su activación, las caspasas requieren de la proteólisis directa de la proenzima: primero se separa la subunidad p10 y después se remueve el prodominio, aumentando poco a poco la actividad proteolítica (Cohen, 1997; Han y cols., 1997). Entre cada una de estas subunidades, dependiendo de la caspasa, se puede o no encontrar un ligador ("linker") pequeño (de algunos aminoácidos) que también es removido durante la activación. Cada uno de estos cortes se realiza, dentro de la secuencia de la caspasa, después de un ácido aspártico en una secuencia consenso que es igual a la que se encuentra en los substratos que reconoce, por lo que se piensa que son autocatalíticas, además de que son activadas por otras caspasas.

Una vez cortadas, se asocian formando un heterotetrámero de dos subunidades p20 rodeando a 2 subunidades adyacentes de p10. En la subunidad p20 se encuentra el sitio activo, sin embargo se requiere de las dos subunidades

unidas para formar el sitio de reconocimiento del sustrato, de ahí que solamente se activen al dimerizarse. El sitio activo está formado por un pentapéptido altamente conservado en todas las caspasas; en medio de este pentapéptido se encuentra la cisteína que lleva a cabo el ataque nucleofílico del sustrato y en conjunto con una histidina que se encuentra más arriba en la secuencia, forman la díada catalítica.

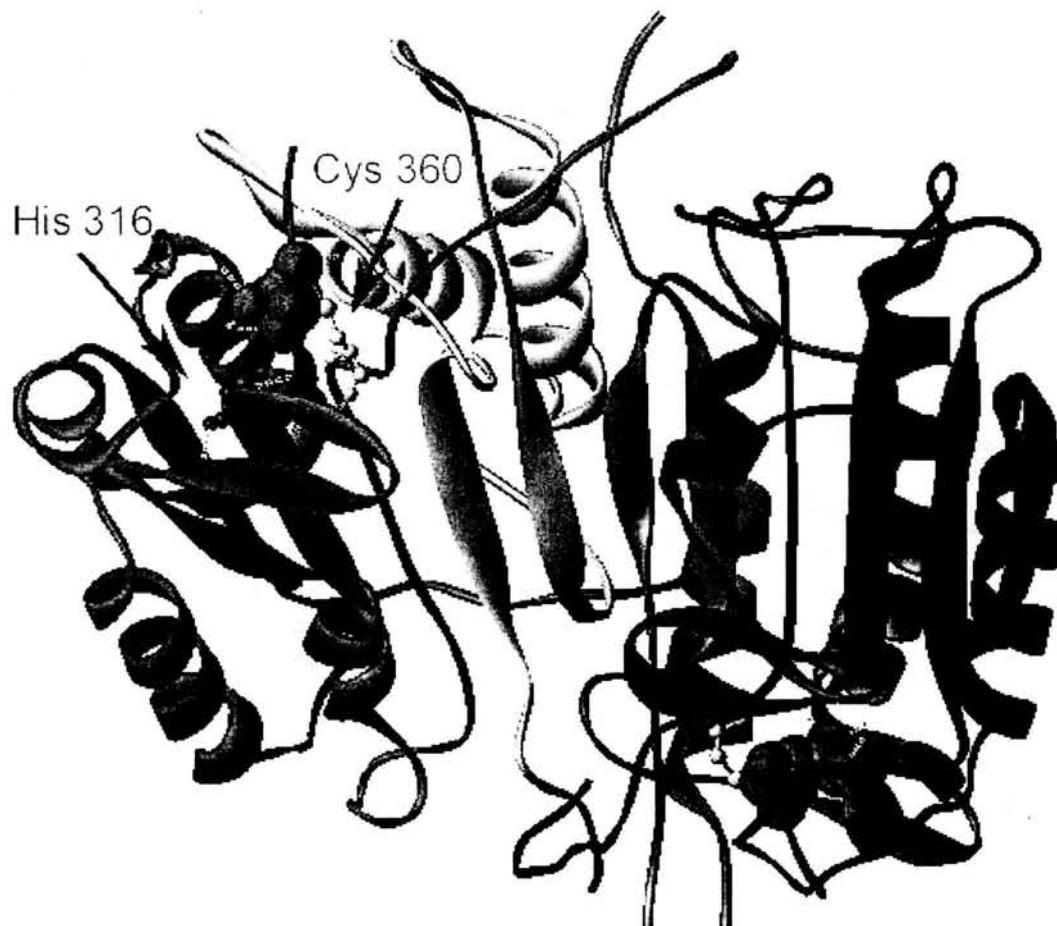


Figura 2. Díada catalítica de caspasas. Modelo de estructura terciaria de la caspasa 8 con el inhibidor IETD-fmk (verde). Las flechas indican la histidina 316 y la cisteína 360 (ambas en la subunidad p20) que forman la díada catalítica.

Las caspasas reconocen sustratos específicos, lo que asegura que el proceso de muerte se lleve a cabo de manera ordenada. Cada caspasa reconoce un tetrapéptido significativamente diferente del que reconocen el resto de las caspasas, lo cual explica la diversidad de sus funciones biológicas; sin embargo no todas las proteínas que contienen la secuencia de tetrapéptido óptima son cortadas, lo que indica que se da un reconocimiento de elementos de la estructura

terciaria de las proteínas. Además, existen interacciones entre la región carboxilo-terminal de la subunidad p20 y la amino-terminal de la subunidad p10 que contribuyen a la estabilidad del homodímero (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Las caspasas pueden diferenciarse en iniciadoras y efectoras basándose en la posición que tienen en la cascada proteolítica durante la apoptosis. A partir de comparaciones de secuencia, estructura secundaria y terciaria, preferencia por el sustrato y participación, las caspasas han sido divididas en 3 subgrupos: uno comprende a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), otro contiene a las típicamente iniciadoras (8, 9 y 10), y un último subgrupo que incluye algunas caspasas iniciadoras (1, 2, 4, 5 y 11), cuyo papel durante la apoptosis no está claramente definido. Cada una de estos subgrupos comparte ciertas características: Las caspasas efectoras contienen típicamente un prodominio N-terminal corto; y las iniciadoras poseen un prodominio largo que funciona en las interacciones proteína-proteína y se cree que es necesario para la regulación de su activación y la iniciación de la cascada proteolítica de caspasas (Lamkanfi y cols., 2002; Cohen, 1997; Thornberry y cols., 1997).

## MODELOS DE ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

Hasta ahora, se han descrito 3 mecanismos generales para la activación de las caspasas (Figura 3):

- a) Procesamiento por alguna otra caspasa. La manera más simple de activación de una caspasa, es su exposición a una caspasa activa, ya que los sitios de corte requeridos para su activación, son los mismos sitios que reconocen en sus sustratos. De esta manera, las caspasas iniciadoras activan a las efectoras.
- b) Por la vía extrínseca de activación de caspasas. Existen proteínas receptoras en la membrana, como Fas/Apo1, que contienen ciertos dominios llamados "de muerte" (Death Domains). Estas moléculas se agrupan entre sí y adicionalmente se unen a otras proteínas por medio de ligandos de muerte formando complejos de señalización. Estos complejos contienen proteínas adaptadoras (CARD, por Caspase Recruitment Domain) que reclutan varias moléculas de procaspasa 8 por medio de interacciones homofílicas, lo que resulta en una alta concentración de la procaspasa. El modelo de proximidad inducida postula que un aumento local de la concentración de proenzimas, ocasiona que la actividad basal que contienen como procaspasas aunque pequeña, es suficiente para cortarse entre sí, activándose mutuamente (Ashkenazi y Dixit, 1998).
- c) La vía intrínseca de las caspasas. La activación se da mediante proteínas adaptadoras. Así, la caspasa 9 requiere de su asociación con un cofactor: Apaf-1. Esta proteína sirve además como reguladora del complejo formado por la caspasa 9, Apaf-1 y citocromo c, que en conjunto forman la holoenzima conocida como "apoptosoma", y que probablemente contenga otras proteínas involucradas en su regulación (Hengartner, 1998; Hengartner, 2000).

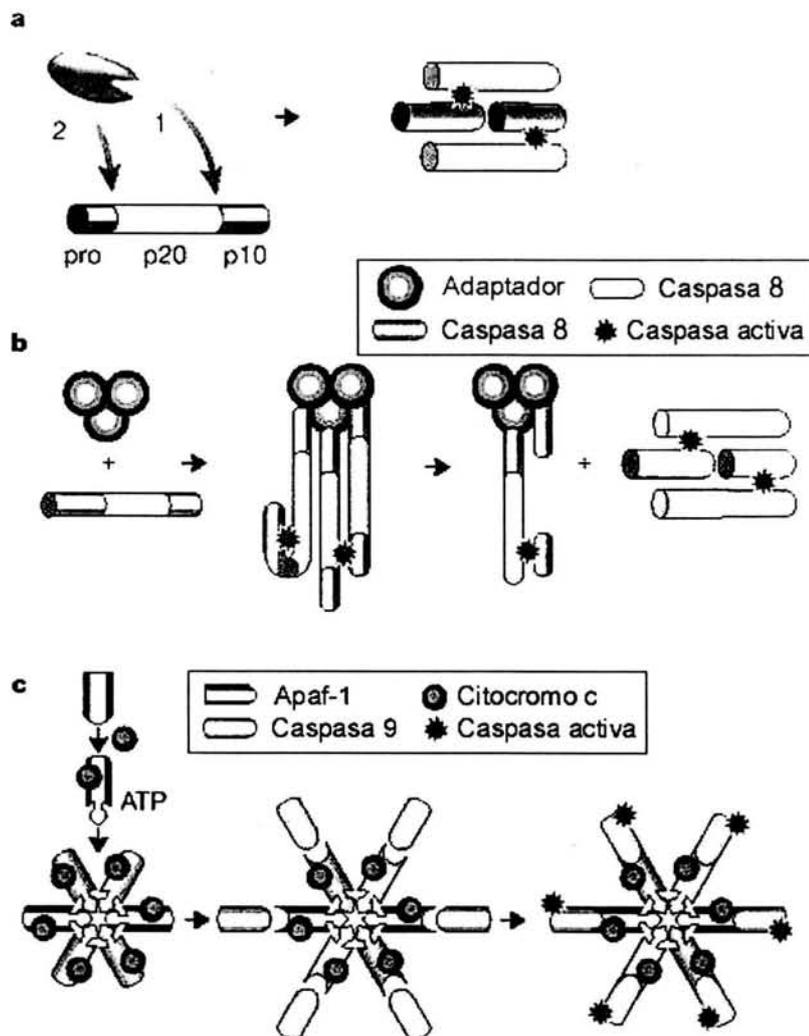


Figura 3. Modelos de activación de las caspasas. a) Procesamiento por alguna otra caspasa. b) Activación por medio de proximidad inducida por adaptadores (dominios de muerte). c) Formación del apoptosoma. Modificado de Hengartner, 2000.

En resumen las caspasas conforman cascadas proteolíticas cuya principal característica es su retro-activación, para amplificar su señal. Generalmente, las caspasas iniciadoras activan a las efectoras. Sin embargo, las caspasas también pueden auto-regularse, activando su propio precursor directa o indirectamente, ya que las caspasas efectoras pueden incluso cortar a las iniciadoras, que a su vez activan más efectoras. Estas son reacciones irreversibles y muy rápidas. Por esto, existen mecanismos muy complejos de inhibición y regulación de su actividad, en las que participan un conjunto de cofactores y proteínas adaptadoras.

## MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LAS CASPASAS

Dentro de los reguladores se encuentran las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, con miembros tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos. Su nombre proviene de las siglas en inglés: **B-cell Lymphoma**, puesto que la primera molécula identificada de esta familia está involucrada en la formación de linfomas de células-B. La familia Bcl-2 posee una gran similitud y se divide en 3 subgrupos: uno contiene a los miembros anti-apoptóticos, mientras que los pro-apoptóticos se reparten en los otros dos. Se cree que las proteínas de esta familia se encuentran asociadas a la membrana mitocondrial, y están involucradas en la liberación de moléculas de la mitocondria hacia el citosol, como el citocromo c e incluso iones. Se propone que la oligomerización de varias de estas proteínas formen poros de transición o canales iónicos en la membrana de la mitocondria. Por ello se piensa que al formar los poros en la mitocondria y modificar la permeabilidad mitocondrial, estas proteínas pueden regular a las caspasas. Los miembros de la familia Bcl-2 también son capaces de regular la activación de las caspasas mediante la interferencia o inducción de esta activación por medio de la asociación con otras proteínas de esta misma familia (Adams y Cory, 1998; Hengartner, 2000).

Otro grupo de proteínas que regulan la actividad de las caspasas, son las IAP's (de las siglas en inglés, **I**nhibitor of **A**poptosis **P**roteins) cuya función es la inhibición de la actividad proteolítica de las caspasas por medio de una interacción directa con las mismas. Estas proteínas, inicialmente encontradas en un baculovirus (en donde su función es evitar el suicidio celular) (Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002), tienen una contraparte celular cuya función es evitar la muerte prematura de las células. Hasta la fecha se han encontrado homólogos de IAPs en insectos, nemátodos y levaduras. En humanos se han descubierto 8 miembros de esta familia cuya definición se caracteriza por poseer un dominio altamente conservado llamado BIR (**B**aculovirus **I**AP **R**epeat), por lo que se ha propuesto cambiar el nombre a BIRPs (Uren y cols., 1998). Su modo de acción consiste en mimetizar el sustrato que reconoce cada caspasa, de manera que al acomodarse dentro de la hendidura donde se encuentra el sitio catalítico en la caspasa, lo bloquea, evitando que cualquier sustrato endógeno pueda alcanzar este sitio, inactivando a la proteasa (Stennicke y cols., 2002).

Además de ésta, existen otras familias en las que algunos de sus miembros son capaces de inhibir la acción de las caspasas: La serpina CmrA (un inhibidor de proteasas de serina) y p35, inhiben a las caspasas mediante la interacción directa con ellas; algunos miembros de la familia Hsp (**H**eat **S**hock **P**roteins); calpains; y hasta las mismas caspasas, modificadas por "corte alternativo" (alternative splicing), son ejemplos de proteínas capaces de interferir con la actividad catalítica de las caspasas. Cabe señalar que dentro de los mecanismos celulares de la regulación de las caspasas existen también los inhibidores de inhibidores de

caspasas: Smac/DIABLO, Htr A2/Omi, NRAGE y XAF -1 son ejemplos conocidos de inhibidores de IAPs (LeBlanc, 2003).

Dado que se ha observado que únicamente es necesaria una secuencia específica de 4 aminoácidos para que las caspasas reconozcan a su substrato, ha sido posible el diseño de inhibidores que mimetizan al substrato endógeno, compitiendo de manera reversible e irreversible con los substratos para pegarse al sitio activo, simulando la acción de los inhibidores naturales. De esta manera se han diseñado inhibidores específicos para prácticamente cada una de las caspasas de mamífero. Estos tetrapéptidos están acoplados a un aldehído (-CHO) o a una cetona (-fmk), lo que impide que la caspasa pueda hidrolizar el enlace (García-Calvo y cols., 1998). Se ha demostrado que estos inhibidores sintéticos pueden inhibir diferencialmente la apoptosis dependiente de caspasas, en función al organismo, el tipo celular, la concentración y el tipo del inhibidor.

## **MCP EN PLANTAS**

Es un hecho muy curioso que hace ya 330 años las primeras células observadas microscópicamente fueron las células de corcho que habían sufrido una MCP [(Hooke, 1665) en Greenberg, 1996]. Además en 1923, siete décadas antes de la explosión en la investigación sobre apoptosis en animales, surgió el concepto de MCP usando como ejemplo la célula de una planta infectada por un hongo [(Allen, 1923) en Jones, 2001]. Finalmente, la palabra "apoptosis" que fue adoptada para nombrar un tipo de muerte programada en células animales, es un término griego que se refiere a la caída de las hojas, la cual es el resultado de un proceso de senescencia, un ejemplo de MCP en plantas (Jones, 2001).

En plantas, como en animales, la MCP es un proceso indispensable para el desarrollo correcto y la sobrevivencia del organismo. Hasta la fecha se han identificado un gran número de procesos en los cuales está involucrada la MCP a lo largo del ciclo de vida de las plantas.

## **LA PARTICIPACIÓN DE LA MCP EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS**

A lo largo del desarrollo normal de las plantas, podemos encontrar ejemplos de MCP, entre ellos la xilogénesis, que es la formación de los haces vasculares. El transporte de agua desde el suelo al resto de la planta es llevado a cabo a través de canales formados por células llamadas xilema. Los canales, o haces vasculares, se forman cuando ciertas células sufren una muerte programada dejando únicamente la pared celular, con dos orificios en los extremos; al juntarse estas células se forman los tubos conductores, indispensables para el transporte de agua y solutos desde la raíz al resto de la planta (Greenberg, 1996; Fukuda, 1997; Roberts y McCann, 2000; Fukuda, 2000).

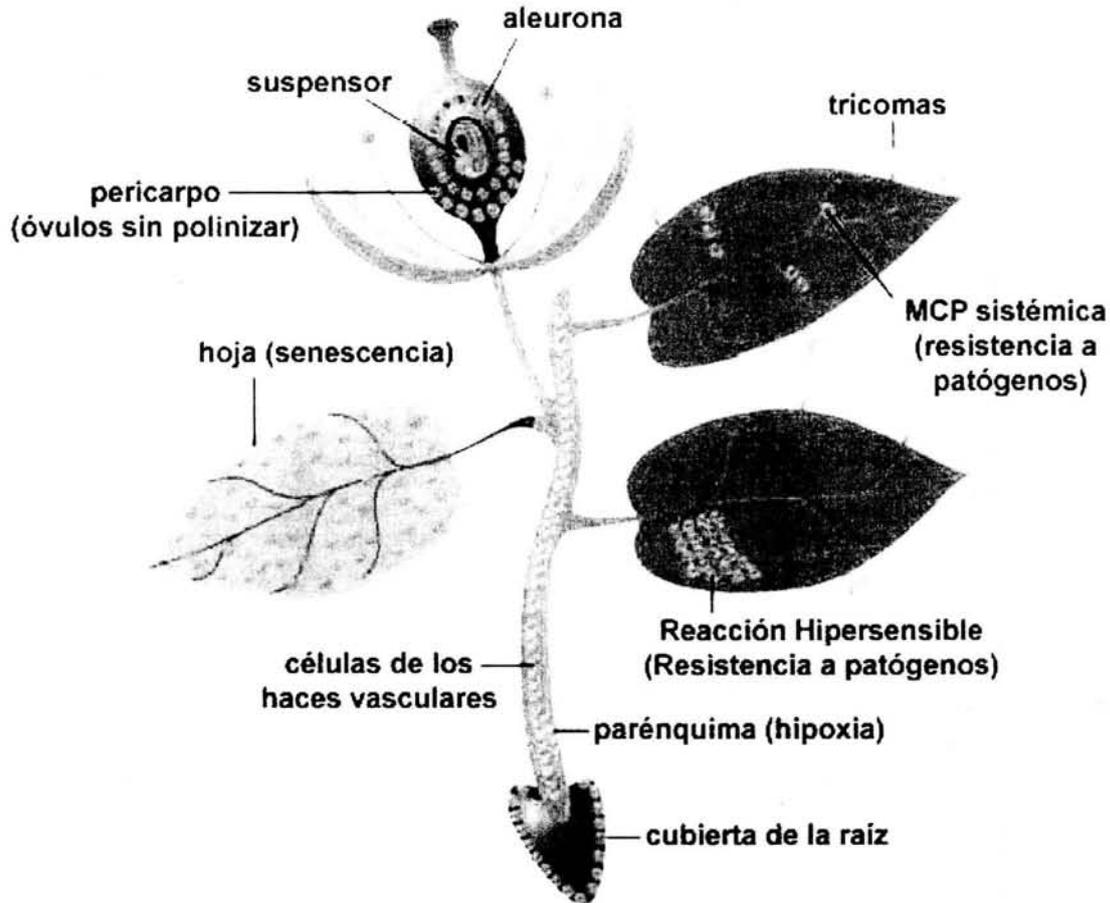


Figura 4. Ejemplos de MCP en plantas (Modificado de Pennell y Lamb, 1997).

También durante el desarrollo y crecimiento de las raíces, el meristemo apical de éstas, formado por una capa de células protectoras, progresivamente va muriendo de manera programada (y no mueren necróticamente, como consecuencia de la abrasión con el suelo), para ser reemplazadas con células nuevas (Pennell y Lamb, 1997).

Durante el desarrollo de las hojas de muchas plantas se presenta el fenómeno de MCP para esculpir las formas diversas de los lóbulos (Jones, 2001). Además, uno de los procesos más estudiados en las plantas, la senescencia o envejecimiento, es otro ejemplo de MCP. La senescencia es la fase final del desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta. Este proceso incluye la muerte celular generalizada de todas las células de algunos órganos, como los pétalos (Xu y Hanson, 2000; Rubinstein, 2000) y hojas, mientras todos los nutrientes de estas células muertas son recuperados, redistribuidos y reusados por otros órganos; en otras palabras, son reciclados (Jones y Dangl, 1996; Greenberg, 1996; Pennell y Lamb, 1997). El mejor ejemplo es la senescencia y muerte de las hojas maduras en plantas perennes deciduas que son eliminadas cuando se forma una zona de separación cerca de la base de la hoja (Greenberg, 1996).

## LA MCP Y LA REPRODUCCIÓN DE LAS PLANTAS

Durante la reproducción de las plantas, la MCP también juega un papel muy importante en varios de los procesos:

- Embriogénesis somática: cuando células totipotenciales se dividen asimétricamente en pares de células, una de ellas deja de sintetizar ADN y muere, mientras que la otra continúa y forma un embrión (Pennell y Lamb, 1997; Filonova y cols., 2000).
- Células de la aleurona: estas células contienen enzimas que digieren al endospermo que alimentará el embrión durante la germinación de la semilla. Cuando se completa la germinación, y la plántula fotosintetiza, las células de la aleurona mueren (Pennell y Lamb, 1997; Young y Gallie, 2000).
- Células del suspensor: su función es sostener mecánicamente al embrión durante su desarrollo dentro del saco embrionario y mueren cuando este desarrollo termina (Jones y Dangl, 1996).
- Células del tapete: las células del tapete forman una capa dentro de las anteras; sus funciones incluyen alimentar a las microsporas que formarán el polen y, cuando esta función termina, las células de este tejido mueren, ayudando a la liberación del polen.
- Tejido de transmisión: este tejido se encuentra a lo largo del pistilo a través del cual crece el tubo polínico para llegar al óvulo. Este tejido muere conforme el tubo polínico se alarga, nutriéndose del tejido al mismo tiempo que es dirigido a través de las células muertas. La relación entre el tejido y el polen es específica pues sólo el polen compatible induce esta muerte.

Otros de los ejemplos incluyen: la muerte programada del meristemo apical floral, que desarrollará únicamente los primordios de estambres o de carpelos en plantas unisexuales, eliminando los sobrantes; los estomios, tejido dentro de las anteras cuya muerte permite la liberación del polen; las megasporas no funcionales, ya que sólo una de ellas sobrevivirá para formar el gametofito femenino; y las células antipodales y sinérgidas que degeneran durante la fertilización en el óvulo (Jones y Dangl, 1996; Wu y Cheung, 2000).

## LA MCP Y LAS INTERACCIONES DE LA PLANTA CON EL AMBIENTE

Muchas de las interacciones que tiene la planta con su entorno a lo largo de su vida, le son dañinas. De tal forma que las plantas han evolucionado creando varios sistemas de defensa que les permiten adaptarse. En algunos de estos sistemas tanto en las interacciones abióticas como en las bióticas participa la MPC.

La hipoxia o falta de oxígeno, es una interacción abiótica, que se produce en las raíces, y cuya respuesta es la muerte programada de ciertas células, creando un tejido alterado llamado aerénquima, formado por muchos espacios que antes

estaban ocupados por células y que después de su muerte y completa remoción, dejan un hueco por donde se facilita el paso del oxígeno desde las partes aéreas (Pennell y Lamb, 1997; Jones, 2001). Otros ejemplos de estas interacciones abióticas incluyen el estrés causado por la temperatura, tanto calor como frío (Yamada y cols., 2001), la salinidad y el estrés osmótico, la contaminación por metales, la falta de agua, el ozono y la radiación UV (Danon y Gallois, 1998). Todos estos estímulos producen un daño en las células que induce la MCP.

Las plantas interactúan con otros organismos vivos, muchos de ellos patógenos, que inducen las respuestas de defensa y dentro de esta respuesta encontramos la MCP. Así, las infecciones producidas por bacterias, hongos y hasta virus, inducen una respuesta de defensa por parte de la planta para evitar que la infección se propague por todo el organismo. Esta respuesta incluye la delimitación del patógeno mediante el aislamiento de las células infectadas, de manera que las células que rodean la zona invadida por el patógeno, son programadas para morir. Al morir las células infectadas y las adyacentes, se evita que los organismos patógenos se esparzan, lo que se manifiesta como unas manchas amarillas o zonas de tejido seco en las hojas. Este tipo de respuesta de defensa ha sido llamado "Respuesta Hipersensible", y es uno de los tipos de MCP más estudiados en las plantas (Heath, 2000).

## CONSERVACIÓN FUNCIONAL DEL PROCESO

En todos los diferentes tipos de muerte celular en plantas mencionados anteriormente existen evidencias bioquímicas o morfológicas que sugieren que el proceso es programado; además, comparten muchas de las características que se presentan durante la muerte apoptótica de las células animales. En algunos casos se observan las escaleras de ADN (con fragmentos del tamaño de los oligonucleosomas) y la condensación nuclear en tabaco, *Zinnia* y tomate (Mittler R y Lam, 1995; Obara y cols., 2001), así como la detección de extremos 3' hidroxilo terminales por TUNEL (De Jong y cols., 2000) (Terminal 3' UTP Nick end labeling). En células de tabaco se ha visto que se requiere de la expresión *de novo* de proteínas para llevar a cabo el proceso (Elbaz y cols., 2002); también se ha detectado la participación de la mitocondria y de las especies reactivas de oxígeno, así como flujos de iones (como el calcio [Levine y cols., 1996; Xu y Heath, 1998]) en algunos de los ejemplos mencionados. Además, muchos de los inductores típicos de apoptosis en células animales como toxinas e inhibidores de cinasas y topoisomerasas, tienen el mismo efecto en las células vegetales (De Jong y cols., 2000). Adicionalmente se han generado plantas mutantes en las cuales el proceso de muerte celular se presenta espontáneamente, principalmente simulando la respuesta hipersensible (Mittler y Rizhsky, 2000), o que son insensibles a ciertos estímulos de muerte. Esto implica que todo el proceso de muerte está controlado genéticamente, y al igual que en los animales, es programado (Richberg y cols.,

1998; Lam y cols., 1999; Jones, 2000; Danon y cols., 2000; Beers y McDowell, 2001).

Debido a que la muerte programada se presenta en prácticamente todos los organismos vivos, recientemente ha surgido el interés de investigar la analogía entre los elementos de la MCP presente en animales y los encontrados en plantas durante procesos fisiológicos como el desarrollo normal o en defensa a ciertos patógenos. Se ha propuesto que en plantas existen básicamente tres tipos distintos de muerte programada en analogía a lo encontrado en animales: 1) La "reacción hipersensible", que es la muerte causada por una infección por patógenos y que presenta la mayor similitud con la apoptosis animal; 2) la muerte que se presenta durante la maduración o la senescencia de frutos y hojas, y que es la que comparte menos características con la apoptosis animal; y 3) la muerte causada durante el desarrollo de órganos, como la xilogénesis, que comparte características de las dos anteriores (Fukuda, 2000; Jones, 2001). Basado en lo anterior se han ideado diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* para inducir cualquiera de los tres tipos de muerte mencionados (McCabe y Leaver, 2000).

## ANTECEDENTES

La degradación de las proteínas es una de las características principales que se observan en cualquier tipo de muerte celular. Durante la muerte programada (MCP) se lleva a cabo una actividad proteolítica característica destinada al desmantelamiento ordenado de los constituyentes celulares y está mediada en metazoarios por una serie de proteasas conocidas como caspasas que degradan substratos específicos. Por el contrario, durante la muerte necrótica los substratos proteicos son degradados por la activación de proteasas generales que son liberadas de sus compartimentos celulares, lo que resulta en una degradación desordenada de las estructuras celulares.

Como ocurre en células animales, durante la MCP de plantas existe una gran actividad proteolítica (Beers y Freeman, 1997). En células vegetales se ha sabido de la participación de proteasas específicas que son activadas durante muchos de los procesos fisiológicos en los cuales se presenta la muerte programada (Delorme y cols., 2000). Dentro de las proteasas detectadas encontramos las proteasas de cisteína, serina, de aspártico, de treonina y metaloproteasas, cuya clasificación depende de su mecanismo catalítico (Beers y cols., 2000). Durante la MCP producida por el estrés oxidativo y el ataque por patógenos en células de soya se ha detectado la participación de proteasas de cisteína y de sus inhibidores endógenos (Solomon y colaboradores, 1999). Además, D´Silva y cols. (1998) detectaron la activación de proteasas de cisteína durante la respuesta hipersensible producida por un hongo en chícharo, donde también encontraron la degradación de un substrato de caspasas, la enzima poly-ADP-ribosa polimerasa (PARP).

Debido a que la maquinaria molecular de la apoptosis se encuentra muy conservada en todos los metazoarios, y que se han observado características celulares morfológicas y bioquímicas similares en la muerte de plantas, se propuso la idea de que esta maquinaria molecular fuera similar en los vegetales. Fue así como del Pozo y Lam (1998) demostraron por primera vez la acción de caspasas en plantas utilizando un conjunto de inhibidores de proteasas con distintas afinidades. Este grupo demostró que la respuesta hipersensible inducida por la bacteria *Pseudomonas syringae* en hojas de tabaco se reducía únicamente por inhibidores de proteasas de cisteína de amplio espectro (el inhibidor fue antipaína) y más aún, por los inhibidores específicos de caspasas (**Ac-DEVD-CHO** para la caspasa 3 y **Ac-YVAD-CHO** para la caspasa 1). Otros inhibidores de proteasas de serina o inclusive de cisteína, no afectaron la muerte de estas plantas.

Pero más importante aún fue demostrar que existe actividad de caspasas dentro de las células de las plantas, puesto que registraron la actividad de caspasa tipo 1, utilizando el péptido fluorogénico Ac-YVAD-AMC, en un extracto de células de tabaco bajo una respuesta hipersensible (Lam y del Pozo, 2000). Asimismo, los inhibidores de las caspasas 1 y 3 podían reducir la actividad detectada, sin

embargo los inhibidores generales de proteasas usados no lograron disminuir esta actividad. Esto sugiere la participación de proteínas parecidas a las caspasas durante el proceso de muerte celular programada.

Estos resultados se confirmaron en un cultivo de células de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en suspensión tratadas con 3 compuestos químicos diferentes: camptotecina, un inhibidor de Topoisomerasa I; estaurosporina, un inhibidor de proteínas cinasas C; y fumonisina B1, una micotoxina que es análoga a esfinganinas y que produce muerte celular tanto en animales como en plantas. Además de la condensación nuclear y la fragmentación del ADN, observaron que todo el proceso podía ser disminuido mediante la aplicación de inhibidores específicos de caspasas y no por inhibidores más generales (De Jong y cols., 2000).

La participación de proteínas parecidas a caspasas fue apoyada en otros experimentos mediante el uso de estos inhibidores específicos para las caspasas en modelos de muerte de células en suspensión de tabaco (Elbaz y cols., 2002; Mlejnek y Procházka, 2002), zanahoria (Zhao y cols., 1999) y cebada (Korthout y cols., 2000); así como en modelos mixtos de componentes celulares animales y vegetales (Sun y cols., 1999; Korthout y cols., 2000) inducidos bajo un sinnúmero de estímulos de MCP, tanto químicos como bióticos y de estrés. Adicionalmente, se ha detectado actividad proteolítica de caspasas mediante el uso de substratos fluorogénicos y colorimétricos (Korthout y cols., 2000) en células tratadas con calor (Tian y cols., 2000), purinas (Mlejnek y Procházka, 2002) o mediante el silenciamiento del proteosoma (Kim y cols., 2003).

Otros estudios en modelos de muerte de células en suspensión de zanahoria (Zhao y cols., 1999), de tabaco (Sun y cols., 1999) y en cotiledones de pepino (Balk y cols., 1999) han demostrado que es necesaria la salida del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol para que se activen los componentes de esta vía, como ocurre en modelos de apoptosis en animales, donde esta salida es uno de los primeros pasos en la activación de la cascada de señales en que se activan las caspasas. Adicionalmente se ha visto que la salida del citocromo *c* hacia el citosol es un evento anterior a la activación de las proteínas parecidas a caspasas, puesto que el inhibidor de la caspasa 3 no evita esta salida, lo que también es similar a lo ocurrido en células de mamífero. En este mismo estudio se detectó la degradación de PARP dependiente de caspasas 1 y 3, y que se necesita un tiempo intermedio entre la salida del citocromo *c* y la degradación de PARP, con lo que se concluyó que existen una serie de pasos intermedios entre estos dos eventos. Lo anterior sugiere que al igual que en animales, se requiere la participación de proteínas (como otras caspasas) en este proceso intermedio.

En los estudios de Sun y cols. (1999) también se utilizó un modelo mixto de apoptosis de plantas y animales y observaron que al añadir núcleos de ratón al extracto de citosol y mitocondrias de tabaco junto con menadiona (el inductor de muerte), los núcleos presentaron una morfología parecida a la apoptosis animal, es decir, condensación de cromatina y degradación de DNA nuclear con fragmentos de tamaños de oligonucleosomas. En este caso, el inhibidor de caspasa 3 impidió la

formación de estos patrones de muerte. Los mismos resultados se obtuvieron si en vez de añadir las mitocondrias de tabaco se agregaba citocromo *c* puro.

Otras de las evidencias encontradas durante la MCP de plantas que involucran proteasas parecidas a caspasas incluye el rompimiento de otros substratos conocidos de caspasas, la lámina A y lámina C (Zhao y cols., 1999). Además, por medio de la microinyección subcelular del substrato fluorogénico de la caspasa 3 se localizó la actividad de caspasa en el citosol, en vez de la vacuola, que es el compartimento celular en donde se localizan la mayoría de las proteasas generales de la célula vegetal (Korthout y cols., 2000).

Por otro lado, utilizando técnicas de biología molecular se ha estudiado el papel que tienen los genes anti y pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 en la MCP en plantas. Se ha visto que la muerte celular inducida por la expresión de Bax en hojas de tabaco es muy parecida a la respuesta hipersensible que se presenta frente a la infección del virus de mosaico del tabaco. Es posible que esta respuesta se deba a la capacidad del Bax en formar poros en la mitocondria, permitiendo la salida de iones y otras moléculas proapoptóticas como Apaf y/o citocromo *c* (Lacomme y Santa Cruz, 1999). También se han creado líneas de plantas que expresan moléculas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, incluyendo Bcl-x<sub>L</sub>, Ced-9 y Bcl-2, así como los genes virales anti-apoptóticos Op-IAP y p35, cuya capacidad inhibitoria de la apoptosis consiste en inhibir directamente a las caspasas. En todos los casos ocurrió una disminución de los efectos de la MCP durante la reacción hipersensible en hojas de tabaco y tomate (Mitsuhara y cols., 1999; Dickman y cols., 2001; Lincoln y cols., 2002). Además se ha predicho que la capacidad inhibitoria de p35 sólo puede funcionar sobre proteasas con una geometría de caspasa en su sitio activo (Stennicke y colaboradores, 2002). Hasta la fecha no se han encontrado todos los homólogos de estos genes a nivel de secuencia en las plantas, aunque por medio del uso de anticuerpos se ha detectado un posible homólogo de Bcl-2 en células de maíz, tabaco, *Brassica napus* y en clamidomonas, asociado a las mitocondrias, a los plástidos y al núcleo (Dion y cols., 1997). También se ha identificado un homólogo de un inhibidor de Bax (BI-1), tanto en plantas (tabaco y Arabidopsis) como en levadura; y se ha demostrado su acción anti-apoptótica (Xu y Reed, 1998; Kawai y cols., 1999; Lam y cols., 2001; Bolduc y Brisson, 2002; Bolduc y cols., 2003). Igualmente, ha sido posible encontrar en plantas proteínas con dominios BIR, que son los que contienen las inhibidoras de apoptosis, las IAPs (Van der Biezen y Jones, 1998).

A pesar de que no se habían encontrado homólogos a nivel de secuencia de las caspasas en organismos diferentes a los metazoarios, mediante el uso de las búsquedas iterativas empleando el programa Psi-Blast, Uren y cols. (2000) encontraron una familia completa de homólogos muy distantes de las caspasas de metazoarios que se denominaron "metacaspasas". Esta nueva familia de proteínas contiene la cisteína y la histidina conservadas que forman la díada catalítica en las caspasas, y se distribuyen desde los protozoarios (*Trypanosoma* y *Plasmodium*) hasta las plantas y los hongos (levadura); sin incluir a los metazoarios. Al mismo tiempo se encontró otra familia de proteínas intermedias

entre las metacaspasas y las caspasas "clásicas", las cuales se les bautizó como "paracaspasas". Estas proteasas se encuentran en metazoarios (incluyendo al hombre) y en el protozoario *Dictiostelium discoideum* (Uren y cols., 2000). Posteriormente Aravind y Koonin (2002) elaboraron una clasificación para todas estas proteínas, creando un gran grupo basándose tanto en la secuencia primaria como en las predicciones de la estructuras secundaria y terciaria. A este grupo se le llamó "Pliegue Caspasa-Hemoglobinas" (Caspase-Hemoglobinase Fold, en inglés).

Hasta la fecha se han clonado metacaspasas de varios protozoarios en los cuales se ha relacionado su función con algún tipo de muerte celular (Szallies y cols., 2002). Pero lo más importante ha sido la clonación de la primera metacaspasa de la levadura (YCA1), en la que se comprobó la actividad de caspasa que tiene esta proteasa utilizando un sistema de sobreexpresión de la proteína en conjunto con un estímulo inductor de muerte ( $H_2O_2$ ). Esta metacaspasa cortó los substratos fluorogénicos específicos para caspasa 6, 8, y en menor grado, la caspasa 3. Además, por medio del uso de anticuerpos se comprobó que esta proteasa es cortada en una subunidad chica y otra grande para su activación (Madeo y cols., 2002). Con estos experimentos se demostró que es necesario un estímulo para que la metacaspasa pueda activarse.

Las metacaspasas se han clasificado en dos tipos de acuerdo a su secuencia de aminoácidos:

- Tipo I. Contienen un prodominio amino-terminal grande, rico en prolina, que incluye un dedo de zinc y una homología con algunas proteínas de defensa de plantas (como LSD-1).
- Tipo II. No poseen prodominio y sólo se han encontrado en plantas.

Todo esto en conjunto sugiere una conservación de la maquinaria molecular involucrada en la MCP en todos los organismos multicelulares, incluyendo a las plantas. Sin embargo, a pesar de la información existente sobre apoptosis en plantas, no existía ninguna evidencia de proteasas parecidas a las caspasas que hubieran sido clonadas de plantas (Aravind y cols., 2001; Woltering y cols., 2002). Durante la elaboración de este proyecto de investigación se reportó la clonación de la primera metacaspasa de la planta *Lycopersicon esculentum* (Hoerberichts y cols., 2003). Pese a ello, sólo se demostró la expresión de ARN mensajero de este gen bajo estímulos que inducen una respuesta hipersensible en la planta, sin llegar a relacionarla con la muerte celular programada.

En este trabajo se aisló una metacaspasa de *Arabidopsis thaliana* a la que denominamos AtMCA1. El mensajero de AtMCA1 se acumula en plantas sometidas a inductores químicos de muerte celular. Además, la participación de AtMCA1 como mediadora de la muerte celular se demostró en experimentos de expresión transitoria de AtMCA1 en sentido y antisentido en cultivos de células en suspensión de *A. thaliana*.

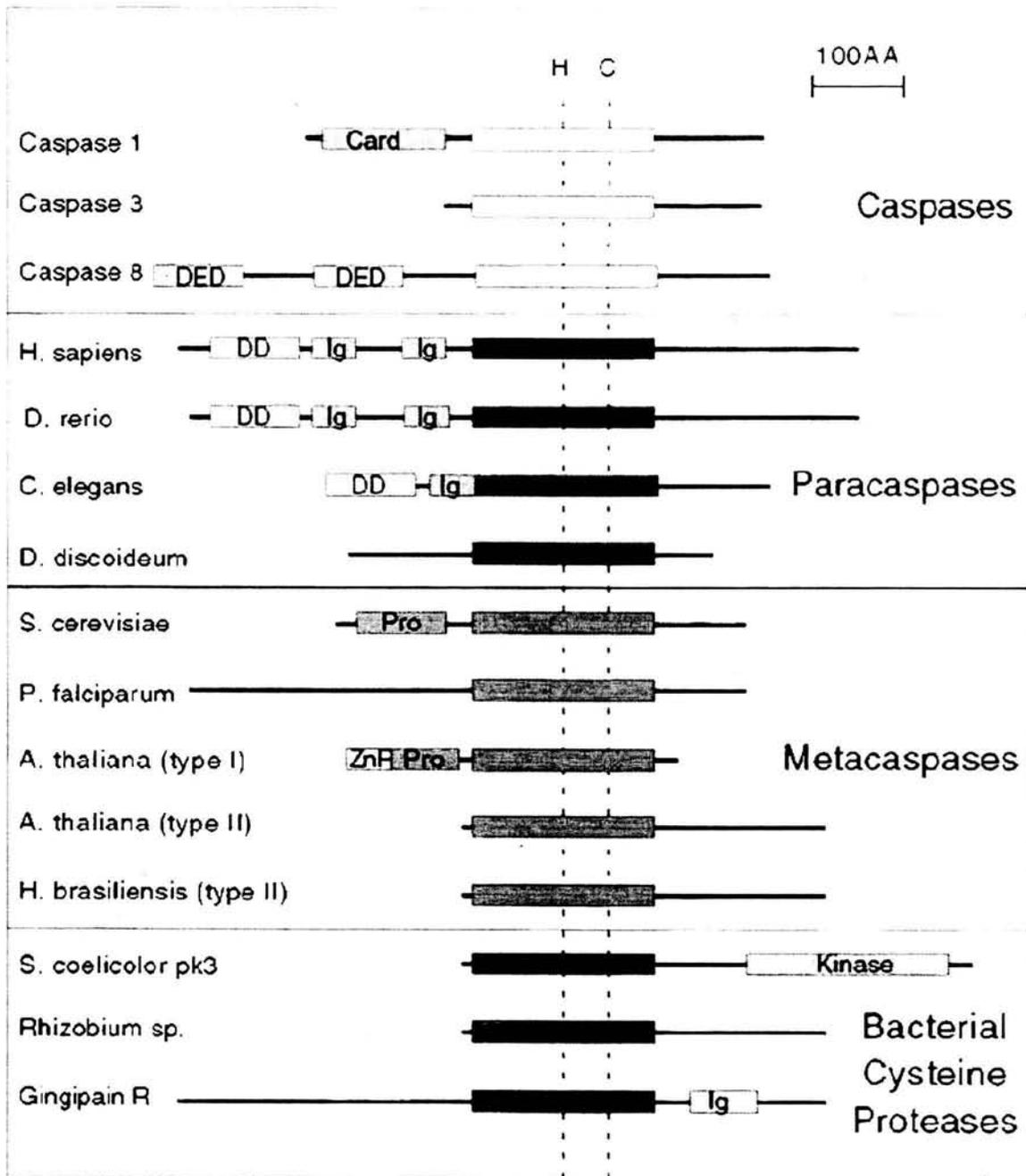


Figura 5. Esquema de la alineación de las caspasas con las metacaspasas y las paracaspasas, junto con las proteasas bacterianas homólogas. A la izquierda se encuentra el nombre del organismo en donde se encontraron. Tomado de Uren y cols., 2000.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de metacaspasas en *Arabidopsis thaliana* y evaluar su participación en la muerte celular programada

## OBJETIVOS PARTICULARES

Buscar la expresión de alguna metacaspasa en *A. thaliana* inducida por una condición que involucre la muerte celular como la infección por la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*

Medir la actividad proteolítica de la metacaspasa obtenida, por medio de la expresión en *E. Coli* utilizando substratos para caspasas

Cuantificar la viabilidad celular en células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* tratadas con peróxido de hidrógeno y estaurosporina y relacionarla con un parámetro de MCP, como la condensación de núcleos

Evaluar la expresión de la metacaspasa obtenida durante la respuesta a estímulos que inducen MCP tanto en células en suspensión (con estaurosporina y peróxido de hidrógeno) como en plantas de *Arabidopsis thaliana* (con ácido salicílico, herida mecánica, e infecciones con bacterias y hongos)

Estudiar el efecto de expresar transitoriamente, bajo un promotor constitutivo, el gen de la metacaspasa en sentido y antisentido en la muerte celular y en la condensación de la cromatina de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* empleando un sistema de infección con *Agrobacterium tumefaciens*

# METODOLOGÍA

## CLONACIÓN

### DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La secuencia de los oligonucleótidos degenerados se diseñó en base a la alineación de las secuencias de todas las metacaspasas de *A. thaliana*. Los oligonucleótidos degenerados se sintetizaron en el departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con las siguientes secuencias:

Delantero	CAYTWCWSYGGHCAYGG
Reverso	CCRCTRTRKRCARGMRTC

Donde **M**=A+C, **R**=A+G, **W**=A+T, **S**=C+G, **Y**=C+T, **K**=G+T, **H**=A+T+C.

### CINÉTICAS DE TRATAMIENTOS PARA PLANTAS

Las plantas *Arabidopsis thaliana* var. Columbia crecidas durante 3 semanas fueron tratadas con los distintos inductores de muerte a diferentes tiempos, específicos para cada tratamiento. A cada tiempo, la parte vegetativa de la planta sin raíz ni inflorescencia fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y puesta en una bolsa de plástico a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizada, ya fuera para extracción de ARN o de ADN.

### EXTRACCIÓN DE ARN DE PLANTAS

El ARN se extrajo de plantas de *Arabidopsis thaliana* congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  basado en el método de Chirjwin y cols. (1979).

Se molió 1 g de tejido fresco con 5 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 0.5 M pH 8; EDTA 0.125 M pH 8; SDS 5 %) en un Politrón PT 10-3S evitando que la muestra se descongelara. Se centrifugó por 10 minutos a 5,600 g a  $20^{\circ}\text{C}$  y se colectó el sobrenadante. Se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:49:1) y agitó con el vórtex; se centrifugó por 5 minutos a 5,600 g. Se tomó el sobrenadante cuidando no extraer el fenol-cloroformo y se agregó otro volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (49 : 1) para luego agitar con el vórtex y centrifugar a 5,600 g durante 5 minutos. Esta extracción con cloroformo-alcohol isoamílico se repitió 2 veces. El sobrenadante se colectó y se le añadió un volumen igual de una solución de LiCl 8 M para precipitar durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esto se centrifugó nuevamente a 5,600 g durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante para obtener una pastilla que se

resuspendió en agua (200  $\mu$ l en un tubo eppendorff). Se volvió a precipitar agregando primero un 1/10 de volumen de NaAc 3 M pH 5.5 y después 3 volúmenes de etanol 96 % y se dejó toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 10,000 g a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla que quedaba se secó a temperatura ambiente y se lavó con etanol al 70 % (200  $\mu$ l) y finalmente se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua. Se cuantificó midiendo la D.O. a 260 nm (se considera 1 U de D.O. = a 40  $\mu$ g de RNA).

## RT-PCR

En una reacción para PCR se mezcló la muestra de ARN (2  $\mu$ g), el oligo-dT (500  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se completó la reacción a 12  $\mu$ l con agua. Se calentó en el termociclador a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, al término de los cuales se sacó la reacción del termociclador y se añadieron: 1  $\mu$ l de dNTP's (10 mM), 2  $\mu$ l de DTT (0.1 M) y 4  $\mu$ l de buffer de reacción 5X para RT-PCR (First Strand) en una reacción total de 19  $\mu$ l. Se calentó en el termociclador a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos para luego agregarle 1  $\mu$ l de 200 Unidades/ $\mu$ l de la enzima Reverso-Transcriptasa de virus murino (Gibco), y luego se calentó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 50 minutos con un paso final de 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ . El producto final es el ADNc.

## PCR

Para reacciones de 50  $\mu$ l totales, se mezclaron: 5  $\mu$ l Buffer para PCR 10X, 1  $\mu$ l dNTP's 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ l de Magnesio 25 mM, 1  $\mu$ l de oligonucleótidos 3' y 5' (10 mM), Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ l, y 2  $\mu$ l de cDNA. Se programó el termociclador de la siguiente manera:

1 ciclo de 1 min a  $95^{\circ}\text{C}$  para separar las cadenas

de 25 a 35 ciclos en 3 pasos:

- 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$
- 30 segundos a la temperatura de apareamiento ( $58^{\circ}\text{C}$  y  $55^{\circ}\text{C}$  para AtMCA1 y Apt-I, respectivamente)
- 1min 30 s a  $68^{\circ}\text{C}$

1 ciclo de 5 min a  $72^{\circ}\text{C}$

El producto se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, utilizando luz UV.

## CLONACIÓN EN TOPO TA

Se agregó 1  $\mu$ l de NaCl 0.12 M, 4  $\mu$ l de producto de PCR de AtMCA1 (aproximadamente 100 ng) y 1  $\mu$ l de vector pCR II-TOPO. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos (según las instrucciones del proveedor).

## TRANSFORMACIÓN EN *Escherichia coli*

Se descongelaron las células electrocompetentes (*Escherichia coli* cepa XLBlue) en hielo, mientras se ponía la celda para electroporación también en hielo. Se agregó de 2 a 5  $\mu\text{l}$  de producto de la ligación TOPO TA-AtMCA1 a las células en esterilidad, y se transfirieron todas las células (60  $\mu\text{l}$ ) a la celda y dejar en frío mientras se hacía la electroporación. Utilizando un electroporador se realizó la transformación, e inmediatamente se añadió un ml de medio LB líquido sin antibiótico y se transfirieron las células de la celda a un tubo eppendorff, el cual se puso a recuperar durante una hora en una incubadora a 37°C con agitación. Se prepararon cajas de petri con medio LB sólido (con agar) con antibiótico apropiado (ampicilina o carbenicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y después de la recuperación se plaquearon 50, 100 y 200 ml de las células en LB; y finalmente el resto de las células se centrifugaron, se decantó la mayor parte del medio líquido para que se resuspendieran las células en 50  $\mu\text{l}$  y se terminó de plaquear, todo en cajas diferentes. Se pusieron a crecer las cajas a 37°C durante toda la noche para al día siguiente observar las colonias.

Para este caso, donde la transformación es el producto de la clonación del vector TOPO, se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de X-gal (20 mg/ml) para la selección de colonias y se seleccionaron las colonias blancas que tienen el gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa interrumpido por el fragmento clonado.

## PCR EN COLONIA

Con una punta de micropipeta se tomó una colonia y se "parchó" solo una parte de ella en la caja para que el resto se metiera en un tubo para PCR con 20  $\mu\text{l}$  de agua. Esto se repitió con varias colonias en diferentes tubos, y al terminar se retiraron las puntas y se volvieron a poner nuevas puntas con otras colonias previamente parchadas en los mismos tubos. De esta manera se juntaron varias colonias en un solo tubo para PCR. Se agregaron los oligonucleótidos 3' y 5' (10 pmoles/ $\mu\text{l}$ ), los dNTP's a 10  $\mu\text{M}$ , el buffer para PCR 1X y la enzima TAQ polimerasa en una reacción total de 25  $\mu\text{l}$ .

El programa que se utilizó en el termociclador incluye:

- 5 minutos a 70°C para *E. coli* que sirve para romper las células y que salga el ADN.
- 3 pasos que se repiten de 25 a 35 ciclos:
  - 95°C durante 30 segundos
  - 1 minuto a la temperatura de apareamiento (TM) más baja de los oligonucleótidos (58°C para AtMCA1 y 55°C para Apt-I)
  - 72°C a 1 kb por minuto (dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar será la duración de este paso)
- Un último paso de 3 minutos a 72°C para que se completen las cadenas

El producto se corrió en un gel de agarosa al 1 %.

## EXTRACCIÓN DE ADN DE BACTERIAS (Mini Preps)

Se puso a crecer una colonia de bacterias (*E. coli* a 37°C) en LB líquido con el antibiótico adecuado (carbenicilina o ampicilina 100 µg/ml) durante toda la noche. Las células se centrifugaron 2 minutos a 8,000 g en una microcentrífuga y se resuspendieron en 100 µl de solución I (50 mM Glucosa; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA) en un tubo eppendorff. Se agregó RNAsa (10 µg/ml), se mezcló con 200 µl de solución II (SDS 1 %; 0.2 N NaOH) y se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se añadieron 150 µl de solución III (Acetato de potasio 5 M; ácido acético glacial 11.5 %) y se volvió a incubar en hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 8,000 g durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se agregaron ½ volumen de fenol saturado y ½ volumen de cloroformo. Se mezcló con el vórtex y luego se centrifugó 8,000 g durante 5 minutos para después tomar la fase acuosa. Para precipitar se utilizaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se agitó por inversión y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Entonces se centrifugó 8,000 g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70 %. La pastilla que queda se dejó secar al aire libre o en vacío y finalmente se disolvió en 50 µl de agua.

## DIGESTIÓN DE ADN

Aproximadamente de 50 a 500 ng de ADN se mezclaron con 5 unidades (0.5 µl) de la enzima de restricción a utilizar, junto con una concentración 1X del buffer de reacción respectivo (siguiendo las instrucciones del proveedor) y se completó la reacción de 20 µl con agua. Se incubó durante un periodo mínimo de 1 hora y hasta toda la noche a 37°C. La excepción es la enzima SmaI que se incubaba a 25°C. En una electroforesis en gel de agarosa al 1 % se revisaron las digestiones con bromuro de etidio y luz UV

## SECUENCIACIÓN

Las muestras de ADN fueron secuenciadas (secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer Applied Biosystems) en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

## SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

## CONSTRUCCIÓN DE VECTORES

Se digirió el ADN de la construcción previamente hecha, TOPO-AtMCA1, con las enzimas BamHI/XbaI y se subclonó en el vector pProEX HTa, dando la construcción **HTa-AtMCA1**.

Para el caso de la caspasa 3 humana (CPP32), se digirió a partir del vector pBluescript II KS+ con las enzimas de restricción EcoRI/PstI y se subclonó en el vector pProEX HTb, resultando en **HTb-CPP32**. Estas construcciones más los vectores solos (HTa y HTb) fueron transformadas en células de *E. coli* cepa XLBlue. Posteriormente se extrajeron los plásmidos con las construcciones y se transformaron en la cepa BL21, para los ensayos de sobreexpresión de proteína. Para verificar las construcciones se utilizó el patrón de digestión para observar el producto clonado, así como la amplificación por PCR, usando como oligonucleótidos específicos para AtMCA1 y CPP32, y también con la técnica de "búsqueda" en colonia con radioactividad, empleando los fragmentos amplificados por PCR como sondas.

Como los vectores pProEX tienen un cassette de resistencia a kanamicina para su selección, el crecimiento durante la noche, para la transformación y extracción de ADN, se realizó en medio LB con kanamicina 50 µg/ml.

El fragmento de la construcción con AtMCA1 se mandó secuenciar utilizando el iniciador M13/pUC Reverso del vector pProEX para corroborar que la secuencia estuviera correcta y en fase.

## LIGACIÓN DE ADN

La banda correspondiente al fragmento digerido o al vector digerido se cortó tratando de llevar lo menos posible de agarosa. La banda se colocó en un tubo eppendorff de 500 µl con el fondo perforado y con un pedazo de fibra en el fondo que ayuda a atrapar la agarosa; este tubo se colocó sobre otro de 1.5 ml y se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad en la microcentrífuga.

En una reacción total de 20 µl se mezclaron buffer de ligación 1x, ATP 1 µM, DTT 1 µM, agua, entre 100 y 500 ng de ADN del fragmento a ligar con 50 a 200 ng de vector para una relación aproximada entre ambos de 5 : 1 (esta relación varía dependiendo de la concentración del ADN de cada uno y del tamaño del fragmento y del plásmido) y se incubó toda la noche a 25°C.

## TRANSFORMACIÓN DEL PRODUCTO DE LIGACIÓN EN *Escherichia coli*

Después de ligar, se agregó 10 µl de agua para llevar la reacción a 30 µl. Se inactivó la ligasa a 65°C durante 15 minutos. Se añadió 400 µl de n-Butanol y se agitó con la mano para mezclar. Se centrifugó por 8 minutos a 10,000 g y se removió el n-Butanol con cuidado para no llevarse la pastilla. Ésta se lavó con etanol al 96 % y se centrifugó por 2 minutos. Se eliminó el etanol y se secó la pastilla a temperatura ambiente o al vacío. La pastilla de ADN se resuspendió en 10 µl de agua y se electroporaron 5 µl del producto de ligación. La electroporación se realizó como se describió arriba.

## **"SCREENING" EN COLONIA POR RADIOACTIVIDAD**

Para encontrar las colonias que contienen el inserto, se hizo una sonda con radioactividad. Se puso de una sola intención la membrana Hybond N+ sobre las colonias crecidas en una caja petri por un minuto, de manera que una vez puesta no se moviera nada. Se marcó la membrana con tinta china para conocer la orientación. La membrana se colocó boca arriba en una solución de NaOH 0.4 M durante 20 minutos. Se lavó con una solución 2X de SSC por un minuto y se puso a secar sobre papel 3M (boca abajo, para que los restos celulares se pegaran al papel). Se puso a pre-hibridar la membrana en una solución SDS 7 %, buffer de fosfatos pH 8.4 y EDTA 1 mM en un horno a 60°C.

Se agregó la sonda previamente desnaturalizada por 5 min a 95°C. Y se hibridó durante la noche. Se lava con una solución de 0.1 % de SDS y 0.4X de SSC 2 veces a 60°C durante 10 minutos .

Finalmente se puso a exponer en película fotosensible (Kodak BioMax MS Film MS-1), y se reveló.

## **INDUCCIÓN DE SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. coli* CEPA BL21**

Se inoculó 1 colonia de las células con la construcción en 3 ml de LB con antibiótico para selección (ampicilina, kanamicina o rifamicina) y se dejó toda la noche creciendo a 37°C en agitación. Después de tomar 1 ml de las células en crecimiento exponencial, se inoculó en 100 ml de LB con antibiótico y se dejó creciendo 2 horas o hasta que la absorbancia  $\lambda=600$  nm llegara a entre 0.5 a 1.0. De este cultivo se tomó 1 ml como control sin inducir para análisis de proteínas por Western Blot; al resto se le agregó IPTG 0.6 mM y se incubó en agitación a 24°C (para mantener la actividad de la enzima) durante 5 horas. Se tomó otro ml para el análisis por Western blot (inducido) y el resto se centrifugó durante 15 minutos a 5,600 g. La pastilla de células se resuspendió en 4 ml de buffer de caspasas.

## **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA**

La cuantificación de proteína de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976) utilizando una curva estándar de albúmina bovina.

Al homogenado celular obtenido después de sonicar las células se le agregó el colorante. La lectura en el espectrofotómetro fue a  $\lambda = 595$  nm. Los resultados se expresaron en miligramos de proteína por mililitro de cultivo homogenizado (proteína mg/ml).

## ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Las células de cultivo sin inducir e inducidas (1ml) se centrifugaron por 1 min a 10,000 g en una microcentrífuga, se quitó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ l de PBS. Se agregó buffer de carga (0.313 M Tris-HCl, pH 6.8; 10 % SDS; 0.05 % azul de bromofenol; 50 % glicerol; 0.5 M DTT) 5X y se puso a calentar por 5 minutos a 65°C. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína total en un gel de poliacrilamida al 15 % y se separaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Después el gel se fijó con una solución para fijación (50 % metanol; 10 % ácido acético) durante 30 minutos, se tiñó con una solución de azul de Coomassie al 0.025 % (en ácido acético al 10 %) durante 1 hora y finalmente se destiñó con agua y ácido acético al 10 % hasta que se observaran bien las bandas.

## ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las células de cultivo sin inducir e inducidas (1 ml) se centrifugaron por 1 min a 10,000 g en una microcentrífuga, se quitó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ l de PBS. Se agregó buffer de carga 1X y se puso a calentar por 5 minutos a 65°C. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína total en un gel de poliacrilamida al 15 % y se separaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PDVF en una cámara de transferencia semi-seca por 60 minutos a 50 mA (según las instrucciones del proveedor). Después de la transferencia la membrana se dejó secar y se bloqueó en leche al 5 % (en PBS con 0.1 % de Tween) toda la noche. Se hizo un lavado de 15 minutos con buffer de lavado (PBS 1X; Tween 0.1 %) y se incubó la membrana con el anticuerpo primario (anti-caspasa 3 activa o anti-histidinas) por una hora. Después se volvió a lavar y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo) por una hora, para luego volver a lavar y finalmente visualizar las bandas por medio del sistema de fosfatasa alcalina. Este sistema se utilizó según las instrucciones del proveedor.

## MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASAS

Para determinar la actividad enzimática específica de las caspasas de las proteínas extraídas se utilizó la técnica descrita por Thornberry (1994) y modificada por Valencia y Morán (2001). Se basa en una técnica fluorométrica utilizando sustratos específicos para cada caspasa de mamíferos.

Después de resuspender la pastilla de células de bacterias en buffer de caspasas [100 mM HEPES; 10 % (p/v) sacarosa; 0.1 % (p/v) CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1mM PMSF; 20  $\mu$ l de cocktail (Roche) /ml buffer], ésta se sonicó dando pulsos de 10 segundos x 6 veces (hasta que la solución de bacterias dejara de estar viscosa), se agregó glicerol diluido 1:1 (v/v) y se guardó a -70°C hasta ser analizado.

Para analizar la actividad enzimática se utilizó un espectrofluorómetro (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY) con una  $\lambda$ = 380 nm para excitación y

$\lambda = 460$  nm para emisión. Se utilizaron diferentes sustratos para medir actividad de las diferentes caspasas: Ac-YVAD-AMC para la caspasa 1; Ac-DEHD-AMC para la caspasa 2; Ac-DEVD-AMC para la caspasa 3; Ac-VEID-AMC para la caspasa 6; Ac-IETD-AMC para la caspasa 8; Ac-LEHD-AMC para la caspasa 9. Las actividades se registraron durante 15 minutos después de la adición del sustrato (100mM, 75 mM y 12.5mM) y el homogenado celular (100  $\mu$ g/ml, 42  $\mu$ g/ml y 30  $\mu$ g/ml) en 2 ml de la solución de buffer de caspasas. Los resultados de la fluorescencia producida por la metil coumarina libre de cada sustrato son expresados como un cambio en la intensidad de fluorescencia / hora /  $\mu$ g de proteína.

## CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

### **CINÉTICAS DE TRATAMIENTOS PARA CULTIVOS EN SUSPENSIÓN**

Las células en suspensión después de 3 días de haber sido subcultivadas, fueron utilizadas para los tratamientos con los inductores de muerte. Una vez añadido el inductor ( $H_2O_2$  20 mM en agua y estaurosporina 2  $\mu$ M en DMSO) se tomaron 7 ml de las muestras para extracción de proteínas y 7 ml para extracción de ARN a diferentes tiempos (dependiendo del estímulo de muerte) en tubos para ser centrifugados a 6,000 rpm durante 30 segundos en una centrífuga clínica. Se decantó el sobrenadante y se congelaron las muestras a  $-70^\circ C$  hasta el momento de ser utilizadas. En cada tiempo también se tomó una muestra de 1 ml para la valoración de muerte celular

### **VALORACIÓN DE MUERTE CELULAR**

En tubos eppendorff se mezclaron 50  $\mu$ l de las células en suspensión bien agitadas con Azul Tripano al 0.04 % (5  $\mu$ l a partir de una solución al 0.4 %) y con 1  $\mu$ l de una solución de Diacetato de Fluoresceína (FDA, 5  $\mu$ M diluido en DMSO). Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro para Fluoresceína ( $\lambda = 460$  nm) para ver las células vivas (células con fluorescencia) y con luz blanca para observar las células muertas (teñidas con azul). Se contaron 3 campos para cada muestra con un mínimo de 300 células por campo, y se calcularon los porcentajes.

### **EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN**

De los 7 ml con los que se inicia la extracción de ARN, al decantar el medio queda aproximadamente entre 1 y 2 ml de células. A estas se les añadieron 5 ml de buffer de

extracción de ARN (descrito anteriormente) cuidando que la muestra no se descongele. Se siguen los mismos pasos que en la extracción de ARN de tejido fresco.

## CONDENSACIÓN DE NÚCLEOS

Las células en suspensión que fueron utilizadas para la valoración de muerte celular fueron fijadas con paraformaldehído al 1 %. Posteriormente fueron teñidas con DAPI 0.01 % y fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia con luz UV ( $\lambda=350$  nm excitación). Se trataron con enzimas para protoplastos para eliminar la pared celular.

## EXPRESIÓN TRANSITORIA

### CONSTRUCCIÓN DE VECTORES

A partir de la construcción HTa-AtMCA1, se digirió con las enzimas BamHI/PstI y se subclonó en el vector pBluescript KS+. De este vector se digirió con HindIII, se formaron extremos romos y después se digirió con la endonucleasa BamHI. Posteriormente se subclonó en el vector de expresión pBIN 19 3x 35S NOS, siendo este vector digerido con BamHI/SmaI (que deja rasurado el ADN), formando la construcción **pBin-AtMCA1**. De igual forma, a partir de la construcción HTa-AtMCA1, se digirió con BamHI/XbaI y se subclonó en el vector pBIN 19 3x 35S NOS, quedando en sentido inverso el gen AtMCA1, lo que nos dio la construcción **pBin-AtMCA1 antisentido**. Finalmente, de la construcción HTb-CPP32 sacamos el fragmento de caspasa 3 con BamHI/KpnI y lo clonamos en pBIN 19 3x 35S NOS, obteniendo **pBin-CPP32**.

Estas construcciones más el vector pBIN 19 3x 35S NOS solo (pBin), fueron transformadas en la bacteria *E. coli* cepa XLBlue. Después de verificar las construcciones por patrones de digestión con endonucleasas, PCR en colonia, extracción de ADN y amplificación por PCR, se extrajo el ADN plasmídico para transformarlo dentro de la bacteria

### FORMACIÓN DE EXTREMOS ROMOS A PARTIR DE EXTREMOS 5' SALIENTES

Se digirió 1  $\mu$ g de ADN en un volumen final de 20  $\mu$ l. Tras comprobar la digestión con HindIII, se añadieron 1  $\mu$ l de solución 2 mM de dNTP's y 5 unidades del fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se calentó 15 minutos a 65°C y se utilizó directamente para las ligaciones.

## **EXTRACCIÓN DE ADN Y TRANSFORMACIÓN EN *Agrobacterium tumefaciens***

Se utilizaron los mismos métodos usados para transformación y extracción de ADN (mini-preps) de las células de *Escherichia coli*, a excepción de los siguientes pasos: las cajas para plaquear las células se prepararon además de la Ampicilina, con Kanamicina 50 µg/ml y Rifamicina 100 µg/ml. Las cajas se pusieron en un cuarto a 25°C y se dejaron crecer durante 2 días para seleccionar las colonias.

### **PCR EN COLONIA DE *A. tumefaciens***

El protocolo utilizado es similar al anteriormente descrito para *E. coli*, pero se utilizan los siguientes ciclos durante la amplificación en el termociclador:

5 minutos a 95°C que sirve para romper las células de *A. tumefaciens* y que salga el ADN.

3 pasos que se repiten de 25 a 35 ciclos:

- 95°C durante 30 segundos
- 1 minuto a la temperatura de apareamiento (TM) más baja de los oligonucleótidos (58°C para AtMCA1, 55°C para AptI y CPP32)
- 72°C a 1 kb por minuto (dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar será la duración de este paso)

Un último paso de 3 minutos a 72°C para que se completen las cadenas

# RESULTADOS

## 1. CLONACIÓN DE METACASPASAS

Existen 9 genes que codifican para metacaspasas en la secuencia de *Arabidopsis thaliana*, y ninguno de ellos se ha clonado y relacionado a la muerte celular. Sin embargo recientemente, durante la elaboración de este estudio, se clonó la primera metacaspasa de plantas, en tomate (Hoebrichts y cols., 2003). El primer objetivo de este trabajo fue la clonación de una metacaspasa relacionada a la muerte celular.

### 1. 1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS

Al no tener una base para discernir la participación particular de alguno de los 9 genes putativos de metacaspasas de *A. thaliana* en la activación de alguna vía de muerte, lo más fácil y rápido fue diseñar un solo par de oligonucleótidos degenerados que amplificaran la región más conservada en estos 9 genes. Se eligió el segmento que abarca del residuo 161 al 222 (como referencia en la secuencia del gen At1g02170) dentro del cual se encuentran la histidina y la cisteína que forman la díada catalítica (figura 6). Éste es un segmento de aproximadamente 60 aminoácidos que a nivel de secuencia de nucleótidos también es muy parecido en sus extremos, donde se encuentran la histidina en el extremo amino y la cisteína en el carboxilo.

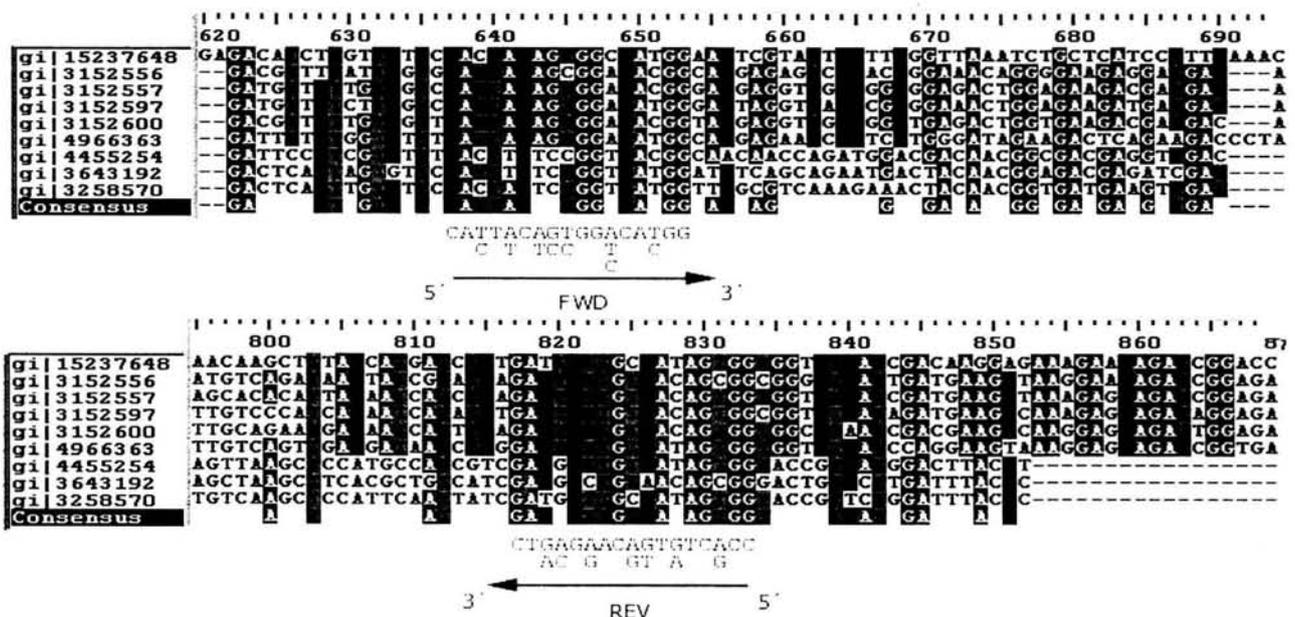


Figura 6. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados Forward (FWD) y Reverse (REV) a partir de la alineación de nucleótidos de las 9 metacaspasas. La secuencia del oligonucleótido reverso es la complementaria para que pueda dirigirse hacia el extremo 5' del gen.

La temperatura de apareamiento (TM) de las secuencias FWD y REV fue de 50°C y 52°C, respectivamente. De acuerdo a búsquedas iterativas en el genoma, con este par de oligonucleótidos sólo se puede amplificar alguna de las nueve metacaspasas de *A. thaliana*. Uno de los problemas, sin embargo, es que los segmentos amplificados tienen un tamaño similar dificultando su separación en geles de agarosa. Para diferenciarlos se empleó un análisis de restricción.

Tipo de metacaspasa	Número de acceso	Gen	Longitud (nt)
II	gi 15237648	At5g04200	180
II	gi 3152556	At1g79310	138
II	gi 3152557	At1g79330	182
II	gi 3152597	Ar1g79320	182
II	gi 3152600	At1g79340	182
II	gi 4966363	At1g16420	186
I	gi 4455254	At4g25110	189
I	gi 3643192	At5g64240	189
I	<b>gi 3258570</b>	<b>At1g02170</b>	189

Tabla 1. Longitud en nucleótidos de los segmentos amplificados por los oligonucleótidos degenerados. Se muestra el tipo de metacaspasa según Uren y colaboradores (2000). En negro se resalta el gen de metacaspasa 570.

## 1. 2. RASTREO DE GENES

Uno de los tipos de muerte celular programada mejor estudiados en plantas y que comparte el mayor número de características con la apoptosis animal es aquella que se produce durante la respuesta hipersensible. Con el fin de aislar una metacaspasa que estuviera involucrada en un proceso de MCP se extrajo ARN de plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. Tomate DC3000 (avrRpm1), que produce una respuesta hipersensible, en la cual proponemos que participan las metacaspasas. El ADNc correspondiente se obtuvo por medio de la técnica de RT-PCR, utilizando transcriptasa-reversa polimerasa de un virus murino (MVRT) que convierte el RNA mensajero en ADN complementario (ADNc).

Usamos el ADNc como templado y los oligonucleótidos degenerados como iniciadores en una reacción de PCR donde se amplificaron una serie no conocida de segmentos de ADN. Estos fragmentos de ADN se insertaron dentro de un vector diseñado para clonar productos de PCR llamado PCR II-TOPO.

Para poder analizar las diferentes clonas de bacterias, éstas se sembraron en una caja de Petri con medio selectivo para que sólo se dividieran aquellas bacterias que tienen el vector PCR II-TOPO conteniendo resistencia a ampicilina, formando clonas o colonias de bacterias idénticas. Además, este vector PCR II-TOPO contiene un marcador de selección de lac-Z: un fragmento del gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa en el que se encuentra un sitio múltiple de clonación (SMC), por lo que al clonar ADN en este sitio, las células no expresarán la proteína  $\beta$ -galactosidasa y no podrán hidrolizar el sustrato x-gal. Este método de selección permite distinguir colonias blancas y azules. Además, cada

colonia o clona es analizada por un PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos degenerados para identificar cuáles de ellas contienen los vectores con los fragmentos esperados. Después de esto, se realizó una digestión con una enzima de restricción que permitió diferenciar patrones de digestión de los fragmentos amplificados por PCR. La enzima utilizada fue DdeI, ya que el patrón producido por esta endonucleasa permite distinguir entre los genes de metacaspasas tipo I y II, dado el número de sitios de corte que posee cada uno y por los tamaños de los fragmentos que se producen.

De todas las clonas analizadas se seleccionaron dos de ellas, la 13 y la 19, que poseían un patrón notoriamente diferente (datos no mostrados), y de éstas se extrajo ADN de los plásmidos para secuenciarse. Finalmente se comparó esta secuencia con la secuencia de nucleótidos conocida de todas las metacaspasas y se obtuvo como resultado que teníamos dos genes de metacaspasas diferentes:

gi|4455254 At4g25110 (254)  
gi|3258570 At1g02170 (570)

Nombramos al gen 570 como AtMCA1, por *Arabidopsis thaliana* **MetaCaspasa**. Es importante mencionar que esta es la primera metacaspasa de *A. thaliana* clonada.

### 1. 3. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

El siguiente paso fue el aislamiento de un ADNc completo. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los dos diferentes genes (254 y AtMCA1). Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar la región codificadora. Pero el diseño debía además hacer una clara distinción entre cada gen, de manera que solamente se amplificara la secuencia del gen deseado y ninguna otra secuencia, incluyendo cualesquiera de las secuencias del resto de las metacaspasas de *A. thaliana*.

Dentro del diseño de los oligonucleótidos se toma en cuenta la temperatura de apareamiento o TM, de manera que ésta sea lo más parecida entre los oligonucleótidos 3' y 5' y en un valor cercano a 60°C o un poco mayor.

Así, tomando en cuenta las consideraciones anteriores las secuencias utilizadas para sintetizar los oligonucleótidos específicos fueron las siguientes:

	<b>254</b>	TM
5'	ATGTTGTTGCTGGTGGACTGC	63.3°C
3'	TTAGATAAAAATAATTAGTATAGATGAA	63.2°C
	<b>AtMCA1</b>	TM
5'	ATGTACCCGCCACCTCCCTC	62.4°C
3'	CTAGAGAGTGAAAGGCTTTGCAT	63.6°C

## 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ATMCA1

Para caracterizar la función de estos genes se utilizaron modelos fisiológicos en donde se conoce que la planta sufre un proceso de muerte celular programada, provocada por la infección con bacterias, hongos, la herida mecánica y el tratamiento con ácido salicílico, hormona involucrada en el proceso de muerte celular en plantas (Hoeberichts y Woltering, 2002). Lo primero que se hizo fue observar si existe la acumulación del mensajero de estos genes durante los tratamientos anteriores.

Sólo uno de estos dos genes el 570, se amplificó en el tratamiento de infección de plantas con la bacteria avirulenta *P. syringae*. El otro gen (254) no pudo ser amplificado muy probablemente por una falla técnica.

### 2. 1. INFECCIÓN CON BACTERIAS

Para conocer los niveles de acumulación mensajero de este gen se utilizó el ARN extraído de un tratamiento de infección con *P. syringae* en *A. thaliana* y se obtuvo el ADNc por medio de la técnica RT-PCR. El ADNc fue utilizado como base para amplificar el fragmento del gen AtMCA1 utilizando los iniciadores específicos de este gen. Como control para este y el resto de los tratamientos en los cuales se investigó la inducción del gen AtMCA1, se utilizó el gen constitutivo Apt-I para descartar cualquier diferencia en los niveles de transcrito debido a degradación del ARN o alguna falla en la normalización de éste. La enzima Fosforribosil transferasa de Adenina (APT) cataliza la conversión de las bases adenina y citocinina a sus correspondientes nucleótidos

Bajo estas condiciones, observamos un nivel basal de expresión del gen AtMCA1. Cuando se realizó la infección, encontramos que a 4 h se observa el mayor nivel de ARNm. Esto indica que existe una inducción del gen AtMCA1 durante la infección por *Pseudomonas syringae* a tiempos entre 2 y 4 horas después de infectar las hojas de *Arabidopsis* con las bacterias.



Figura 7. Acumulación del ARNm de la metacaspasa AtMCA1 en hojas de *A. thaliana* infectadas con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* a 15 minutos, 30 minutos, 1, 2 y 4 horas después de la infección. El gen Apt I se utilizó como control.

### 2. 2. INFECCIÓN CON HONGOS

Otro de los organismos patógenos de plantas que sirven como inductores de la muerte celular debido a la Reacción Hipersensible es el hongo *Alternaria brassicicola*. Este hongo

produce normalmente manchas amarillas en las hojas alrededor de las 72 horas. La acción lenta de la infección se debe a que el hongo requiere de la eclosión de las esporas y de la germinación de las hifas, para producir después la respuesta de la planta.

El curso temporal de infección con este hongo patógeno se siguió durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de infectar las hojas. Como control se utilizó el tiempo 0 (inicial) sin el hongo.

Bajo estas condiciones observamos que la metacaspasa AtMCA1 casi no se expresa sin estímulo inductor, sin embargo se logra observar una transcripción basal mínima. La inducción aumenta notablemente a las 12 horas después de la infección, y se mantiene a lo largo de la respuesta hasta las 96 horas. Esto indica que al igual que en la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae*, la respuesta de la planta a este hongo produce una inducción del gen AtMCA1.

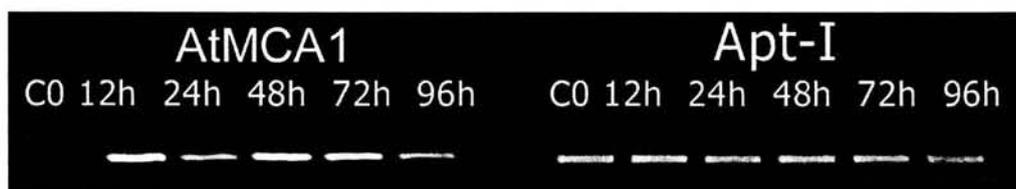


Figura 8. Acumulación del mensajero de AtMCA1 en hojas de *A. thaliana* a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de una infección con el hongo *Alternaria brassicicola*.

### 2. 3. HERIDA MECÁNICA

Otro de los estímulos de estrés y defensa en la planta es la respuesta frente a una herida mecánica en las hojas. La herida desencadena la respuesta de defensa previniendo la posible entrada de patógenos por la zona herida. Bajo estas condiciones, es evidente el nivel basal de ARNm, así como una clara inducción del gen AtMCA1 respecto al control en las plantas heridas. Otra vez, al igual que en los tratamientos anteriores, se observa un nivel basal en el ARN mensajero del gen de la metacaspasa, y la inducción producida por la herida en las hojas se distingue claramente 4 horas después de la lesión. Al igual que en la infección por *Pseudomonas* la acumulación del mensajero ocurre a las 4 h.



Figura 9. Acumulación del mensajero de la metacaspasa AtMCA1 en hojas de *A. thaliana* a 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas después de la lesión.

### 2. 4. ÁCIDO SALICÍLICO (SA)

El ácido salicílico es una molécula de señalización utilizada por la planta durante algunos de los procesos involucrados en la muerte celular programada, incluida la reacción

hipersensible. Se sabe por estudios previos (Hoeberichts y Woltering, 2002) que el tratamiento de hojas de *A. thaliana* con ácido salicílico lleva a la inducción de algunas de las vías que producen la reacción hipersensible.

Como en todos los casos, los niveles basales del ARN mensajero del gen AtMCA1 son visibles, lo que confirma que en todas las plantas saludables normalmente se transcribe continuamente el gen a niveles bajos, pero perceptibles. En el caso del tratamiento con ácido salicílico, los niveles más altos del mensajero se detectaron a 2 horas después del tratamiento, disminuyendo posteriormente hasta regresar a los niveles basales a las 24 horas. En este caso el aumento en la acumulación del mensajero de AtMCA1 ocurre desde los 30 minutos, esto es, antes que con la herida y la infección por patógenos.

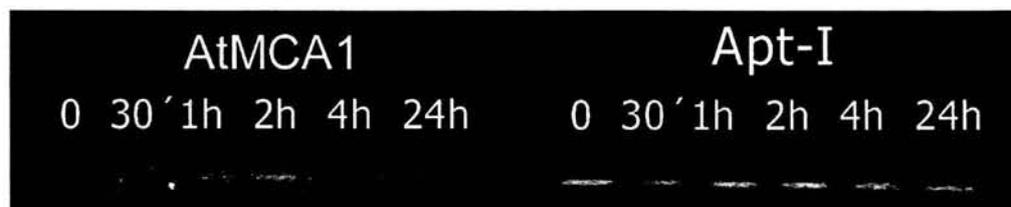


Figura 10. Expresión del ARNm de AtMCA1 en hojas de *A. thaliana* a 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas después de la inducción con ácido salicílico.

### 3. ACTIVIDAD TIPO-CASPASAS DE AtMCA1

La principal característica de las caspasas es su función proteolítica, la cual es específica para ciertas proteínas. Esta actividad proteolítica específica puede ser detectada y cuantificada mediante la degradación de un péptido sintético de 4 aminoácidos acoplados a una molécula fluorescente. La secuencia del tetrapéptido es específica para cada miembro de la familia de las caspasas y normalmente no será reconocida por ninguna otra caspasa. Haciendo uso de estos sustratos, en este estudio se detectó la actividad de caspasa de la metacaspasa AtMCA1 bajo distintas condiciones experimentales.

#### 3. 1. CLONACIÓN DE LOS GENES EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN EN *E. coli*

Para poder medir la actividad de esta proteína de manera aislada se obtuvieron grandes cantidades de esta proteína mediante un sistema de sobre expresión en bacteria que permitiera producir y recuperar fácilmente la proteína citosólica dentro de un extracto crudo y así poder detectar la actividad en un espectrofluorómetro mediante el uso de sustratos fluorogénicos específicos para caspasas.

Para hacer la clonación del gen AtMCA1 se utilizó el vector de expresión pProEX. Una de las ventajas que posee este vector es que, además de tener un promotor inducible y con una producción de proteína alta, contiene dentro de la secuencia su propio codón para metionina (o inicio) en la región 5' del Sitio Múltiple de Clonación (SMC) y su propio

codón de término en la región 3' de este sitio. En la región intermedia entre la metionina del vector y la metionina propia del gen clonado existe un conjunto de codones que codifican para 6 histidinas, por lo que la proteína que se exprese contendrá una región amino terminal un poco más grande que no afectará mucho en su actividad, pero que contendrá varias histidinas que pueden ser reconocidas por un anticuerpo específico anti-Histidinas. Dado que existe un codón de término en la región 3' de la secuencia, no importará si al momento de clonar el gen con enzimas de restricción éste pierde ya sea alguna porción del final de la secuencia o incluso el último nucleótido del triplete que codifica para el término. Este fue el caso de la metacaspasa AtMCA1.

El sistema para la inducción de expresión de la proteína requiere que las bacterias se encuentren en una fase de crecimiento exponencial. Entonces se utiliza el promotor de lac-Z del plásmido, para inducir la expresión de manera constante durante un período de 5 horas, después del cual se pueden recuperar las proteínas citosólicas. Para obtener el componente citosólico de las proteínas, las bacterias se sonicaron para destruirlas lo más posible y que liberen la mayor cantidad de proteínas, tratando de dañarlas lo menos que se pudiera con la intención de no alterar su actividad.

Antes de hacer cualquier análisis es conveniente verificar que existe una sobreexpresión de la proteína que se desea mediante un corrimiento de las proteínas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Se corrieron 8 muestras diferentes correspondientes a 4 cepas de bacterias con sus 2 respectivos tratamientos: sin inducir e inducido. Las cepas fueron:

- Vector pProEX HTa y vector pProEX HTb como controles negativos
- Vector pProEX HTa con el gen AtMCA1
- Vector pProEX HTb con el gen CPP32 (caspasa 3 humana)

En el caso de los controles negativos, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos sin inducir e inducido. Para el caso del gen de la metacaspasa AtMCA1 se observó una banda más intensa (correspondiente a mucha proteína) en el tratamiento inducido contra el no inducido y que correspondió al tamaño esperado de 45 kDa, lo que indica una clara sobreexpresión de dicha proteína. Para el caso de la caspasa humana, la CPP32, la banda que se observó correspondía al tamaño esperado de 36 kDa, aunque ligeramente, también fue más evidente en el tratamiento inducido que en aquel no inducido; sin embargo, la inducción en este caso fue mucho menor a la del gen de la metacaspasa AtMCA1 (datos no mostrados). Pero a pesar de estas diferencias en la expresión se procedió a analizar la actividad proteolítica propia de las caspasas.

### 3. 2. ACTIVIDAD TIPO-CASPASAS

Para medir la actividad de la metacaspasa AtMCA1 se utilizaron los sustratos de las caspasas 1, 2, 3, 6, 8 y 9, así como el inhibidor general de las caspasas (z-VAD-fmk) el cual se añadió a algunas de las reacciones para verificar que la actividad proteolítica registrada es propia de las caspasas y no de otro tipo de proteasas. Como control positivo, para verificar que el sistema utilizado funciona bien, se utilizó el gen de la caspasa 3 humana (CPP32) sobreexpresada de la misma manera que la metacaspasa AtMCA1.

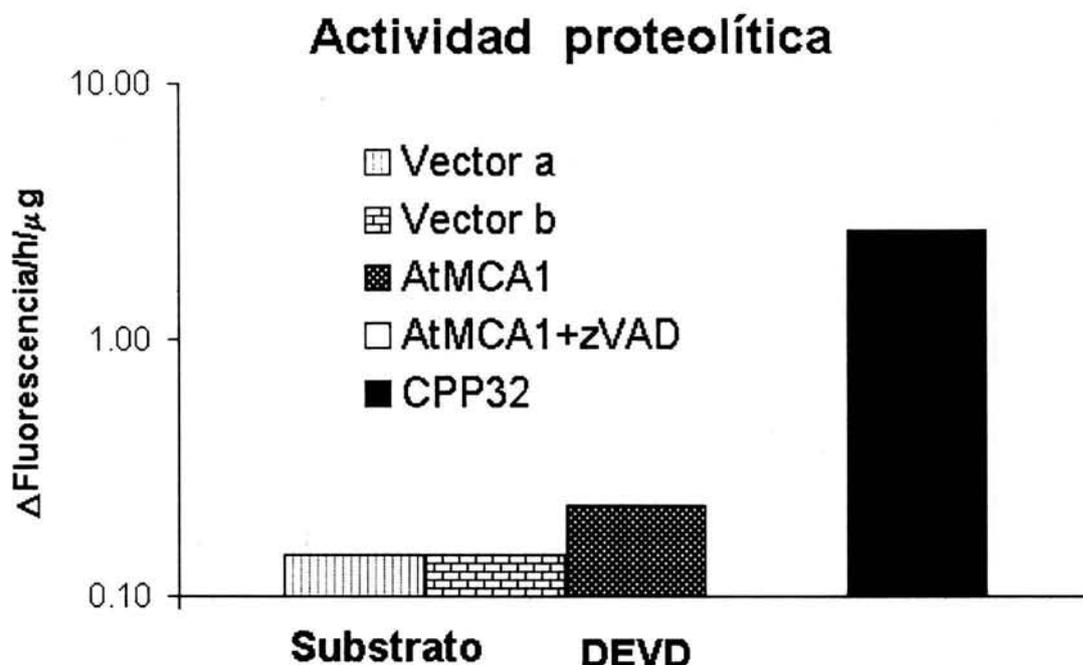


Figura 11. Actividad tipo-caspasas de los homogenados de células sobreexpresoras de *E. coli* con los vectores pProEX HTa (Hta) y pProEX HTb (Htb) así como con los vectores más los genes AtMCA1 (AtMCA1) y caspasa 3 humana (CPP32). Se utilizó el sustrato de la caspasa 3 y el inhibidor general de las caspasas (z-VAD-fmk) en conjunto con el sustrato de la caspasa 3. La escala es unidades relativas de fluorescencia por hora por  $\mu\text{g}$  de proteína.

La actividad se mide en unidades relativas y se extrapola a una hora, por lo que el resultado se expresará como un cambio en la fluorescencia ( $\Delta F$ ) por  $\mu\text{g}$  de proteína por hora ( $\Delta F/\mu\text{g}/\text{h}$ ).

Como resultados obtuvimos una gran actividad específica del tipo de caspasa 3 tanto del control positivo (la caspasa 3 humana) como de la metacaspasa AtMCA1; sin embargo la actividad registrada para la última fue de un orden de magnitud menor que el control positivo.

Estos resultados indican que el sistema funcionó adecuadamente. Por un lado, la caspasa 3 humana, sobreexpresada mediante el sistema en *E. coli*, registró una actividad muy grande. Por otra parte, la actividad proteolítica de la metacaspasa AtMCA1 sólo funcionó con el sustrato de la caspasa 3 (Ac-DEVD-AMC) y no con el resto de los sustratos (datos no mostrados) y en una proporción mucho menor que la caspasa 3 humana recombinante. Sin embargo parece que esta actividad sí es específica, ya que al utilizar el inhibidor general de las caspasas (z-VAD-fmk) se logró inhibir esta actividad proteolítica.

No obstante, también observamos actividad proteolítica en los extractos de *E. coli* sin proteína sobreexpresada. La actividad es menor que con la metacaspasa AtMCA1, pero es detectable aún con el coctel de inhibidores generales de proteasas que se encuentran en el buffer de caspasas (figura 11).

### 3. 3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para verificar que la actividad de caspasa registrada con la caspasa 3 humana se debe a que dicha proteína está siendo activada y por lo tanto cortada en sus subunidades, se corrieron las proteínas en un gel de poliacrilamida y se detectaron por la técnica de Western blot con anticuerpos específicos para caspasa 3.

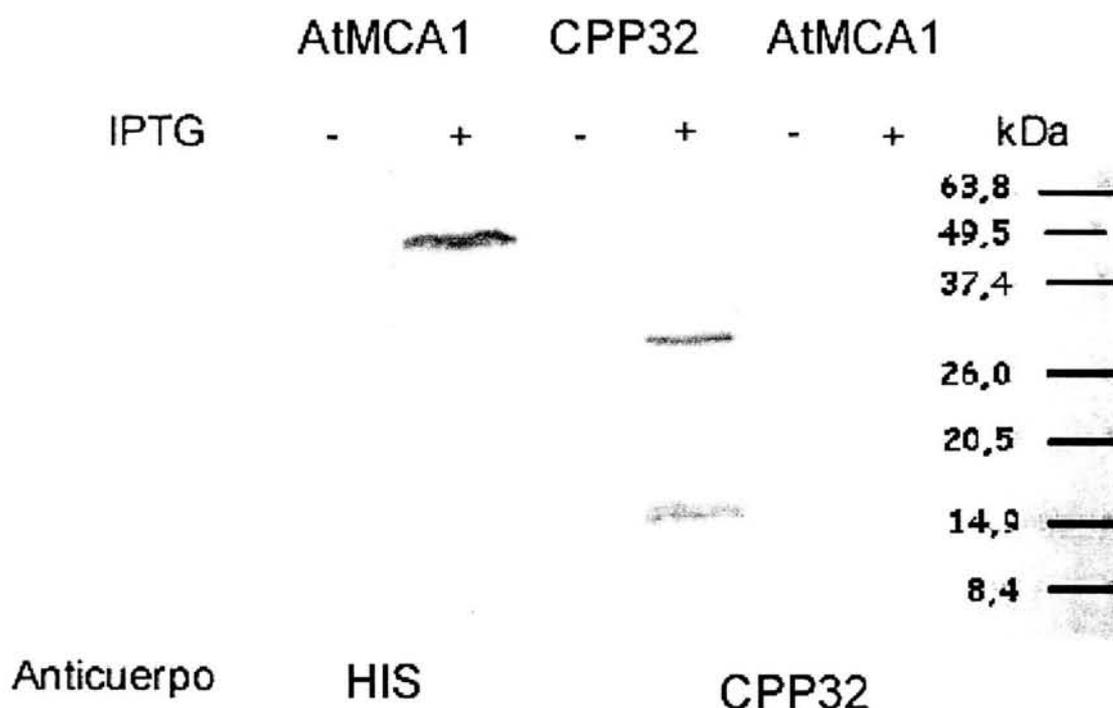


Figura 12. Western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa 3 y anti-Histidinas. Homogenados de células de *E. coli* con las construcciones de los genes de metacaspasa AtMCA1 (AtMCA1) y de caspasa 3 humana (CPP32) en tratamientos con y sin inducción de sobreexpresión de proteínas. El peso de la caspasa 3 es de 32 kDa como proenzima; de 17 kDa para la subunidad p20; de 12 kDa para la subunidad p10 y de 29 kDa las dos subunidades juntas (p10 y p20) sin el prodominio. La metacaspasa AtMCA1 pesa 45 kDa.

Como se ve en la Figura 12, la caspasa 3 humana recombinante está siendo activada, ya que se detectaron las subunidades liberadas. Observamos la subunidad p20 sola, lo que indica que se proteolizaron los dos sitios de corte; también observamos la subunidad p20 con el prodominio (29 kDa) y la subunidad p20 con la subunidad p10. Estos dos últimos péptidos, junto con la proenzima de 32 kDa que también fue detectada, indica que no toda la caspasa 3 fue cortada y activada, puesto que vemos estos cortes parciales.

Hay que resaltar que el anticuerpo detecta un epítipo de la subunidad p20, por lo que solo observamos péptidos que lo contuvieran y no pudimos ver la subunidad p10 sola.

Lo mismo se hizo en el caso de la metacaspasa AtMCA1, pero el anticuerpo anti-caspasa 3 no cruzó con esta proteína, por lo que recurrimos al anticuerpo anti-Histidinas que se usa en las proteínas sobreexpresadas con los vectores pProEX.

El anticuerpo anti-Histidinas reconoce una pequeña cadena de Histidinas que se localiza en la región amino-terminal de las proteínas expresadas en los vectores pProEX. La figura 12 muestra que la región amino-terminal, donde se localiza el prodominio y las histidinas en la caspasa 3 humana (CPP32), no está siendo reconocida por el anticuerpo debido a que ya ha sido cortado este pedazo del péptido y probablemente sea tan pequeño que se ha degradado o simplemente no aparece en el gel. Esto apoya la idea de que la caspasa 3 se autoactiva gracias a la alta concentración de proenzima existente.

En el caso de la proteína AtMCA1 se observa la sobreexpresión dentro de la bacteria, sin embargo no se detectó el rompimiento de la proteína, pues la única banda observada es la correspondiente a la proenzima.

#### **4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE AtMCA1 EN PRESENCIA DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Y ESTAUROSPORINA EN CULTIVO EN SUSPENSIÓN**

Dado que la hipótesis que se plantea es la participación de la metacaspasa en la muerte celular programada, la mejor manera de probarlo es observando la relación entre la muerte celular en algún tratamiento o tipo de estrés y el comportamiento de la metacaspasa. El método más rápido y ya establecido es el uso de un cultivo de células en suspensión de *A. thaliana*.

Para esto se utilizó un sistema de células en suspensión que permite obtener los resultados utilizando cantidades más pequeñas de reactivos necesarios para la inducción de respuestas o para la medición de las mismas, si se compara con las requeridas en una planta completa. Además no se requiere esperar a que la planta crezca a una determinada edad, sino que se utilizan las células inmediatamente después de sembradas, y éstas se mantienen dividiéndose constantemente por lo que se obtienen células continuamente a partir de un solo cultivo. Las mediciones de viabilidad celular pueden ser cuantitativas al poder ser contadas las células en el microscopio y de una manera muy sencilla.

Para analizar el comportamiento de los cultivos en suspensión, así como la expresión del gen de la metacaspasa AtMCA1 durante la muerte celular programada, se utilizaron 2 tratamientos, el peróxido de hidrógeno y la estaurosporina, que se sabe producen un tipo de muerte celular programada muy parecida a la apoptosis animal, puesto que presenta varias características comunes con este tipo de muerte.

## 4. 1. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Después de una infección por patógenos que produzcan la reacción hipersensible, es característica una fuerte reacción oxidativa que llega a producir entre otras especies reactivas, el peróxido de hidrógeno. Varios autores han descrito la muerte celular inducida por  $H_2O_2$  (Levine y cols., 1994; Desikan y cols., 1998; Houot y cols., 2001; Pellinen y cols., 2002). Se ha visto en *Arabidopsis thaliana* que una concentración de entre 5 y 50 mM de  $H_2O_2$  produce muerte celular programada en cultivos en suspensión. En este estudio utilizamos una concentración intermedia de 20 mM y se midió la viabilidad celular durante 24 horas por medio de una tinción doble: con azul tripano que tiñe células con daño en la membrana y por lo tanto muertas; y con diacetato de fluoresceína (FDA) que fluoresce en las células vivas, puesto que entra a la célula y las esterasas de la célula rompen los acetatos permitiendo que la fluoresceína fluoresca.

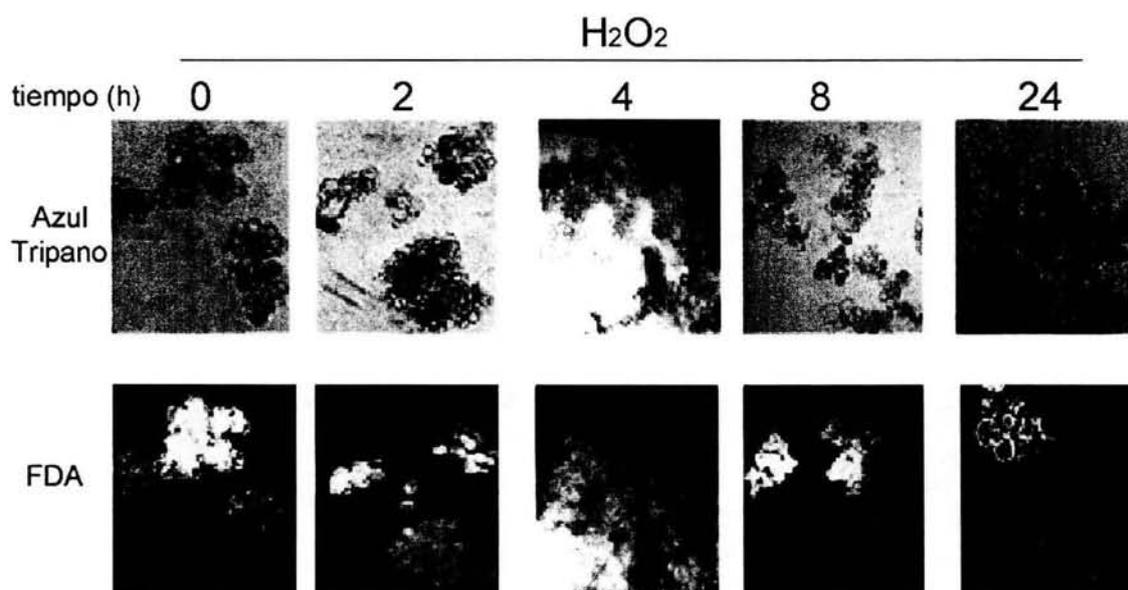
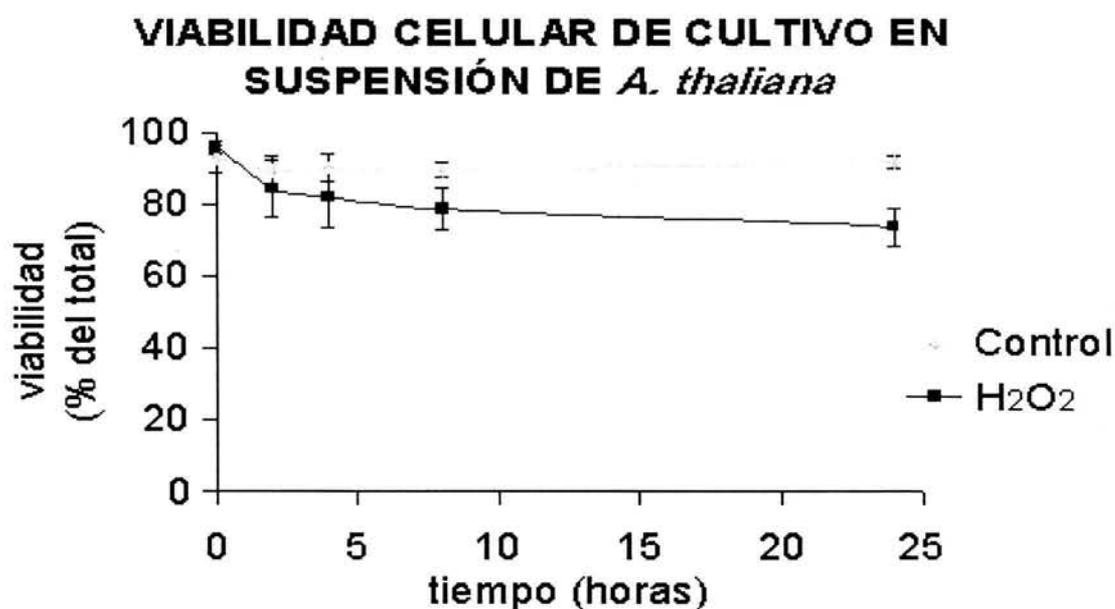


Figura 13. Tinción doble con Diacetato de Fluoresceína (FDA) y azul tripano de células en suspensión de *A. thaliana* tratadas con Peróxido de Hidrógeno 20 mM, a los tiempos indicados. Las fotos en cada tiempo representan el mismo campo.

En la figura 13 se puede apreciar que la tinción doble con diacetato de fluoresceína y con azul tripano permite distinguir las células vivas de las muertas, puesto que cada tinción es mutuamente excluyente, y las células sólo se tiñen con alguno de los dos. Como se puede apreciar en la Figura 14 **a**, donde se grafican los resultados de viabilidad, el peróxido de hidrógeno produce muerte de las células al menos ya a partir de las primeras 4 horas; este efecto es atenuado debido a que el  $H_2O_2$  es rápidamente metabolizado por el cultivo y se ha demostrado que concentraciones tan altas como 10 mM pueden ser destruidas en un periodo de 10 minutos. La adición de peróxido de hidrógeno al cultivo, posterior al primer tratamiento, no alteró el comportamiento durante la respuesta, debido probablemente a que la célula inicia el proceso de muerte programada desde el primer tratamiento (Levine y cols., 1994).

a)



b)

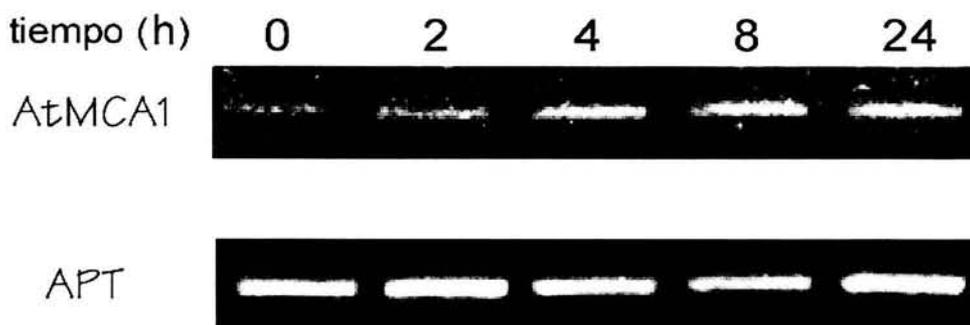


Figura 14. **a)** Viabilidad de células en suspensión de *A. thaliana* tratadas con agua (Control) y con peróxido de hidrógeno 20 mM. Las células fueron teñidas con azul tripano 0.1 % y FDA 5  $\mu$ M. La viabilidad es el porcentaje de células vivas del total de células en el cultivo. Las barras indican  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. **b)** Acumulación de ARNm del gen AtMCA1 por RT-PCR en las mismas células de *A. thaliana* a 0, 2, 4, 8 y 24 horas después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. Se utilizó el gen Apt I como control para la integridad del ARNm.

Una vez que se cuantificó la muerte celular producida por este tratamiento, se evaluó la expresión de ARNm del gen AtMCA1 por medio de la técnica de RT-PCR, para poder así relacionarlo directamente con la muerte. En la Figura 14 **b** se observa la inducción del mensajero de esta metacaspasa producida por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cultivo, y se puede apreciar el cambio en los niveles del mensajero casi de manera directa con la muerte de las células en el cultivo; es decir, la expresión de AtMCA1 aumenta ligeramente sus niveles

basales a partir de las primeras 4 horas, y continúa aumentándolos en la misma proporción conforme disminuye la viabilidad celular.

## 4. 2. ESTAUROSPORINA

La estaurosporina es un potente inhibidor de proteína cinasa C, y es un inductor de apoptosis muy utilizado en sistemas animales (Caballero-Benítez y Morán, 2002). En sistemas vegetales también ha sido comprobada su eficiencia en producir la muerte celular programada (Hoeberichts y Woltering, 2002). Se ha observado que la fosforilación de proteínas es imprescindible para el correcto funcionamiento de la célula, por lo que la inhibición de cinasas es detectada por la célula como un daño importante que inicia el programa de suicidio celular.

En plantas, muerte celular programada inducida por estaurosporina (2 y 50  $\mu\text{M}$ ) se ha estudiado células en suspensión de tomate y tabaco (De Jong y colaboradores, 2000). En nuestro estudio utilizamos una concentración de 2  $\mu\text{M}$  debido a que esta concentración es suficiente para producir una proporción importante de muerte celular al cultivo.

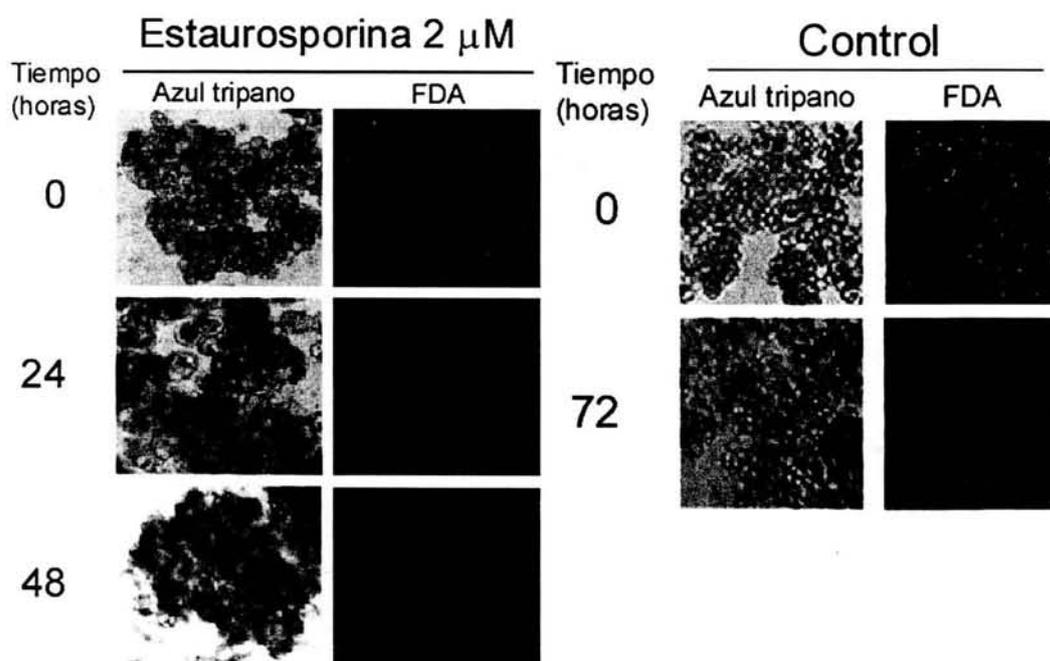
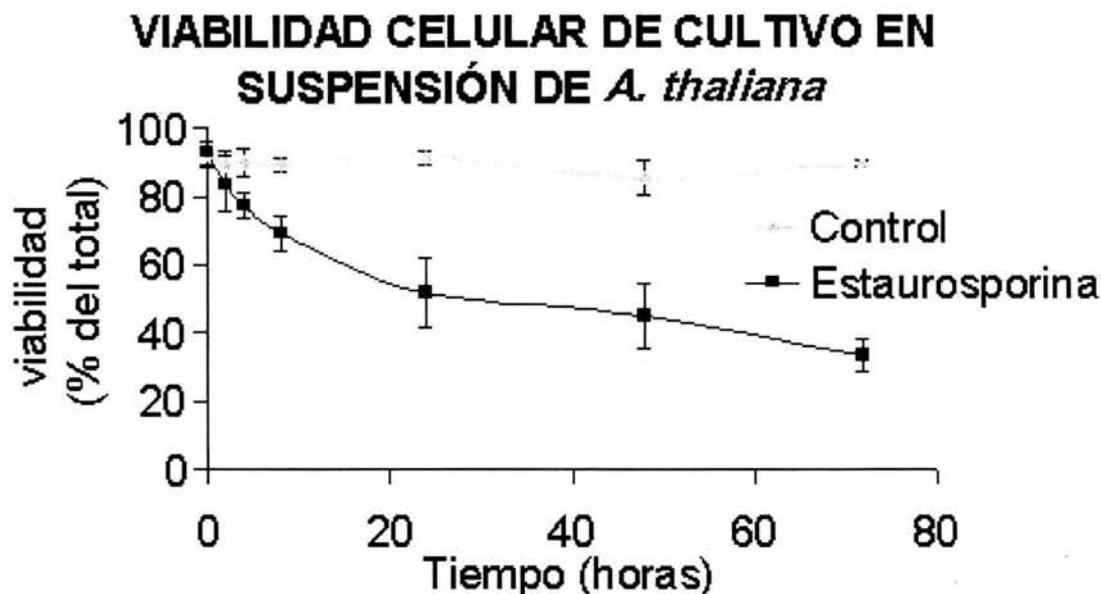


Figura 15. Tinción doble con Diacetato de Fluoresceína (FDA) y azul tripano de células en suspensión de *A. thaliana* tratadas con Estaurosporina 2  $\mu\text{M}$  o DMSO (control), a los tiempos indicados. Las fotos en cada tiempo representan el mismo campo para cada tratamiento (estaurosporina y DMSO).

En la figura 15 se observa que el efecto de la estaurosporina sobre el cultivo de células vegetales es dramático, de forma que a las 24 horas se observa una gran cantidad de células teñidas con azul tripano, y son pocas las que fluorescen con el FDA. No así, el cultivo de células tratadas con el vehículo, DMSO. En la figura 16 *a* vemos que la muerte

celular que se produce por acción de la estaurosporina se observa desde las 4 horas, aumentando considerablemente a hasta las 24 horas después del tratamiento, donde la viabilidad celular es aproximadamente de 50 %, y alcanzando un 35 % a las 72 horas.

a)



b)



Figura 16. **a)** Viabilidad de células en suspensión de *A. thaliana* tratadas con DMSO (Control) y con estaurosporina 2  $\mu$ M. Las células fueron teñidas con azul tripano 0.1 % y FDA 5  $\mu$ M. La viabilidad es el porcentaje de células vivas del total de células en el cultivo. Las barras indican  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. **b)** Acumulación de ARNm de AtMCA1 por RT-PCR en células en suspensión de *A. thaliana* a 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas después de la adición de estaurosporina 2  $\mu$ M.

El caso de la expresión del ARNm de AtMCA1 es muy similar a lo que ocurre con el cultivo tratado con peróxido de hidrógeno: existe una correlación en el aumento de los niveles del mensajero que se observan por medio del RT-PCR, con la disminución de viabilidad del cultivo en suspensión. Advertimos dos cambios marcados durante la respuesta al tratamiento: un primer aumento a las 2 horas después de la inducción, donde la disminución en el porcentaje de células vivas no es tan evidente comparado con el

control; y un segundo aumento a las 24 horas después del tratamiento, cuando el cambio en la viabilidad celular es más drástico. Sin embargo, después de las 2 horas, y hasta las 8 horas posteriores a la inducción, los niveles de mensajero se mantienen constantes (Figura 16 **b**).

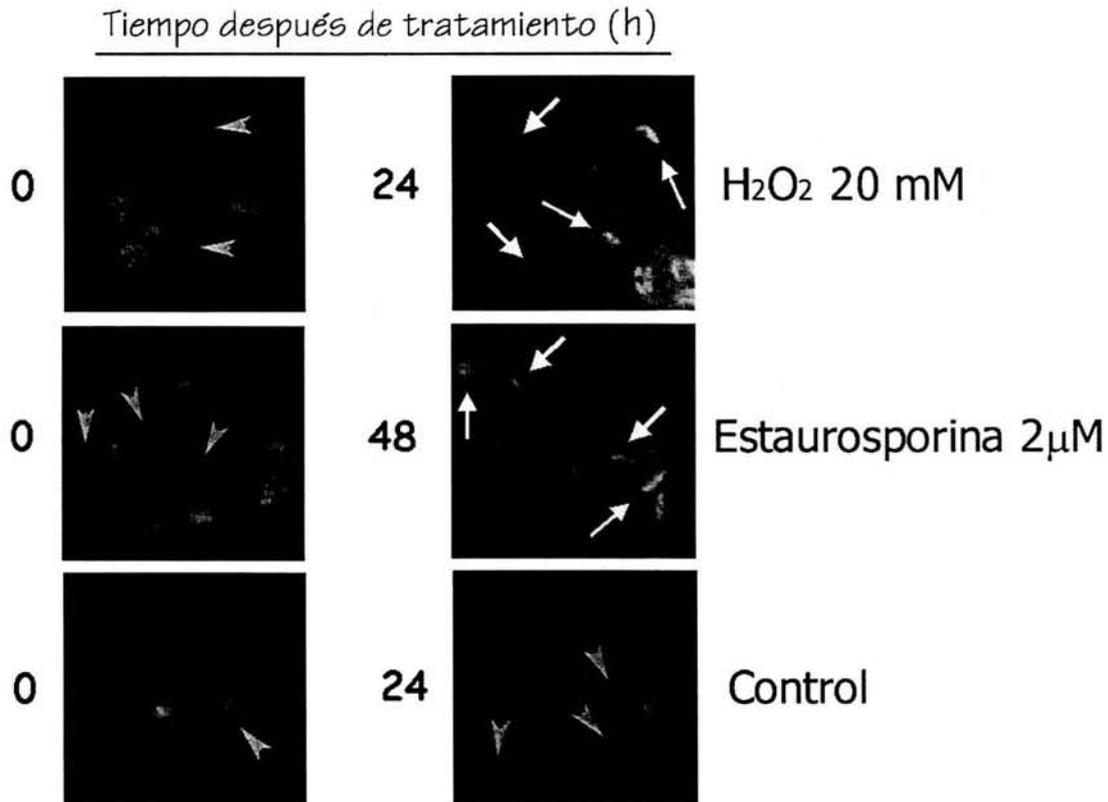


Figura 17. Células de *A. thaliana* de un cultivo en suspensión tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM, estaurosporina 2  $\mu\text{M}$  o con DMSO (control). Las células están teñidas con DAPI al tiempo indicado y se observan en un microscopio de fluorescencia con un filtro para UV. Las cabezas de flecha verdes indican núcleos normales y las flechas amarillas indican núcleos condensados.

Debido a que la tinción empleada para observar células muertas sólo sirve para detectar daño en la integridad membranal y por lo tanto, una muerte de tipo necrótica, recurrimos a otro tipo de tinción para poder afirmar que los efectos que estamos observando son propios de la muerte celular programada, y no de la muerte de tipo necrótica.

Una de las principales características morfológicas de las células apoptóticas es la condensación nuclear, la cual puede ser observada mediante la tinción del material nuclear con algún compuesto que se una al ADN como es el caso del fluoróforo DAPI para teñir los núcleos de las células en suspensión.

Utilizando esta tinción observamos de manera cualitativa que los núcleos de las células muestran una condensación a las 24 horas después del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y a las 48 horas después del tratamiento con estaurosporina. Esto denota que durante los tratamientos anteriores se observa una muerte de tipo apoptótica.

## 5. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE AtMCA1 EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Con los experimentos anteriores con células en cultivo en suspensión, observamos que la metacaspasa AtMCA1 participa en estos procesos de muerte programada. Sin embargo, su papel durante el proceso no puede ser determinado observando solamente su transcripción. Para poder conocer un poco más acerca de su participación, lo que hicimos fue forzar un poco la maquinaria molecular, induciendo un cambio en el equilibrio de las moléculas que de acuerdo a nuestra hipótesis, regulan la muerte.

Esto se realiza mediante el uso de la expresión transitoria, un método que involucra la expresión de cierto gen dentro de las células de la planta (en este caso células en suspensión), a través de la transformación del gen deseado por medio de una infección con la bacteria patógena *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria en su forma silvestre infecta muchas de las plantas dicotiledóneas, transfiriendo una parte de su material genético que induce a las células de la planta a producir unos compuestos que le servirán de alimento a la bacteria. Este ADN bacterial no solo funciona con la maquinaria transcripcional y traduccional de la planta, sino que se integra por completo al genoma de su huésped eucarionte.

Es por esto, que mediante la ingeniería genética se ha logrado modificar el ADN que transfiere la bacteria a la planta, de forma que los genes que inducen la virulencia han sido removidos (formando lo que se conoce como una cepa "desarmada"), y pueden ser insertados cualesquiera otros genes que se deseen que la planta exprese, ya sean endógenos o de otro organismo.

Para la expresión transitoria se utiliza un vector que posea un marcador de selección (para asegurar que la bacteria tenga el vector) y un sitio de clonación que será donde se inserte el gen deseado. Este sitio está flanqueado por un promotor y un terminador que puedan ser controlados por las células de la planta, puesto que al incorporarse al genoma eucarionte, necesita de algo que controle su expresión.

Según nuestros resultados de transcripción del ARNm de la metacaspasa, la célula siempre posee niveles basales del transcrito; también se sabe que los niveles de mensajero y proteína de las caspasas de mamíferos se comportan de manera similar. Por esto, suponemos que también existen niveles basales de proteína de AtMCA1 en las plantas; por lo que para poder apreciar la participación de la metacaspasa AtMCA1 en el proceso de muerte, utilizamos una sobre expresión de la proteína que permitiera observar efectos drásticos durante el proceso. De esta manera, la sobre expresión de la metacaspasa alteraría el equilibrio en los niveles de estas moléculas, produciendo un aumento o una disminución de la respuesta de la planta frente a algún estímulo que indujera la muerte programada.

Por otro lado, al suprimir la expresión del mensajero de AtMCA1 por medio de un antisentido, suponemos que dejaremos a las células menos susceptibles a algún estímulo que induzca la muerte celular programada, debido a que únicamente cuenta con las moléculas de metacaspasa AtMCA1 que tiene inicialmente, sin posibilidad de responder normalmente; esto, en principio, disminuiría la respuesta de muerte por parte de las células.

Adicionalmente, se ha visto que plantas transgénicas que contienen genes humanos anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, expresados en plantas de tabaco tienen un efecto inhibitorio de la respuesta hipersensible (Dickman y colaboradores, 2001). Por esto

quisimos probar también el efecto que tiene la sobreexpresión de la caspasa 3 humana en las células en suspensión de *A. thaliana*, bajo algún estímulo de muerte.

Para la construcción del vector utilizamos un promotor constitutivo que expresa niveles altos en las plantas: el 35S 3x (un promotor derivado de un virus de coliflor). Pero utilizamos una versión modificada de este promotor que expresa niveles aún más altos del gen deseado, puesto que el enhancer está clonado 3 veces antes del promotor: 35S 3x. También se utilizó el terminador NOS, y clonamos el gen AtMCA1 en versión sentido (para la sobreexpresión) y antisentido (para la supresión). Todo esto se hizo dentro del vector pBin, que contiene un marcador de selección para bacterias y otro para plantas, ambos de kanamicina.

De esta manera se realizaron las siguientes construcciones:

- Como control, únicamente el vector: **pBin 35S 3x NOS** (pBin en las gráficas).
- Para la sobreexpresión de AtMCA1, el vector más el gen de metacaspasa en versión sentido: **pBin 35S 3x NOS -AtMCA1** (AtMCA1 en las gráficas).
- Para la supresión, el vector más el gen de AtMCA1 en antisentido: **pBin 35S 3x NOS -AtMCA1 antisentido** (AtMCA1 anti-sentido).
- Para la sobreexpresión del gen de la caspasa 3 humana, el vector más el gen CPP32: **pBin 35S 3x NOS -CPP32** (CPP32).

Recientemente se ha reportado que el co-cultivo de células en suspensión de planta con *Agrobacterium tumefaciens* produce una respuesta de MCP en las células eucariontes (Hansen, 2000). En este caso se utilizaron células de maíz, sin embargo se sabe que parte del problema al tratar de hacer expresiones transitorias en las plantas, e incluso al tratar de hacer plantas transgénicas utilizando esta bacteria, es que esta última induce una respuesta de muerte en las células que infecta.

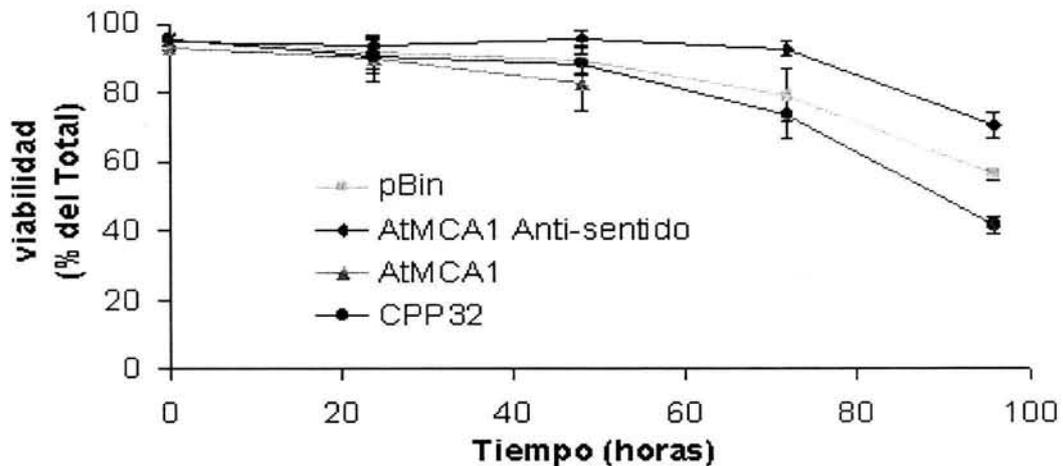
Es por esto que analizamos el comportamiento de nuestra expresión transitoria, en base a la muerte, únicamente con la infección que produce el co-cultivo de las células en suspensión de *A. thaliana* con la cepa de la bacteria *A. tumefaciens* que contiene nuestras construcciones. Es decir, al co-cultivar las células de planta en suspensión con las bacterias tenemos dos fenómenos simultáneamente: por un lado la bacteria infecta a la célula vegetal produciendo una respuesta del tipo de reacción hipersensible en esta última, lo que induce que la célula eucarionte prenda un sistema de muerte programada; por otro lado la bacteria transforma la célula vegetal con nuestras construcciones, produciendo una expresión transitoria de nuestro gen.

Fue así que, utilizando el sistema de tinción doble con FDA y azul tripano, analizamos la viabilidad durante una infección con *Agrobacterium tumefaciens* para determinar la muerte programada que se produce al sobreexpresar la metacaspasa AtMCA1.

Los resultados de la figura 18 nos demuestran lo que inicialmente habíamos planteado: la simple infección de *Agrobacterium tumefaciens* en las células de *A. thaliana* inducen una respuesta de muerte que, se puede evidenciar desde las primeras 24 horas (Figura 18 **b**) después de la infección (o después de las 72 horas, cuando la respuesta es más moderada, [Figura 18 **a**]). Esto lo observamos en el comportamiento que tiene la infección con el *Agrobacterium* que contiene el vector pBin vacío.

a)

**Infección de cultivo en suspensión de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens***



b)

**Infección de cultivo en suspensión de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens***

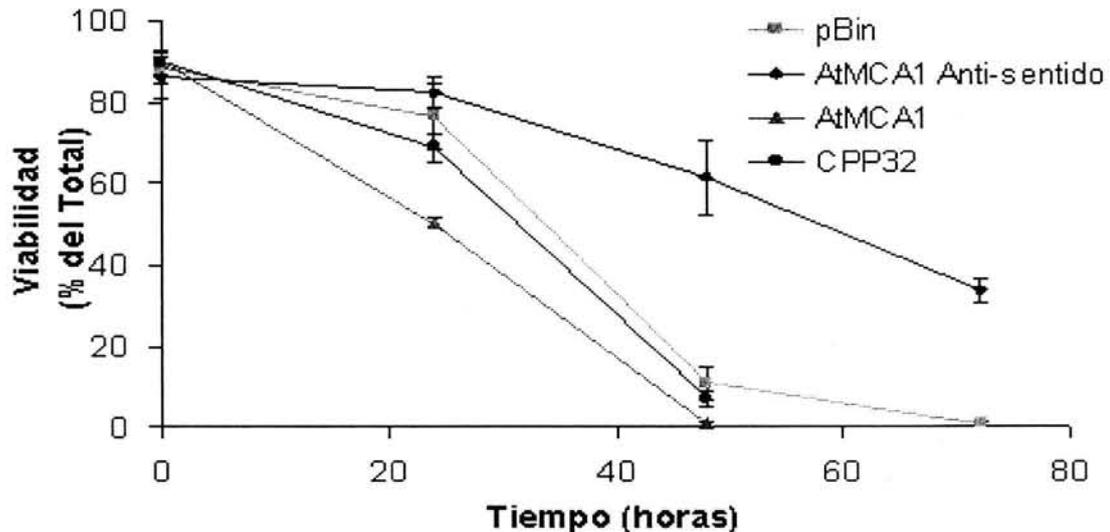


Figura 18. **a)** Viabilidad de células en suspensión de *A. thaliana* infectadas con *Agrobacterium tumefaciens*  $2 \times 10^8$  células/ml con las construcciones indicadas. Las células fueron teñidas con azul tripano 0.1 % y FDA  $5 \mu\text{M}$ . La viabilidad es el porcentaje de células vivas del total de células en el cultivo. Las barras indican  $\pm$  desviación estándar de 3 conteos en 2 experimentos independientes. **b)** Otra cinética de viabilidad, igual a la anterior, donde la respuesta a la infección con la bacteria fue mayor, debido a las condiciones iniciales del cultivo y de las bacterias.

Tiempo despues del tratamiento (h)

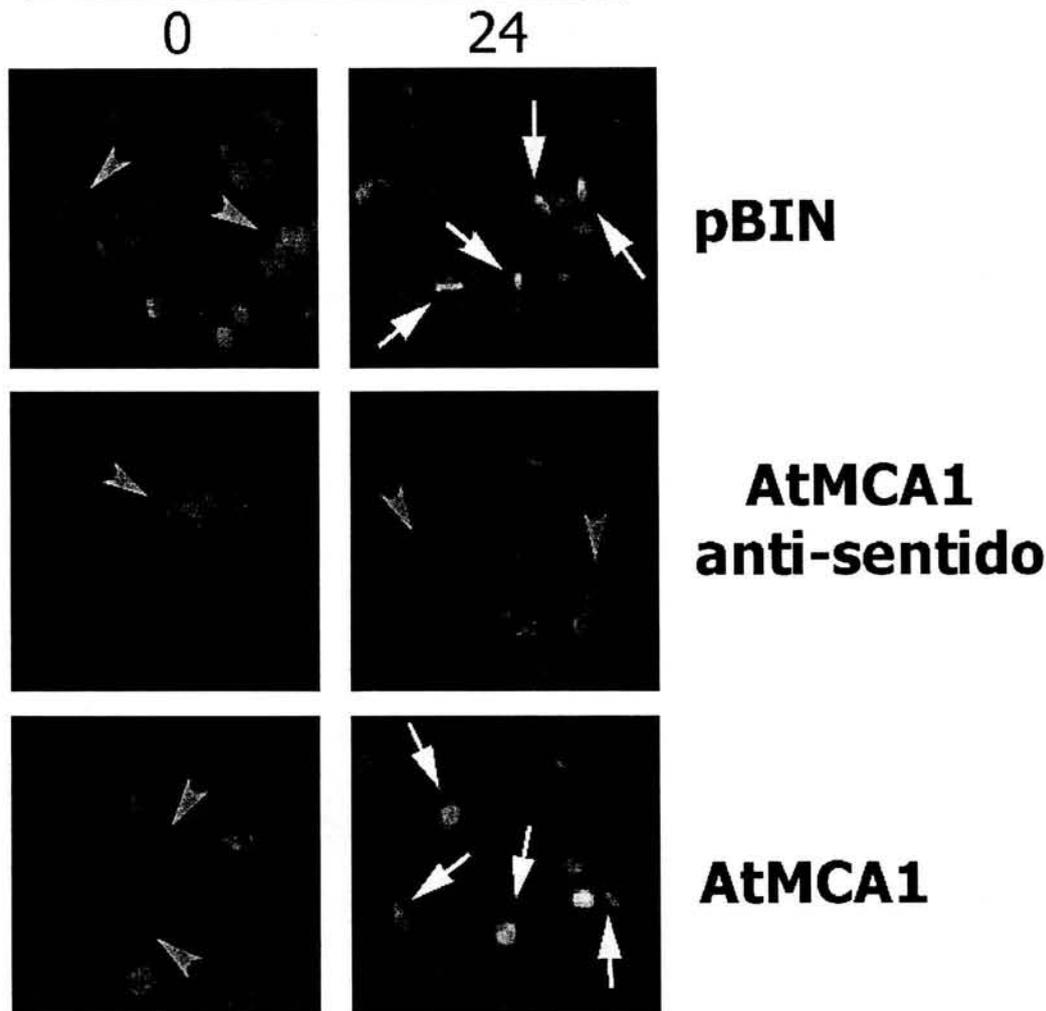


Figura 19. Células de *A. thaliana* de cultivos en suspensión infectadas con *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo las diferentes construcciones indicadas. Las células están teñidas con DAPI a las 0 y 24 horas después de la infección, y se observan en un microscopio de fluorescencia con un filtro para UV. Las cabezas de flecha verdes indican núcleos normales y las flechas amarillas indican núcleos condensados.

Pero además pudimos observar que cuando la bacteria carga el vector pBin con la versión sentido del gen AtMCA1, la respuesta de la célula vegetal frente a la infección es más rápida, comparándola con el control. Este efecto es más evidente cuando se trata de una respuesta fuerte, o sea, cuando las células están en condiciones iniciales no muy buenas y por lo tanto son más susceptibles a cualquier estrés. Esto quiere decir que al aumentar la expresión de la metacaspasa AtMCA1 frente a una respuesta que normalmente induce la muerte, la muerte será más rápida y diseminada en el cultivo.

Por otro lado, el resultado más interesante fue el que obtuvimos al transformar las células de *Arabidopsis* con el antisentido del gen AtMCA1. Aquí obtuvimos un resultado muy congruente con el anterior: como la sobreexpresión del sentido de la metacaspasa

aumentó la muerte, el antisentido (cuya función es apagar o al menos reducir considerablemente la expresión) disminuyó esta muerte celular. Y esta tendencia a proteger las células infectadas por la bacteria es evidente en las dos distintas cinéticas de muerte, tanto la moderada como la aguda (figura 18 **a** y 18 **b**). Finalmente las células encuentran un modo de morir con los niveles bajos de AtMCA1 (debidos a la co-supresión por el antisentido) o sin la necesidad de expresar más metacaspasa AtMCA1 (en caso de que la expresión de AtMCA1 se abatiera por completo), lo que se aprecia 96 horas después de la infección (figura 18 **a**, en la respuesta moderada); sin embargo, durante las primeras 72 horas donde las células contienen el antisentido de AtMCA1, no se aprecia muerte alguna en el cultivo, a diferencia de lo que se observa con el resto de las construcciones, incluida el vector control.

Por último, la expresión del transgen CPP32 (caspasa 3) en las células vegetales produjo que la respuesta de muerte frente a la infección por *Agrobacterium* se incrementara sensiblemente. Esto es, la caspasa 3 humana tiene un efecto similar en la muerte programada de las células vegetales al que presenta la sobreexpresión de AtMCA1, pero con efecto menor, apenas más intenso que el que presenta el control: 41% de CPP32 vs 56% del control (vector) a las 96 horas en la respuesta moderada.

Para afirmar que la muerte celular que cuantificamos con la doble tinción está relacionada con la muerte programada utilizamos nuevamente otra tinción con DAPI para ver condensación de núcleos. En la figura 19 observamos los núcleos teñidos con el fluoróforo DAPI, y podemos apreciar que en las muestras control (pBin) a las 24 horas después de la infección, se distingue una condensación nuclear típica de la muerte programada, a diferencia de las células al inicio de la cinética (0 horas). Cuando infectamos con la bacteria que lleva la construcción sentido del gen AtMCA1, y por lo tanto, que induce una expresión transitoria de dicho gen, podemos ver que también se presenta la condensación nuclear. En este caso solo utilizamos la técnica con fines cualitativos y no cuantitativos, debido a que solo queríamos demostrar que sí se presenta esta condensación nuclear que se conoce que es característica de la muerte celular programada en las plantas.

Finalmente, en las células donde indujimos una supresión por antisentido de la metacaspasa AtMCA1 observamos que, aunque se presenta la condensación nuclear en las muestras a las 24 horas en la cinética con una respuesta rápida, el número de células que la presentan es por mucho, menor que el que encontramos en las otras condiciones, incluido el control.

---

# DISCUSIÓN

## AISLAMIENTO DEL GEN

La respuesta hipersensible que producen las infecciones con ciertas bacterias y hongos se caracteriza por desarrollar un tipo de defensa en las plantas que les permita detener la infección delimitando al patógeno mediante la muerte localizada de células infectadas junto con las vecinas (Heath, 2000). Las células al morir se desecan formando los característicos halos de amarillamiento que sirven para detectar la respuesta hipersensible, lo que impide al patógeno propagarse al resto de las células. Además, las células infectadas y aquellas destinadas a morir producen toxinas y proteínas de defensa contra el patógeno.

Durante la respuesta de defensa que involucra una reacción hipersensible, las células de la planta producirán un gran número de proteínas que participarán en el proceso a dos niveles: induciendo y dirigiendo la muerte programada de la célula, como las metacaspasas, y preparando al resto de las células para combatir la infección.

En este trabajo aislamos el gen de una de las 9 metacaspasas presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Esto se logró mediante el uso de la técnica de RT-PCR que nos permitió obtener genes que son transcritos en plantas bajo condiciones fisiológicas en respuesta a estímulos de muerte.

Dado que los niveles de ARN mensajero de las metacaspasas detectados en el RT-PCR muestran variaciones a lo largo de la respuesta de las hojas a la infección con la bacteria (datos que no se muestran), sugerimos que las metacaspasas están reguladas a nivel transcripcional durante la respuesta a la infección. Esto lo confirmamos para la metacaspasa AtMCA1 al verificar que su transcripción se regulaba en respuesta a la infección con *Pseudomonas*. Debido a dificultades técnicas, no pudimos verificar la inducción del otro gen aislado, la metacaspasa 254, por lo que es necesario probar si la regulación observada a nivel del ARNm en AtMCA1 también ocurre en esta metacaspasa y en las 7 restantes.

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE AtMCA1

En este estudio evaluamos la expresión de la metacaspasa AtMCA1 en respuesta a 4 diferentes tratamientos que inducen una respuesta de defensa en plantas. Por un lado, encontramos que durante la cinética de infección de la planta con *Pseudomonas*, el ARNm de AtMCA1 eleva sus niveles 4 horas después del tratamiento inicial con estas bacterias. También encontramos que los niveles de ARNm de la metacaspasa alcanzaron un máximo 12 horas después de la infección con el hongo *Alternaria*. Esto sugiere una participación muy temprana de la

metacaspasa AtMCA1 en este tipo de respuesta de defensa de la planta ante infecciones, en relación con la aparición de las áreas de amarillamiento de células muertas sobre las hojas infectadas, que se observa alrededor de las 72 horas. Esto ha sido documentado en una gran diversidad de moléculas tanto en células vegetales como en animales, incluyendo proteínas involucradas en la apoptosis como las caspasas (Caballero y Morán, 2003), proteínas de defensa en plantas (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000) y proteínas de respuesta a estrés (Heat Shock Proteins) en plantas y animales (Sun y cols. 2002).

El ácido salicílico (SA) es un conocido potenciador de la MCP producida por una respuesta de defensa (Overmyer y cols., 2003). Algunos investigadores han propuesto que el SA por sí solo es capaz de producir MCP, mientras que otros no apoyan esta idea (Hoeberichts y Woltering, 2002). Nuestros resultados indican que la metacaspasa AtMCA1 se induce por el tratamiento con SA durante las primeras 2 horas. Esta respuesta tan temprana, en comparación con la infección con bacterias u hongos, en la activación de la maquinaria molecular de la planta es razonable dado que se trata de un tratamiento directo con la molécula de señalización. Se sabe que durante una respuesta hipersensible los niveles de SA aumentan mucho y que esta molécula participa en la señalización entre las células, lo que apoya que éste sea un evento posterior y rápido.

Por otro lado, la respuesta de la planta frente a una herida mecánica no implica necesariamente una muerte programada, sino un estrés al que se somete la planta. En este caso la metacaspasa se estaría comportando de manera similar a lo que se esperaría de una proteína de respuesta a estrés (hsp) o a una proteína de defensa. De hecho, las metacaspasas de tipo I (al cual pertenece AtMCA1) poseen un dominio N-terminal con homología a algunas de las proteínas de defensa que se conocen (como LSD o LOL). Esto también podría significar que las metacaspasas de tipo I pueden interactuar directamente con estas proteínas de defensa mediante la unión de estos dominios, como se sabe que ocurre en las caspasas iniciadoras en la vía intrínseca de las caspasas (Ashkenazi y Dixit, 1998).

Así, la inducción del mensajero de AtMCA1 frente al estrés producido por cualquiera de los 4 tratamientos aplicados a la planta produjo un pico máximo de inducción dentro de las primeras horas. Además, cabe notar que en todos los casos observamos que el control no inducido posee un nivel basal de transcrito de la metacaspasa, lo cual concuerda con lo encontrado en otras células animales (Caballero y Morán, 2003). Esto podría deberse a que el tiempo de respuesta de la proteína debe ser lo más rápido posible para enfrentar el estrés y ser eficiente, de manera que el aumento subsecuente del mensajero que se observa en las cinéticas, es una consecuencia de la retroalimentación que se genera por la acción de la misma maquinaria de defensa. De ahí que una de las características de las caspasas en general sea su propiedad de regulación por activación. Esto quiere decir que estas proteasas, que se sintetizan como proenzimas inactivas, se encontrarán normalmente en células saludables, y que requerirán de su activación para que funcionen; de esta manera, el tiempo requerido para su activación es mucho menor, pues la proteína inactiva o el mensajero ya están presentes. De

esta manera, la célula tiene varios niveles de regulación de las caspasas: por un lado la transcripción del mensajero, por otro lado la cantidad de proenzima que se sintetiza a partir del transcrito, y por último la activación de esta proenzima por algún estímulo para generar una enzima activa.

### **ACTIVIDAD TIPO-CASPASAS DE AtMCA1**

Dada la gran actividad que observamos con la caspasa 3 humana, pudimos ver que no es necesario un estímulo de inducción que la active, no al menos cuando se encuentran niveles tan altos de proteína como los que obtuvimos mediante este sistema de sobreexpresión. Esto apoya la hipótesis de que la activación dentro de la bacteria se debe a la proximidad de las proenzimas gracias a un aumento en su concentración por sobreexpresión de la proteína. En ausencia de un estímulo apoptótico y del resto de la maquinaria apoptótica que se encuentra dentro de las células de mamífero, la caspasa 3 puede ser activada por ella misma gracias a su propiedad de autocatálisis (Yang y colaboradores, 1998). Esta actividad proteolítica debida a una autoactivación de la caspasa la verificamos mediante la detección de la proteína con anticuerpos en un Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce a la caspasa 3.

Autores como Colussi y colaboradores (1998) afirman que la capacidad de autoactivación de las caspasas se debe principalmente al tamaño de su prodominio, siendo las caspasas iniciadoras, que poseen un prodominio grande, aquellas que tienen la mayor propiedad de autocatálisis. Debido a esto esperamos que la metacaspasa AtMCA1, al poseer un prodominio grande, pudiera funcionar como una caspasa iniciadora y autoactivarse de la misma manera. Sin embargo, en este estudio la caspasa 3, que tiene un prodominio chico y es una caspasa efectora, presentó una actividad enorme que no se esperaba que tuviera en acuerdo con las propiedades de autoactivación descritas. Por otro lado, la metacaspasa AtMCA1 no presentó una gran actividad de caspasa, y lo que es más, al detectar la proteína con el anticuerpo anti-histidinas observamos que había mucha proenzima. Esto indica que lo más probable es que la actividad tan baja que observamos se deba a que 1) el substrato utilizado no es aquel que reconoce esta enzima de manera óptima, y 2) aparentemente esta metacaspasa no se autoactiva, lo que observamos por la gran producción de proenzima y ausencia de proteínas de menor peso molecular correspondientes a la enzima activa.

Es importante señalar que el plásmido que se utilizó para sobreexpresar a AtMCA1 se mandó a secuenciar para verificar que estuviera en fase y sin mutaciones, encontrándose en fase, pero con una mutación en la secuencia. Esta mutación cambió un ácido glutámico (E) muy conservado en todas las metacaspasas por una glicina (G); es decir, un aminoácido cargado por uno sin carga. Sin embargo detectamos una pequeña actividad de caspasa 3 significativamente más grande que la detectada con los vectores control, aunque demasiado pequeña comparada con la actividad de la caspasa 3 humana. Pero para poder afirmar que posee una actividad proteolítica del tipo de caspasa 3, sería

necesario purificar la enzima para quitar todo el fondo de las proteínas de la bacteria.

También es importante señalar que los sustratos utilizados son específicos para caspasas de mamíferos, y que su reconocimiento por parte de las caspasas es excluyente entre caspasas; esto es, cada sustrato será reconocido por un solo tipo de caspasa dentro de la misma célula, y menos aún por alguna proteasa de un organismo tan diferente como una planta. Esto quiere decir que lo más probable sea que los sustratos endógenos de plantas sean muy diferentes, por lo que las metacaspasas difícilmente podrán reconocer los sustratos de caspasas de mamíferos.

La generación de una biblioteca de sustratos sintéticos de caspasas (formados por combinaciones de 4 aminoácidos) permitió detectar los mejores blancos de las caspasas para así encontrar sustratos endógenos de las células (Thornberry y cols., 1997); asimismo, una modificación del sistema de dos híbridos en levadura permitió a Won y cols. (2003) detectar nuevos sustratos endógenos para las caspasas mediante una construcción de una librería de posibles sustratos acoplada al sistema de Lac-Z. Cualquiera de estas dos metodologías podría servir para encontrar los sustratos endógenos de las metacaspasas.

## **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE AtMCA1 EN PRESENCIA DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Y ESTAUROSPORINA EN CULTIVO EN SUSPENSIÓN**

Además de los estímulos de la Reacción Hipersensible y la herida utilizados en las plantas, analizamos la expresión de ATMCA1 bajo estímulos de muerte por medios químicos.

Uno de los estímulos más generalizados y que se presentan en todos los organismos que exhiben muerte celular programada es el estrés oxidativo causado por un desbalance en las especies reactivas de oxígeno. Este estrés puede ser causado por el peróxido de hidrógeno, que es un compuesto muy reactivo, altamente inestable y difundible a través de la célula. Se ha demostrado MCP inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas en cultivo como *Arabidopsis thaliana* (Levine y cols., 1994; Desikan y cols., 1998). El peróxido de hidrógeno produce distintas especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para las células y dependiendo de la concentración a la que se usen en cultivos celulares producen distintos tipo de reacciones. Una concentración entre 5 y 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce muerte en cultivos en suspensión de *Arabidopsis thaliana* (Levine y cols., 1994). Por otro lado, también utilizamos un inductor de apoptosis muy común en modelos animales y vegetales: el inhibidor de proteína cinasa, estaurosporina. Este inductor también ha sido probado en cultivos en suspensión de plantas (De Jong y cols., 2000), y se ha visto que induce una muerte celular programada muy parecida a la apoptosis.

De esta manera, al utilizar estos inductores produjimos una MCP en el cultivo en suspensión que pudo ser evaluada por medio de la tinción doble con azul tripano y FDA. Al analizar la acumulación del mensajero de AtMCA1, éste se incrementa lo que nos indica que muy probablemente la expresión de *Arabidopsis thaliana* tiene un papel en el proceso de muerte celular inducido por el estrés oxidativo y por la inhibición de cinasas. Así, observamos que, al igual que en las respuestas frente a distintos tipos de estrés, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la estaurosporina inducen la expresión de la metacaspasa durante las primeras horas después del tratamiento.

El caso del peróxido de hidrógeno es aún más problemático debido a que uno de los estreses a los cuales están sujetas continuamente las células en cultivo es el oxidativo. Es por ello que ciertas vías de transducción de señales dependientes de radicales libres operan comúnmente en estos cultivos (Halliwell, 2003). Sin embargo se sabe también que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como una molécula de señalización regulando la muerte celular (Pellinen, 2002). Por todo lo anterior pensamos que la respuesta que se observa frente a los estímulos de estaurosporina y peróxido está más relacionada con el proceso de muerte que con el simple estrés, ya que observamos que los niveles iniciales de un cultivo ya estresado son bajos, y aumentan conforme la muerte celular se presenta; además los niveles máximos de transcripción se presentan cuando existe un porcentaje considerable de muerte.

En apoyo a lo anterior encontramos que estas células mostraron una condensación nuclear típica de la apoptosis cuando se sometieron a ambos tratamientos con estaurosporina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de manera similar a la reportada en la apoptosis animal.

## **EXPRESIÓN TRANSITORIA DE AtMCA1 EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN**

Para evaluar la participación de AtMCA1 en el proceso de muerte de *A. thaliana*, sobreexpresamos esta proteína en células en suspensión mediante su expresión transitoria, así como su inhibición por medio del antisentido.

Según nuestros resultados de transcripción de ARNm de la metacaspasa, la célula siempre posee niveles basales del transcrito. Se sabe que lo mismo ocurre en el caso de las caspasas de mamíferos. Por esto, suponemos que también existen niveles basales de proteína de AtMCA1 en las plantas. Basados en lo anterior y para conocer la participación de la metacaspasa AtMCA1 en el proceso de muerte, indujimos la sobreexpresión de esta proteína para remarcar las acciones de la proteasa durante el proceso de muerte. De esta manera, la sobreexpresión de la metacaspasa alteraría el equilibrio en los niveles de estas moléculas, produciendo un aumento o una disminución de la respuesta de la planta frente a algún estímulo que indujera MCP.

La bacteria patógena *Agrobacterium tumefaciens*, cuya cepa ha sido genéticamente modificada quitándole aquellos genes de virulencia que causan su

patogenicidad, ha sido ampliamente utilizada para la expresión transitoria de un sinnúmero de genes, así como para la formación de líneas estables de plantas transgénicas. Sin embargo, se ha reportado que cuando esta bacteria transforma a muchos de los cultivos en suspensión de plantas, uno de los principales problemas que se presentan es la muerte de las células infectadas, producto de la infección de la bacteria (Weld y cols., 2001). Recientemente se ha reportado en maíz (*Zea mays*) que la muerte presenta características de tipo apoptótica tras la transformación con *Agrobacterium*, y además esta muerte puede ser disminuida tanto en células en cultivo como en tejidos de la planta cuando se realiza una co-transformación con los genes antiapoptóticos IAP1 y p32 (Hansen, 2000). Estos genes inhiben la apoptosis mediante el bloqueo directo de la actividad de las caspasas (Stennicke y cols., 2002).

Así, dado que comprobamos que la infección de un cultivo en suspensión de *Arabidopsis thaliana* con la bacteria *A. tumefaciens* induce por sí misma una muerte celular, no fue necesario utilizar algún otro estímulo para inducir el programa de muerte celular. Utilizando el vector pBIN 35S 3x, cuya capacidad de expresión constitutiva de una proteína es muy alta, transformamos cultivos en suspensión de *Arabidopsis* con las versiones sentido y antisentido de AtMCA1, además de un control (vector vacío). Debido a que las células en suspensión se encuentran muy estresadas y continuamente secretan sustancias que no son removidas al medio, éstas se vuelven más susceptibles a los estímulos para aumentar el estrés. De esta manera, entre más tiempo tienen las células sin resembrarse, más toxinas tienen en el medio y más estresadas están.

Bajo estas condiciones, confirmamos que la infección de *Agrobacterium tumefaciens* en células de *Arabidopsis thaliana* producen una muerte celular de tipo programado, lo cual corroboramos mediante la condensación nuclear. Esta muerte celular evidenciada por la transformación del vector pBIN, fue aumentada mediante la sobreexpresión de la metacaspasa AtMCA1 dentro de este vector de expresión. En principio, la sobreproducción de una caspasa, como demostramos en el caso de la caspasa 3 humana, parece ser suficiente para que se active; sin embargo, la sobreexpresión de AtMCA1 en *E. coli* parece no ser suficiente para activar esta proteína; al menos de la forma como tradicionalmente se activan las caspasas, rompiéndose en dos subunidades.

Por otro lado, la sobreproducción de AtMCA1 en células cuyo programa de muerte se ha activado fue mucho mayor que en condiciones de muerte con niveles basales de esta proteasa. Estos resultados se complementaron cuando se disminuyó la expresión de expresión AtMCA1 utilizando un antisentido para esta proteasa y se encontró una clara inhibición del programa de muerte celular inducida por *A. tumefaciens*.

Los análisis de secuencia apuntan a que la participación de la metacaspasa AtMCA1 se da en la primera fase del proceso, durante la regulación, donde podría estar involucrada en las interacciones con otras proteínas, como con ciertas proteínas de defensa con las cuales comparte homología en un dominio (Uren y colaboradores, 2000) o con otras proteínas gracias al posible dedo de zinc que

posee en su porción N-terminal (Matthews y Sunde, 2002). Se sabe que las proteínas LSD y LOL, que contienen una homología con AtMCA1 en la porción donde se encuentra el dedo de zinc, están involucradas en la interpretación correcta de señales dependientes de radicales libres durante la reacción hipersensible (Epple y cols., 2003).

Por otro lado, nuestros resultados indican que la participación de AtMCA1 no se limita únicamente a la respuesta de defensa contra patógenos que se presenta durante la reacción hipersensible, puesto que observamos la expresión de la metacaspasa durante una herida mecánica más relacionada con ataque de herbívoros, así como en un proceso de muerte mediado por un inhibidor de cinasas, la estaurosporina.

Adicionalmente, al transformar las células en suspensión con el vector que contenía a la caspasa 3 humana obtuvimos una muerte celular más intensa comparada con la producida por el control, aunque menor que la observada durante la expresión transitoria de AtMCA1. La sobreproducción de caspasa 3 humana, que se demostró que es suficiente para activarse sin necesidad del resto de la maquinaria apoptótica, aumenta ligeramente la muerte inducida por la infección de *Agrobacterium*. Esto sugiere que la caspasa 3 humana puede reconocer substratos exógenos y potenciar el proceso de muerte, aunque este aumento es mínimo debido a que los substratos de la caspasa son diferentes a los de las metacaspasas, como se vio durante la medición de actividad de caspasa en el sistema de sobreexpresión en *E. coli*.

El retraso o inhibición del programa de muerte por parte del antisentido también nos indica que es necesaria la expresión *de novo* de proteína de metacaspasa AtMCA1 para echar a andar el proceso, siendo insuficiente la activación de la proteína normalmente presente en la célula y la expresión residual que se detecta normalmente en las expresiones de antisentidos (es decir, que no se abate por completo la expresión del gen con la co-supresión mediada por el antisentido) para responder al mismo nivel que en células normales. Por otro lado, esos resultados también nos indican que la célula encontrará finalmente un modo de morir, es decir, podría encontrar otra vía alterna por la cual pudiera suicidarse sin la necesidad de AtMCA1, lo cual puede explicarse por la complementación que podría darse con cualquier otra metacaspasa que sustituyese su función. Esto explicaría la necesidad de tener toda una familia de metacaspasas, como sucede en animales, así como la existencia de vías de muerte celular programada independientes de metacaspasas.

---

## CONCLUSIONES

- Se aisló la secuencia de ADN de una de las 9 metacaspasas de *Arabidopsis thaliana*, nombrándose AtMCA1, por ser la primera metacaspasa aislada de esta planta.
- La metacaspasa AtMCA1 presenta una inducción a nivel de mensajero en plantas completas bajo 2 diferentes estímulos que producen una reacción hipersensible y están relacionados con la muerte celular programada: la infección con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* y la infección con el hongo *Alternaria brassicicola*.
- El gen de AtMCA1 también presenta una inducción a nivel de mensajero bajo 2 tratamientos que inducen una respuesta de defensa por parte de la planta: la herida mecánica y el tratamiento con ácido salicílico.
- Los tiempos de inducción del gen AtMCA1 bajo los 4 estímulos anteriores coinciden temporalmente, iniciándose este aumento alrededor de las 4 horas después del tratamiento.
- La metacaspasa AtMCA1 se induce en cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* mediante los tratamientos con los inductores químicos de MCP, peróxido de hidrógeno y estaurosporina. Esta inducción se relaciona temporalmente de manera proporcional con la muerte programada de las células.
- La metacaspasa AtMCA1 recombinante en un extracto de *Escherichia coli* presenta una ligera actividad de caspasa tipo 3.
- La sobreexpresión transitoria de AtMCA1 en células en suspensión de *A. thaliana* aumenta la muerte inducida por la infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y la expresión transitoria del antisentido de AtMCA1 protege de la muerte a estas células vegetales.
- La metacaspasa AtMCA1 está involucrada en el proceso de muerte celular programada de *Arabidopsis thaliana* provocada por los inductores bióticos y químicos antes mencionados, posiblemente durante la fase de ejecución del programa de muerte.

# APÉNDICE

## GLOSARIO

ADNc	<b>Ácido Desoxirribonucleico copia</b>
Apt1	Fosforribosil transferasa de Adenina ( <b>A</b> denine <b>p</b> hosphoribosyl <b>t</b> ransferase)
ARN	<b>Ácido Ribonucleico</b>
ARNm	<b>Ácido Ribonucleico mensajero</b>
AtMCA1	Metacaspasa de <i>A. thaliana</i> 1 ( <i>A</i> rabidopsis <i>t</i> haliana <b>M</b> etacaspase 1)
Bcl-2	proteínas anti y pro apoptóticas (de linfoma de células B) ( <b>B</b> -cell <b>l</b> ymphoma)
BIR	Repetición de IAPs de Baculovirus ( <b>B</b> aculovirus <b>I</b> AP <b>R</b> epeat)
BIRP	Proteínas con Repetición de IAPs de Baculovirus ( <b>B</b> aculovirus <b>I</b> AP <b>R</b> epeat <b>P</b> roteins)
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas ( <b>C</b> aspase <b>R</b> ecruitment <b>D</b> omain)
caspasas	proteasas de cisteína específicas para aspartato ( <b>C</b> ysteine <b>A</b> spartate <b>S</b> pecific <b>P</b> roteases)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico copia (copy <b>D</b> eoxyribonucleic <b>a</b> cid)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole (4',6- <b>D</b> iamidino-2- <b>p</b> henylindole)
DD	Dominio de muerte ( <b>D</b> eath <b>D</b> omain)
DMSO	<b>Dimetil sulfóxido</b>
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético ( <b>E</b> thylenediamine <b>t</b> etraacetic <b>a</b> cid)
FDA	Diacetato de Fluoresceína ( <b>F</b> luorescein <b>D</b> iacetate)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
Hsp	Proteínas de Choque térmico ( <b>H</b> eat <b>S</b> hock <b>P</b> roteins)
HTa y HTb	vector pProEX Hta y b
IAP	Proteínas Inhibidoras de Apoptosis ( <b>I</b> nhibitor of <b>A</b> ppoptosis <b>P</b> roteins)
IPTG	<b>Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosida</b>
MCP	<b>Muerte Celular Programada</b>
MVRT	Transcriptasa Reversa de virus murino

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

	( <b>Murine Virus Reverse Transcriptase</b> )
p10	subunidad pequeña de caspasas de $\approx 10$ kDa
p20	subunidad grande de caspasas de $\approx 20$ kDa
PARP	<b>Poli-ADP-Ribosa Polimerasa</b> o Poli-ADP-Ribosil Transferasa
pBIN	Vector pBIN 35S 3x
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <b>Polimerase Chain Reaction</b> )
pKS	vector <b>pBluescript KS</b>
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, Reverso Transcriptasa ( <b>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</b> )
SA	ácido salicílico ( <b>Salicylic Acid</b> )
SCM	<b>Sitio Múltiple de Clonación</b>
SDS	Dodecil sulfato de sodio ( <b>Sodium Dodecylsulphate</b> )
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS ( <b>SDS-Polyacrylamide Gel Electroforesis</b> )
TM	Temperatura de apareamiento (Melting Temperature)
TUNEL	<b>Terminal dUTP 3' Nick End Labelling</b>
VIH	<b>Virus de Inmunodeficiencia Humana</b>
xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil galactosa
YCA1	Metacaspasa 1 de levadura ( <b>Yeast Caspase-1</b> )
BI-1	Inhibidor 1 de Bax ( <b>Bax Inhibitor-1</b> )

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Adams JM, Cory S.** 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
2. **Aravind L, Dixit VM, Koonin EV.** 2001. Apoptotic molecular machinery: Vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291: 1279-1284.
3. **Aravind L, Koonin EV.** 2002. Classification of the Caspase-Hemoglobinase Fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 46: 355-367.
4. **Ashkenazi A, Dixit VM.** 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
5. **Balk J, Leaver CJ, McCabe PF.** 1999. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters* 463: 151-154.
6. **Beers EP, Freeman TB.** 1997. Proteinase activity during tracheary element differentiation in *Zinnia mesophyll* cultures. *Plant Physiology* 113: 873-880.
7. **Beers EP, McDowell JM.** 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 561-567.
8. **Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C.** 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* 44: 399-415.
9. **Bolduc N, Brisson LF.** 2002. Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Letters* 532: 111-114.
10. **Bolduc N, Ouellet M, Pitre F, Brisson LF.** 2003. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 216:377-386.
11. **Caballero-Benitez A, Moran J.** 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *Journal of Neuroscience Research* 71(3):383-396.
12. **Cohen GM.** 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemistry Journal* 326: 1-16.
13. **Colussi PA, Harvey NL, Shearwin-Whyatt LM, Kumar S.** 1998. Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26566-26570.
14. **Danon A, Gallois P.** 1998. UV- C radiation induces apoptotic – like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 437: 131-136.
15. **Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P.** 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 647-655.
16. **De Jong AJ, Hoeberichts FA, Yakimova ET, Maximova E, Woltering EJ.** 2000. Chemical – induced apoptotic cell death in tomato cells. Involvement of caspase – like proteases. *Planta* 211: 656-662.

17. **Del Pozo O, Lam E.** 1998. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology* 8: 1129-1132.
18. **Delorme VGR, McCabe PF, Kim D-J, Leaver CJ.** 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology* 123: 917-927.
19. **Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ.** 1998. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemistry Journal* 330: 115-120.
20. **Deveraux QL, Reed JC.** 1999. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes & Development* 13: 239-252.
21. **Dickman MB, Park YK, Oltersdort T, Li N, Clemente T, French R.** 2001. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS* 98 (12): 6957-6962.
22. **Dion M, Chamberland H, St-Michel C, Plante M, Darveau A, Lafontaine JG, Brisson LF.** 1997. Detection of a homologue of bcl-2 in plant cells. *Biochemistry and Cell Biology* 75: 475-461.
23. **D'Silva I, Poirier GG, Heath MC.** 1998. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response – A form of programmed cell death. *Experimental Cell Research* 245:389-399.
24. **Elbaz M, Avni A, Weil M.** 2002. Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Cell Death and Differentiation* 9: 726-733.
25. **Epple P, Mack AA, Morris VRF, Dangl JL.** 2003. Antagonistic control of the oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *PNAS* 100 (11): 6831-6836.
26. **Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S.** 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113: 4399-4411.
27. **Fukuda H.** 1997. Tracheary element differentiation. *The Plant Cell* 9: 1147-1156.
28. **Fukuda H.** 2000. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44: 245-253.
29. **García-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA.** 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (49): 32608-32613.
30. **Greenberg JT.** 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *PNAS* 93: 12094-12097
31. **Halliwell B.** 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters* 540:3-6.
32. **Han Z, Hendrickson EA, Bremner TA, Wyche JH.** 1997. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (20): 13432-13436.

33. **Hansen G.** 2000. Evidence for Agrobacterium-induced apoptosis in maize cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (6): 649-657.
34. **Heath MC.** 2000. Hypersensitive Response – related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
35. **Hengartner MO.** 1998. Death by crowd control. *Science* 281: 1298-1299.
36. **Hengartner MO.** 2000. The Biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
37. **Hoerberichts FA, Woltering EJ.** 2002. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* 25: 47-57.
38. **Hoerberichts FA, Have A, Woltering EJ.** 2003. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in Botrytis cinerea-infected leaves. *Planta* 217 (3): 517-522.
39. **Houot V, Etienne P, Petitot A-S, Barbier S, Blein J-P, Suty L.** 2001. Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* 52 (361): 1721-1730.
40. **Jacobson MD, Weil M, Raff MC.** 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
41. **Jones AM, Dangl JL.** 1996. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends in Plant Science* 1(4): 114-119.
42. **Jones AM.** 2000. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Science* 5(5): 225-230.
43. **Jones AM.** 2001. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology*. 125: 94-97.
44. **Kawai M, Pan L, Reed JC, Uchimiya H.** 1999. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax Inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Letters* 464: 143-147.K
45. **Kim M, Ahn J-W, Jin U-H, Choi D, Paek K-H, Pai H-S.** 2003. Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19406-19415.
46. **Korthout HAAJ, Berecki G, Bruin W, van Duijn B, Wang M.** 2000. The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Letters* 475: 139-144.
47. **Lacomme C, Santa Cruz S.** 1999. Bax – induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *PNAS* 96: 7956-7961.
48. **Lam E, Pontier D, del Pozo O.** 1999. Die and let live - Programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 502-507.
49. **Lam E, del Pozo O.** 2000. Caspase – like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Molecular Biology* 44: 417-428.
50. **Lam E, Kato N, Lawton M.** 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.

51. **Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenaabeele P.** 2002. Alice un caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation* 9: 358-361.
52. **LeBlanc AC.** 2003. Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 215-229.
53. **Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C.** 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6 (4): 427-437.
54. **Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C.** 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
55. **Lincoln JE, Richael C, Overduin B, Smith K, Bostock R, Gilchrist DG.** 2002. Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *PNAS* 99 (23): 15217-15221.
56. **Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Fröhlich K-U.** 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell* 9: 911-917.
57. **Matthews JM, Sunde M.** 2002. Zinc fingers- folds for many occasions. *IUBMB Life* 54(6):351-355.
58. **McCabe PF, Leaver CJ.** 2000. Programmed cell death in cell cultures. *Plant Molecular Biology* 44: 359-368.
59. **Mitsuhara I, Malik KA, Miura M, Ohashi Y.** 1999. Animal cell death suppressors Bcl – x<sub>L</sub> and Ced – 9 inhibit cell death in tobacco plants. *Current Biology* 9: 775-778.
60. **Mittler R, Lam E.** 1995. In situ detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiology* 108: 489-493.
61. **Mittler R, Rizhsky L.** 2000. Transgene – induced lesion mimic. *Plant Molecular Biology* 44: 335-344.
62. **Mlejnek P, Procházka S.** 2002. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215: 158-166.
63. **Obara K, Kuriyama H, Fukuda H.** 2001. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in Zinnia. *Plant Physiology* 125: 615-626.
64. **Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J.** 2003. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trend in Plant Science* 8 (7): 335-342.
65. **Pellinen RI, Korhonen M-S, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjarvi J.** 2002. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in Birch. *Plant Physiology* 130: 549-560.
66. **Pennell RI, Lamb C.** 1997. Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9: 1157-1168.
67. **Richberg MH, Aviv DH, Dangl JL.** 1998. Dead cells do tell tales. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 480-485

68. **Roberts K, McCann MC.** 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 517-522.
69. **Rubinstein B.** 2000. Regulation of cell death in flower petals. *Plant Molecular Biology* 44: 303-318.
70. **Salvesen GS, Duckett CS.** 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 3: 401-410.
71. **Shirazu K, Schulze-Lefert P.** 2000. Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 371-385.
72. **Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A.** 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 11: 431-433.
73. **Stennicke HR, Ryan CA, Salvensen GS.** 2002. Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (2): 94-101.
74. **Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N.** 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577: 1-9.
75. **Sun Y-L, Zhao Y, Hong X, Zhai Z-H.** 1999. Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters* 462: 317-321.
76. **Szallies A, Kubata BK, Duszenko M.** 2002. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 517: 144-150.
77. **Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW.** 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (2): 17907-17911.
78. **Thornberry NA, Lazebnik.** 1998. Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
79. **Tian R-H, Zhang G-Y, Yan C-H, Dai Y-R.** 2000. Involvement of Poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Letters* 474: 11-15.
80. **Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL.** 1998. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 159-162.
81. **Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM.** 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell* 6: 961-967.
82. **Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, Schotte P, Van Criekinge W, Beyaert R, Fiers W.** 1997. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Letters* 403: 61-69.
83. **Van der Biezen EA y Jones JD.** 1998. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* 26;8(7):R226-7

84. **Weld R, Heinemann J, Eady C.** 2001. Transient GFP expression in *Nicotiana plumbaginifolia* suspension cells: the role of gene silencing, cell death and T-DNA loss. *Plant Molecular Biology* 45: 377-385.
85. **Woltering EJ, van der Bent A, Hoeberichts FA.** 2002. Do plant caspases exist? *Plant Physiology* 130: 1764-1769.
86. **Won J, Kim DY, La M, Kim D, Meadows GG.** 2003. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates Bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19347-19351.
87. **Wu H-M, Cheung AY.** 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* 44: 267-281.
88. **Xu H, Heath MC.** 1998. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by Basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *The Plant Cell* 10: 585-597.
89. **Xu Q, Reed JC.** 1998. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular Cell* 1: 337-346.
90. **Xu Y, Hanson MR.** 2000. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiology* 122: 1322-1333.
91. **Yamada T, Marubashi W, Niwa M.** 2001. Facile induction of apoptosis into plant cells associated with temperature-sensitive lethality shown on interspecific hybrid from the cross *Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*. *Plant Cell Physiology* 42 (2): 204-213.
92. **Yang X, Chang HY, Baltimore D.** 1998. Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Molecular Cell* 1: 319-325.
93. **Young TE, Gallie DR.** 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 44: 283-301.
94. **Zhao Y, Jiang Z-F, Sun Y-L, Zhai Z-H.** 1999. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters* 448: 197-200.

Este estudio se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y bajo la co-dirección de la Dra. Helena Porta Ducoing en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

El trabajo se financió con el donativo correspondiente del proyecto IN203400 de la DGAPA, UNAM, y con el apoyo del programa de becas Probetel.

Se agradece el apoyo técnico de la Biol. Patricia Rueda, la Biól. Guadalupe Domínguez y de Martha Trujillo.