



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Activación de MAPKs inducidas por bases de
cadena larga en una especie mono y una
dicotiledónea**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

MARIANA SAUCEDO GARCÍA

MÉXICO, D.F., MARZO 2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Mario Rocha Sosa

VOCAL: Dr. A. Arturo Guevara García

SECRETARIO: Dra. Susana Castro Obregón

SUPLENTE: Dr. Roberto Coria Ortega

SUPLENTE: Dr. Dimitris Georgellis

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

Asesor del Tema: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante: _____
Q. A. Mariana Saucedo García

AGRADECIMIENTOS

Mariana Saucedo García recibió becas de CONACYT (No. 185332) y de UC-MEXUS, Universidad de California (CN-03-118)

El trabajo de tesis fue financiado por los proyectos de Facultad de Química, UNAM (PAIP 6209); DGAPA, UNAM (IN207806); CONACYT (40311-Q) y UC-MEXUS, Universidad de California (CN-03-118).

A la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo por la ayuda técnica requerida en el proyecto.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra por la asesoría técnica en los cultivos de invernadero

Al Comité tutorial de la Maestría:

Marina Gavilanes Ruíz (Facultad de Química, UNAM)

Víctor M. Baizabal Aguirre (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH)

Roberto Coria Ortega (IFC)

por sus observaciones y comentarios realizados en el desarrollo del trabajo.

Al jurado asignado, por la revisión y las sugerencias realizadas al presente proyecto.

DEDICATORIAS

A mis papás por el apoyo y amor incondicional que siempre me brindan. Porque me enseñaron a ser independiente, principalmente de pensamiento.

A mis hermanitas: Gaby, Renata, Aurora y Alelhuska por todos los momentos que compartimos. Porque cada una muestra características únicas que las hace admirables. A ustedes, porque juntas creamos nuestro propio mundo.

A nuestra más nueva adquisición en la familia: me refiero a tí Monis. Hacía falta que alguien compartiera conmigo la ardua responsabilidad de romper el silencio

A los miembros de la familia que faltan por llegar, espero que esté incluido el famoso y discutido "Tanito". ¡Échale ganas Aurora!

A Pablo, Edgar y Ariel por ser una parte indispensable de nuestra familia.

A mis primos, tíos y sobrinos, por alegrarnos la vida mutuamente en cada encuentro.

A Liliana y Ale por los cafés, las películas, las fiestas, las alegrías, las emociones, los enojos, los consejos, Y SOBRE TODO LAS IDAS DE PINTA, que hemos compartido en este tiempo

A Abraham por haber compartido una rebanadita de tiempo y espacio

Al club de los biólogos: José, Hugo y a uno que otro colado más de Ciencias

A los Alebrijes por esa pasión que los hace mover montañas

A Tavo y su bendito café

A mis amigas de los Tuxtlas: quedaron impresas en mi mente

A Dany por tener un corazón de alcachofa, gracias por todo.

A Chelín y Andrea porque son mi terapia de relajación, a Diana, Manuela, Mariana R., Belem, Silvia, Laura, Christian y Prisi por las enseñanzas que cada uno me ha dado.

A Ket e Ita, por sus charlas.

A los chicos del Departamento de Bioquímica, en especial a los de recién ingreso: Pilo y Martín, por todos sus consejos, y a los del 104.

A Marina por haber compartido momentos críticos en el proyecto, parece ser que la libramos.

A Felipe Cruz porque desinteresadamente me ofreció ayuda cuando más lo necesitaba.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Cinasas de proteína como transductores de señalización.....	3
Clasificación de las cinasas de proteína eucarióticas.....	6
i) Grupo de las AGC.....	6
ii) Grupo de las CaMK.....	6
iii) Grupo de las CMGC.....	6
iv) Grupo de las PTK.....	7
v) Grupo de las proteínas receptoras.....	7
2.2. MAP cinasas: componentes específicos durante la señalización en plantas.....	7
a) Conformación de la cascada de MAP cinasas y sus funciones.....	7
i) MAPKKKs.....	8
ii) MAPKKs.....	8
iii) MAPKs.....	8
b) Regulación de las cascadas de MAP cinasas.....	9
i) Interacción por acoplamiento.....	10
ii) Andamiaje.....	10
2.3. Cinasas de proteína involucradas en el reconocimiento de moléculas de señalización producidas por la interacción planta-patógeno.....	11
a) Cinasas membranales de proteína involucradas en el reconocimiento de moléculas de señalización producidas por la interacción planta-patógeno.....	12
i) RLKs involucradas en el reconocimiento específico de raza.....	14
El gen de resistencia Xa21.....	14
ii) RLKs involucradas en el reconocimiento de evocadores derivados de la interacción planta patógeno.....	14
Reconocimiento de evocadores exógenos vía FLS2.....	14
Reconocimiento de evocadores endógenos durante la defensa vegetal ante patógenos: Interacción entre la SR160 y la sistemina.....	14
iii) Otras RLKs involucradas en la interacción planta-patógeno.....	15
b) Cinasas de proteína citosólicas involucradas en el reconocimiento <i>raza-específico</i> de las interacciones planta-patógeno.....	15
El gen de resistencia <i>Pto</i>	15
2.4. Cinasas de proteína que funcionan corriente abajo del reconocimiento de las señales producidas por patógenos.....	15
a) MAPKs en las respuestas de las plantas contra patógenos.....	15
i) MAP cinasas y su asociación con el patrón de defensa basado en la interacción gen por gen.....	17
ii) MAP cinasas y su asociación con el patrón de defensa basado en la acción de evocadores fúngicos y bacterianos.....	17
iii) MAP cinasas y su asociación con la acción del ácido salicílico.....	17
iv) MAP cinasas y su asociación con la HR.....	18
v) MAP cinasas y su participación en la activación de genes de defensa.....	18
b) Cinasas de proteína dependientes de calcio (CDPKs).....	19
2.5. Apoptosis, autofagia, respuesta de hipersensibilidad y compuestos esfingoideos: eventos relacionados con la actividad de cinasas.....	19
a) Características morfológicas de la apoptosis.....	19
b) La autofagia: muerte celular programada que promueve la muerte o sobrevivencia celular en organismos eucariontes.....	21
i) La autofagia como un mecanismo de sobrevivencia en células de mamíferos.....	22
ii) La muerte autofágica programada como un mecanismo alternativo a la apoptosis.....	22
iii) Autofagia: un proceso conservado en plantas.....	23
c) Respuesta de hipersensibilidad como una forma de PCD que responde a patógenos.....	23
d) Esfingolípidos: posibles mediadores de la apoptosis y de la autofagia.....	25
i) Compuestos esfingoideos.....	26
ii) Fumonisina B ₁ : inhibidor de la ruta biosintética de los esfingolípidos.....	27

iii) Los esfingolípidos y su acción como segundos mensajeros.....	29
3. ANTECEDENTES.....	32
1. Efectos de la FB ₁ en elementos de diferente localización subcelular.....	32
a) Pared celular.....	32
b) Membrana celular.....	32
c) Citoplasma.....	33
d) Núcleo.....	34
2. Efectos de los niveles de esfinganina y fitoesfingosina en la actividad de cinasas y niveles de ácido salicílico.....	34
Experimentos con adición de LCBs exógenas.....	34
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPÓTESIS.....	37
6. OBJETIVOS.....	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
7.1. Material biológico.....	38
7.2. Exposición del sistema biológico a la fumonisina B ₁ o esfinganina.....	38
a) Imbibición de embriones de maíz con fumonisina B ₁ o esfinganina.....	38
b) Infiltración de hojas de frijol con agua, Silwet L-77, ácido salicílico, fumonisina B ₁ o esfinganina.....	38
7.3. Extracción de la fracción soluble.....	38
7.4. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	38
7.5. Ensayo en gel para determinar actividad de MAPKs.....	38
7.6. Ensayo en gel para determinar actividad de cinasas de caseína o histona.....	39
7.9. Ensayo en gel para evaluar la autofosforilación de cinasas.....	39
7.10. Ensayo de réplica en Western de las proteínas solubles con el anticuerpo anti-ERK1/2 o anti-fosfo-ERK1/2.....	39
8. RESULTADOS.....	40
8.1. Estandarización del método para detectar la actividad de cinasas de MBP en gel.....	40
8.2. Efecto de la fumonisina B ₁ o esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz.....	41
8.3. Efecto de la concentración de la fumonisina B ₁ o esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz.....	44
8.4. Evaluación de la actividad de las cinasas de MBP de embriones de maíz sobre otros sustratos.....	45
8.5. Reconocimiento de las proteínas solubles de embriones de maíz expuestos a la fumonisina B ₁ o esfinganina por anticuerpos anti-ERK1/2 o anti-phospho-ERK1/2.....	45
8.6. Efecto de la fumonisina B ₁ y la esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol.....	47
8.7. Efecto del ácido salicílico en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol.....	47
8.8. Efecto de la concentración de la fumonisina B ₁ o esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol.....	47
8.9. Evaluación de la actividad de las cinasas de MBP de hojas de frijol por otros sustratos.....	50
8.10. Reconocimiento de las proteínas solubles de hojas de frijol expuestas a la fumonisina B ₁ o esfinganina por anticuerpos anti-ERK1/2 o anti-phospho-ERK1/2.....	50
9. DISCUSIÓN.....	52
9.1. El sistema experimental <i>in planta</i> para estudiar la activación de MAPKs.....	52
9.2. La expresión de la actividad de cinasas de MBP en la germinación requiere de ciertas condiciones fisiológicas.....	53
9.3. La fumonisina B ₁ activa a una MAPK de 45 kDa en embriones de maíz y a una de 48 kDa en hojas de frijol.....	54
9.4. el posible mecanismo de la activación de la MAPK por las bases de cadena larga y su participación en la conformación de una nueva vía de transducción en respuesta a patógenos.....	57
10. CONCLUSIONES.....	60
11. PERSPECTIVAS.....	61
12. BIBLIOGRAFÍA.....	62
APÉNDICE I.....	78
APÉNDICE II.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Inducción en la expresión de RLKs y cambios fenotípicos producidos por sus niveles de expresión en respuesta a estímulos bióticos.....	16
Tabla II. Resumen de las distintas condiciones evaluadas para la estandarización del método del ensayo de fosforilación en gel.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de la biosíntesis de novo de esfingolípidos en plantas que muestra a las enzimas participantes.....	26
Figura 2. Estructuras químicas de la toxina fúngica FB ₁ , de las bases esfingoideas predominantes en plantas: esfinganina y fitoesfingosina y de la ceramida.....	27
Figura 3. Efecto de la SN <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz. Determinación de la actividad según las condiciones de Romeis <i>et al.</i> (1999).....	42
Figura 4. Efecto de la FB ₁ y SN en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz. Introducción de PMSF en el medio de obtención de las fracciones solubles.....	42
Figura 5. Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de embriones expuestos de forma continua a la FB ₁	42
Figura 6. Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma discontinua a la FB ₁ o SN.....	43
Figura 7. Efecto de la concentración de la FB ₁ o SN en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma discontinua.....	44
Figura 8. Actividad de las cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma discontinua a la FB ₁ o SN por otros sustratos de cinasas.....	46
Figura 9. Reconocimiento de proteínas de embriones de maíz expuestos de forma discontinua a la FB ₁ o SN contra anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-fosfo-ERK1/2.....	46
Figura 10. Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol expuestas a la FB ₁ o SN.....	48
Figura 11. Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol expuestas al SA.....	49
Figura 12. Efecto de la concentración de la FB ₁ , SN o SA en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol.....	50
Figura 13. Actividad de las cinasas de MBP de hojas de frijol expuestas a la FB ₁ , SN o SA por otros sustratos de cinasas.....	51
Figura 14. Reconocimiento de proteínas de hojas de frijol expuestas a la FB ₁ , SN o SA contra anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-fosfo-ERK1/2.....	51
Figura 15. Modelo del posible mecanismo de acción de la FB ₁ en embriones de maíz y hojas de frijol.....	59

1. RESUMEN

Las plantas que se defienden exitosamente del ataque de patógenos producen una muerte celular programada (PCD) en una mínima cantidad de células que se localizan en el sitio de penetración del agente invasor (Respuesta de Hipersensibilidad o HR). El objetivo de la HR es delimitar la proliferación del patógeno en el interior de la planta. Dicho evento, si bien presenta características de la apoptosis descrita en células de animales, no es estrictamente igual y se ha postulado que es el resultado de un conjunto de reacciones de defensa entre las que destacan, como las más tempranas, la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de cascadas de MAPKs.

Las cascadas de MAP cinasas están integradas por proteínas de señalización conservadas en las células eucariontes. Su actividad responde a estímulos tanto bióticos como abióticos y a eventos fisiológicos. Las cascadas de MAP cinasas actúan a través de tres elementos, en donde el componente corriente arriba es la MAPKKK y el último elemento corriente abajo, es la MAPK. La MAPKK, un elemento intermedio en la cascada, es considerada como el punto convergente, pues si bien es activada por una MAPKKK, es la que determina la especificidad de la respuesta al asociarse con la MAPK cuya actividad se requiere ante el estímulo.

La activación de ciertas cascadas de MAPKs vegetales se ha asociado con la respuesta de defensa de las plantas durante el ataque por patógenos avirulentos. Las especies vegetales mejor caracterizadas en este contexto son las dicotiledóneas *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. En ambas especies se presenta la activación de dos MAPKs diferentes, que de acuerdo al análisis filogenético son ortólogas (AtMPK3/NtWIPK y AtMPK6/NtSIPK). Esta característica sugiere una relación estructura-función conservada en las cinasas de respuesta al ataque de patógenos en diferentes especies vegetales.

Por otro lado, en animales se ha demostrado que los esfingolípidos, además de tener funciones estructurales muy bien definidas en las membranas celulares, son moléculas bioactivas que participan como mediadores en la transmisión intracelular de señales externas, si bien es muy probable que, al igual que otros lípidos señalizadores, desplieguen su función desde su posición membranal. Específicamente durante la apoptosis, esta función está muy bien descrita para las ceramidas y las bases de cadena larga (LCB), en sus formas libres o fosforiladas. La PCD inducida por estos compuestos esfingoideos se ha asociado con la activación e inhibición de ciertas cinasas de proteína, entre las que destacan elementos de las cascadas de MAPKs.

En plantas también existen evidencias indirectas que sugieren que varias especies de esfingolípidos están implicadas en la respuesta de defensa contra patógenos y con la HR. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si existe una relación entre la activación de MAPKs, los niveles de esfingolípidos y las reacciones de defensa contra patógenos. Este proyecto se planteó objetivo estudiar esta relación en embriones de maíz y hojas de frijol.

Para responder al objetivo se adicionó esfinganina (SN, una LCB) o fumonisina B₁ (FB₁) a los embriones de maíz u hojas de frijol. La FB₁ fue empleada como inhibidor de la ruta biosintética *de novo* de los esfingolípidos, pues produce una acumulación en los niveles endógenos de LCBs libres. En estas condiciones se evaluó la activación de MAPKs a través de su capacidad de fosforilación de la proteína básica de mielina (MBP) en gel.

En ambas especies vegetales, se observó que la adición de la FB₁ o SN activó al menos dos diferentes cinasas que fosforilan selectivamente MBP y no caseína o histona. La sustitución en los ensayos en gel de la MBP, por caseína o histona, es un buen método para la identificación de MAPKs, pues estas proteínas de señalización tienen muy baja afinidad por estos sustratos.

En frijol, la activación se dio a tiempos tan cortos como 5 min presentando otros dos máximos entre 45 y 90 min, mientras que en maíz, la primera activación ocurrió en los primeros 30 min, y posteriormente entre 6 y 24 h. La activación inducida por la SN exógena antecedió, en general, a la producida por la FB₁, sugiriendo que esta diferencia temporal es resultado del lapso que tardó la FB₁ en producir una acumulación endógena de las LCBs.

Dado que todas las MAPKs identificadas en tejidos vegetales, muestran similitud de sus estructuras primarias con las ERK (MAPKs inducidas por señales extracelulares) de animales, se realizó una prueba de reconocimiento con un anticuerpo anti-ERK. Los resultados confirmaron la identidad de las cinasas encontradas en las dos especies como MAPKs.

Por otro lado, las dos cinasas de MBP encontradas en embriones de maíz tienen una masa molecular aparente muy similar a la de dos MAPKs reportadas en hojas de maíz: 45 y 41 kDa. La de 45 kDa fue la que presentó una activación más consistente y correspondió en masa molecular, a una MAPK que responde a frío (ZmMPK5). La masa molecular y el reconocimiento por el anticuerpo anti-ERK, sugieren que la MAPK inducida por FB₁ o SN es la ZmMPK5, la cual es una MAPK que de acuerdo al análisis filogenético es ortóloga de las AtMPK6 y NtSIPK, de *Arabidopsis* y tabaco, respectivamente.

En plantas de frijol no se había reportado la activación de alguna MAPK. Sin embargo, nuestros resultados indican que existen dos cinasas de MBP con masas moleculares de 48 y 44 kDa inducidas por FB₁ o SN. La masa molecular, el reconocimiento por anticuerpos heterólogos y el patrón de fosforilación, sugieren que ambas son MAPKs. En este organismo vegetal, se pudo explorar con más detalle la conservación de la funcionalidad de las MAPKs, pues las MAPKs de frijol que respondieron a FB₁ y SN, resultaron también inducibles por estrés mecánico y ácido salicílico con patrones de temporalidad muy similares a los descritos para la NtSIPK y NtWIPK de *N. tabacum*.

Los resultados indican que las MAPKs que se activan por LCBs en maíz y frijol, son las mismas que las inducidas por patógenos en otras especies vegetales. Este trabajo presenta evidencia de que las MAPKs de plantas pueden activarse por esfingolípidos y se sugiere que la vía de transducción en cuestión está relacionada con la defensa contra patógenos, constituyendo además, una estrategia conservada en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Adicionalmente, los datos obtenidos aportan evidencia experimental sobre uno de los posibles mecanismos a través del cual la FB₁ es capaz de producir HR y otras reacciones de defensa en plantas.

2. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos están expuestos constantemente a cambios en su entorno que las somete a diferentes tipos de estrés abiótico o biótico. Además de la capacidad innata de los organismos de responder a diferentes estímulos, las plantas han desarrollado una organización de mayor complejidad en sus sistemas de percepción, transmisión y respuesta a las señales externas, que se ha postulado es resultado de la inmovilidad relativa que presentan.

La información que las células se encuentran recibiendo continuamente desde el espacio extracelular es procesada y transformada en efectos intracelulares. Las señales externas pueden ser físicas o químicas, pues el espacio extracelular de los organismos multicelulares está constituido de un macroambiente que le provee de nutrimentos y energía, y de un microambiente conformado por células vecinas, mensajes de crecimiento y una matriz que determina el crecimiento celular.

Las señales extracelulares pueden actuar dentro de la célula a través de dos mecanismos diferentes: (1) en el denominado de vía corta, las señales se internalizan en la célula, atravesando la membrana plasmática, para llegar al organelo blanco que regularmente es el núcleo y; (2) en el de vía larga, las señales no son permeables a la membrana plasmática, lo que impide su paso al interior de la célula blanco. Este último mecanismo requiere de la conversión de la señal extracelular a una intracelular a través de un proceso mediado por componentes de la membrana plasmática; en esta vía la señal extracelular es el primer mensajero y una vez convertida en señal intracelular, ésta actúa como segundo mensajero. En el sitio de conversión, los receptores se acoplan con efectores y transductores para formar un complejo que transporta la información a diferentes componentes blanco, como son cinasas de proteína, enzimas metabólicas, receptores intracelulares o vehículos de transporte. Una vez que los componentes de señalización son activados, éstos transmiten la información a factores de transcripción (Hucho y Buchner, 1997).

2.1. CINASAS DE PROTEÍNA COMO TRANSDUCTORES DE SEÑALIZACIÓN

Una de las superfamilias proteicas más grandes que se conocen en la actualidad es la compuesta por las cinasas de proteína. Estas enzimas usan el fosfato γ del ATP (o GTP) para generar dentro de sus estructuras enlaces monoéster entre el grupo fosfato y el grupo hidroxilo de los residuos de Ser y Thr y/o el del grupo fenol del residuo de Tyr (Hanks y Hunter, 1995). El grupo fosfato es luego transferido a proteínas sustrato en los que el anión queda unido covalentemente a residuos específicos.

Las cinasas se han identificado en procariontes y eucariontes, lo que sugiere que son proteínas que provienen de un ancestro común que existió antes de la separación evolutiva de los organismos. Los dominios de cinasa, o también denominados dominios catalíticos, están conformados por 250-300 residuos aproximadamente; cada dominio realiza al menos tres funciones diferentes: (1) la unión y orientación del donador del fosfato (ATP o GTP); (2) la unión y orientación de la proteína o péptido sustrato y, (3) la transferencia del fosfato γ del ATP (o GTP) al residuo con el hidroxilo receptor (Ser/ Thr/ Tyr) de la proteína sustrato (Hanks y Hunter, 1995).

Todas las cinasas, excepto la nucleósido-difosfato cinasa, requieren como sustrato del complejo Mg^{2+} -nucleótido, que facilita la reacción de transferencia del grupo fosfato a la proteína blanco. El Mg^{2+} se coordina generalmente con los grupos fosfato β y γ de los nucleótidos ATP o GTP, aunque en algunos

casos también se puede coordinar con el grupo fosfato α . La esfera de coordinación octaédrica del Mg^{2+} está formada además por dos o cuatro moléculas de agua y se completa con átomos de oxígeno de las cadenas laterales de los residuos de Thr, Ser y Asp/Glu de las proteínas (Matte *et al.*, 1998).

Las cinasas pueden presentar al menos dos conformaciones diferentes: el estado denominado encendido (“on”) ocurre cuando las cinasas alcanzan su actividad máxima y el estado apagado (“off”), cuando su actividad es mínima o basal; su activación es promovida por un cambio conformacional capaz de producir la actividad catalítica máxima. Esta modificación hace a las estructuras de las cinasas muy similares entre sí (Huse y Kuriyan, 2002).

Existen varios parámetros que contribuyen a la transferencia del grupo fosfato, entre ellos se incluyen cambios conformacionales globales y locales provocados por la unión del sustrato, la unión del nucleótido, la orientación y geometría del sustrato, la organización del sitio activo, la coordinación metal-ión y los efectos electrostáticos (Matte *et al.*, 1998). Los cambios globales son producidos por la formación de bisagras o movimientos rotacionales de dos o más dominios en relación con otros que dan como resultado el cierre del sitio activo. En algunos casos, estos cambios estructurales acomodan a las cadenas laterales de la enzima sobre el sustrato de tal forma que lo secuestran y previenen la hidrólisis de los nucleótidos o del sustrato antes de la realización de la catálisis. Los movimientos locales únicamente son producidos cuando un dominio en particular tiene un movimiento muy ligero (Matte *et al.*, 1998).

La fosforilación específica de los residuos de Thr, Ser o Tyr de la cinasa puede ocurrir en varios sitios de la proteína; algunos de éstos se hallan en las regiones N- o C-terminal de la cadena polipeptídica, mismos que se pueden localizar tanto en el exterior del dominio cinasa o en otras subunidades. Sin embargo, la mayoría de las cinasas son fosforiladas sobre un(os) residuo(s) localizado(s) en el centro del dominio cinasa conocido como “segmento de activación”, el cual contiene las regiones conservadas DFG (Asp-Phe-Gly) y APE (Ala-Pro-Glu). El segmento de activación participa directamente en la activación de la enzima cinasa, provocando cambios conformacionales que conducen a la disposición correcta del sitio de unión al sustrato y de los grupos catalíticos, y evitando los bloqueos estéricos que impiden tener acceso a los sustratos (Johnson *et al.*, 1996).

Los dominios de cinasa se dividen en 11 subdominios que se definen como regiones de residuos cuyo plegamiento produce estructuras terciarias muy similares y conservadas, aún cuando las estructuras primarias estén interrumpidas por grandes bloques de residuos diferentes entre los diversos miembros que conforman a esta gran superfamilia. Los residuos que se encuentran dentro de los subdominios VIB, VIII y IX son los más conservados entre los miembros de las diferentes familias de cinasas de proteína. La naturaleza homóloga de los dominios de cinasa conduce a un plegamiento similar de estos segmentos para formar los núcleos tridimensionales en donde se realiza la fosfotransferencia; de esta manera, todas las cinasas comparten un mecanismo común en su actividad catalítica (Hanks y Hunter, 1995).

La mayoría de los dominios de cinasa se pliegan de tal manera que genera dos lóbulos. El lóbulo más pequeño es el N-terminal, el cual incluye los subdominios I-IV; esta estructura participa en el anclaje y orientación del nucleótido; está conformado principalmente de hojas β antiparalelas cuya estructura es única entre las diferentes proteínas que se unen a nucleótidos. El lóbulo más grande es el C-terminal, el cual incluye a los subdominios VIA-XI; esta estructura está formada principalmente por hélices α que participan en la unión del péptido sustrato y en la iniciación de la fosfotransferencia. Los residuos del

subdominio V se encuentran incluidos en los dos lóbulos y en la cadena que los conecta (Hanks y Hunter, 1995).

El subdominio I contiene predominantemente la secuencia consenso: GxGxxGxV; su plegamiento es de hoja β -giro-hoja β que comprende a las hojas β 1 y 2; esta estructura actúa como una bisagra que cubre y ancla a los fosfatos no transferibles del ATP. En este subdominio algunos residuos forman puentes de hidrógeno con los oxígenos del fosfato β y otros contribuyen a crear un ambiente hidrofóbico alrededor del anillo de adenina del ATP (Hanks y Hunter, 1995).

El subdominio II contiene un residuo conservado de Lys, el cual se considera indispensable para alcanzar la actividad catalítica máxima. Esta Lys se encuentra en la tercera hoja β y participa en la orientación y anclaje del ATP al interactuar con los fosfatos α y β . La estructura primaria de este subdominio también contribuye en la formación de un ambiente hidrofóbico alrededor del anillo de adenina (Hanks y Hunter, 1995).

El subdominio III está conformado por una hélice α , la cual contiene, en la mayoría de las cinasas, un residuo de Glu que se localiza en la parte central de la hélice y que estabiliza la interacción entre la Lys conservada del subdominio II y los fosfatos α y β del ATP. El subdominio IV tiene una estructura secundaria en forma de hoja β que corresponde a la hoja cuatro del dominio cinasa, la estructura primaria es la más heterogénea entre las diferentes cinasas, ya que no presenta algún residuo conservado; aparentemente este subdominio no participa en la catálisis o el reconocimiento del sustrato (Hanks y Hunter, 1995).

El subdominio V une los dos lóbulos mediante la subunidad catalítica. Está conformada por la hoja β 5, que se encuentra en el lóbulo pequeño y que es muy hidrofóbica; una hélice α que se localiza en el lóbulo grande y una cadena extensa que conecta a los dos lóbulos. Los residuos de la cadena que conecta a los dos lóbulos forman puentes de hidrógeno con el anillo de adenina o de ribosa, y también contribuyen a la creación del ambiente hidrofóbico alrededor del anillo de adenina (Hanks y Hunter, 1995).

El subdominio VIA se pliega en una gran hélice α que se encuentra en el lóbulo C-terminal. Aparentemente, ninguno de los residuos de este subdominio interactúan directamente con el complejo Mg^{2+} -ATP o con el péptido sustrato. El subdominio VIB se pliega en dos hojas β que corresponden a la 6 y 7, las cuales están separadas por un giro. En este subdominio se encuentran dos residuos conservados: el Asp y la Asn, los cuales están incluidos en el motivo (HRDLKxxN). El giro que conecta a las dos hojas β se ha denominado asa catalítica, ya que el residuo conservado de Asp localizado en el interior de esta estructura, acepta al protón del grupo hidroxilo del sustrato durante el mecanismo de transferencia que ocurre en línea. El residuo conservado de Lys, que en las cinasas de Tyr es sustituido por Arg, facilita la fosfotransferencia al neutralizar la carga negativa del fosfato γ . La cadena lateral de la Asn estabiliza a la asa catalítica, ya que forma puentes de hidrógeno con el carbonilo del Asp y además participa en la quelación del ión Mg^{2+} que se encuentra unido a los fosfatos α y β del ATP (Hanks y Hunter, 1995).

El subdominio VII se pliega en una estructura hoja β -giro-hoja β , que comprende a las hojas 8 y 9. Este subdominio contiene tres residuos conservados en el motivo DFG, los cuales se encuentran dentro del giro y orientan al fosfato γ del ATP para la transferencia. En el subdominio VIII se encuentra el motivo conservado APE. El residuo de Glu interactúa con la Arg conservada del subdominio XI, para estabilizar al lóbulo C-terminal. Aparentemente la función del subdominio VIII es reconocer al péptido sustrato.

Muchas de las cinasas conocidas se activan por la fosforilación de los residuos localizados en el subdominio VIII, en el que los átomos de oxígeno del fosfato forman puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de residuos con carga neta positiva y el grupo hidroxilo del residuo aceptor. Este efecto estabiliza el giro del subdominio VIII en una conformación activa que permite la orientación correcta del péptido sustrato (Hanks y Hunter, 1995).

El dominio IX está conformado por una hélice α , algunos de sus residuos forman puentes de hidrógeno con los residuos del giro catalítico del subdominio anterior para estabilizarlo. El subdominio X es el menos conservado y se desconoce su función. El subdominio XI incluye al C-terminal del dominio cinasa y tiene una Arg conservada. El límite del extremo C-terminal del dominio cinasa no se ha definido, para muchas cinasas de Ser, el motivo consenso H-x-F/W/Y-G/A/V/L/I/M/P/C/F/Y/W se encuentra 9 residuos corriente abajo de la Arg conservada. Para las cinasas de Tyr, un residuo hidrofóbico localizado 10 residuos corriente abajo de la Arg conservada, parece indicar el límite del dominio cinasa (Hanks y Hunter, 1995).

Clasificación de las cinasas eucarióticas

Para facilitar el análisis de esta superfamilia, las cinasas fueron clasificadas de acuerdo a sus propiedades estructurales y funcionales en cinco grupos: (1) el grupo AGC que contiene familias de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (PKA y PKG); (2) el grupo CAMK que contiene tanto a la familia de cinasas dependientes de calcio/calmodulina, como a la familia de cinasas activadas por SNF1/AMP (CaMK); (3) el grupo CMGC, el cual contiene a las familias CDK, MAPK, GSK-3 y CKII; (4) el grupo PTK, que se refiere a las proteínas cinasas de Tyr y (5) el grupo que contiene cinasas sin clasificar aún (Stone y Walker, 1995).

i. Grupo de las AGC

En el grupo AGC se encuentran las cinasas de proteína dependientes de los nucleótidos cíclicos: cAMP (PKA) y cGMP (PKG) y las cinasas dependientes de Calcio-fosfolípidos (PKC). Estas cinasas fosforilan a sus sustratos en los residuos de Ser/Thr que se encuentran localizados cerca de residuos básicos; su actividad es regulada generalmente por segundos mensajeros y en plantas no se han caracterizado miembros de este grupo (Stone y Walker, 1995).

ii. Grupo de las CaMK

En el grupo de las CaMKs se encuentran las cinasas de proteína dependientes de calcio/calmodulina y las cinasas activadas por azúcares no fermentables (SNF1/AMP). La mayoría de estas cinasas se activan por la unión de calcio y calmodulina; su actividad, al igual que las cinasas AGC, se regulan por segundos mensajeros. Las familias más representativas de este grupo son las CDPKs, cuyos miembros contienen dominios similares a la calmodulina y son activados por Ca^{2+} y las cinasas homólogas a SNF1 (cinasa de proteína de levadura que se requiere para la derepresión catabólica del carbono). Ambas subfamilias se han identificado en varias especies vegetales (Stone y Walker, 1995).

iii. Grupo de las CMGC

En el grupo de las CMGCs se encuentran las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las cinasas de la sintetasa de glucógeno (GSK-3) y las cinasas de

caseína II (CKII). La actividad de este grupo de cinasas está regulada por cascadas de fosforilación y los sitios de fosforilación se encuentran comúnmente entre los subdominios VII y VIII del segmento de activación (Wei *et al.*, 1994). Los miembros de esta familia fosforilan a sus sustratos en regiones ricas en Pro y los dominios X y XI son más largos en comparación con las cinasas de otras familias (Hanks y Hunter, 1995).

iv. Grupo de las PTK

Las cinasas PTK son una familia de enzimas reguladoras en células de eucariontes. Esta familia de proteínas es específica de Tyr, por lo que difiere de las proteínas cinasas con doble especificidad. En plantas, no se han identificado miembros de esta familia; sin embargo, no se descarta su existencia (Stone y Walker, 1995).

v. Grupo de las proteínas receptoras

La familia de cinasas receptoras (RPK) son proteínas transmembranales que contienen dominios de cinasa de Ser/Thr localizados en la parte citosólica y dominios con otras funciones en la región extracelular (Morris y Walker, 2003). De acuerdo a su dominio extracelular, las RPKs se pueden unir a carbohidratos, polipéptidos, componentes de la pared celular de microorganismos o esteroides (Shiu y Bleecker, 2001a y 2001b).

2.2. MAP CINASAS: COMPONENTES ESPECÍFICOS EN LA SEÑALIZACIÓN EN PLANTAS

Las cascadas de MAP cinasas son sistemas frecuentes en la transducción de señales de células eucarióticas; su función consiste en transducir estímulos externos percibidos por receptores membranales mediante una serie de reacciones de fosforilación (Ichimura *et al.*, 2002). La intensidad, temporalidad y periodicidad de la activación de las MAP cinasas determinan la especificidad de la respuesta inducida por el estímulo inicial (Hall *et al.*, 2002).

a) Conformación de la cascada de MAP cinasas y sus funciones

Las cascadas de MAP cinasas se conforman de tres elementos: la MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAP cinasa), la MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) y la MAPK (MAP cinasa); la secuencia indica el orden en el que los componentes se van activando consecutivamente mediante reacciones de fosforilación (Fig. 1 del Apéndice I). Las MAPKKKs no se asocian directamente con el receptor membranal, para lograr su activación se requiere de la participación de otros componentes intermediarios cuyas actividades dependen del receptor, ejemplos de ellos son la cinasa de proteína C (PKC) y las proteínas de unión a GTP (proteínas-G) monoméricas y/o heterotriméricas (Hall *et al.*, 2002), si bien estos elementos transductores pueden activarse por comunicación cruzada (cross-talking). Los intermediarios que activan a las MAPKKKs fosforilan residuos específicos localizados en el sitio catalítico de la MAP cinasa sustrato. El sitio de fosforilación puede estar comprendido dentro de los dominios homólogos de pleckstrina (secuencias con estructuras típicas que facilitan la interacción proteína-proteína o proteína-lípido), secuencias ricas en Pro involucradas en la unión a dominios SH3, motivos de dedos de Zinc, cierres de Leu o secuencias de unión a proteínas G (Garrington y Johnson, 1999). Las MAPKKKs activadas reconocen y fosforilan los residuos de Ser/Thr catalíticos de las MAPKKs, que se encuentran conservados entre los subdominios VII y VIII de su estructura primaria (Alessi *et al.*, 1994; Zheng y Guan, 1994). Las MAPKKs finalmente activan al último miembro de la cascada fosforilando los residuos de Tyr y Thr

localizados en la secuencia característica TxY, donde x representa a cualquier residuo (Meskiene y Hirt, 2000).

í. MAPKKs

Las estructuras primarias de las MAPKKs son las menos conservadas entre sí (Wrzaczek y Hirt, 2001), su heterogeneidad estructural y la de sus dominios reguladores le confieren a las cascadas de MAP cinasas características peculiares, como la flexibilidad para responder a una gran variedad de estímulos (Meskiene y Hirt, 2000) y la capacidad de activar múltiples cascadas simultáneamente (Fanger *et al.*, 1997; Gustin *et al.*, 1998).

En células de mamíferos y levaduras, las MAPKKs se clasifican en cuatro grupos: MEKK/STE11, RAF, MLK y MOS (Widmann *et al.*, 1999); mientras que en plantas se reconocen al menos dos grupos: el A o PMEKKs, cuya estructura primaria es homóloga a las MEKK/STE11, y el B y C o PRAF cuyos componentes son similares a las RAF cinasas (Ichimura *et al.*, 2002).

íí. MAPKs

Las MAPKs son proteínas con doble especificidad, pues además de ser activadas por una MAPKK corriente arriba, activan a una MAPK corriente abajo. Estas proteínas poseen una alta especificidad por su sustrato, pues únicamente se ha identificado a las MAPKs como sus sistemas blanco (Seger *et al.*, 1992). Por su activación exclusiva en una o dos cascadas distintas de MAP cinasas (Robinson y Cobb, 1997) se consideran puntos de convergencia que integran diferentes señales en una misma ruta (Meskiene y Hirt, 2000).

En plantas sólo se han identificado 21 MAPKs cuyas estructuras primarias difieren a las de mamíferos; su secuencia consenso en el sitio de fosforilación es S/TxxxxS/T, mientras que en mamíferos es S/TxxxS/T. Con respecto a las regiones N-terminal de las MAPKs vegetales, éstas son muy similares a las de mamíferos, pues ambas presentan un sitio común denominado dominio D (de anclaje o Docking), que se une a las MAPKs. El dominio D consiste en una región definida por la secuencia [KR][K/R][K/R]x(1-5)[L/I]xL/I (en donde x representa a cualquier residuo y, R y K representan los residuos básicos indispensables para la interacción con las MAPKs. Los residuos básicos a su vez están flanqueados en un extremo por los residuos hidrofóbicos L o I) (Ichimura *et al.*, 2002).

ííí. MAPKs

La activación de las MAPKs requiere de la fosforilación de los residuos de Thr y Tyr localizados entre los subdominios VII y VIII del núcleo catalítico (Bögge *et al.*, 2000); su estructura primaria, además de incluir esta región catalítica, posee un dominio CD (de anclaje común o Common Docking) cuya secuencia permite su unión con las MAPKs activadoras, fosfatasa o sustratos; siendo todas éstas, interacciones excluyentes entre sí. Las interacciones electrostáticas que se establecen entre los residuos con carga de los sitios D y CD son fundamentales, pues el dominio CD contiene en su secuencia [LY][LHY]Dxx[DE]xx[DE]EPxC, residuos ácidos (D y E) e hidrofóbicos (L, H y Y), que interactúan con los residuos básicos (K y R) e hidrofóbicos (LxLxL) de las MAPKs (Ichimura *et al.*, 2002). La mayoría de las MAPKs tienen regiones N- y C- terminales cortas, ya que la mayor parte de su longitud lo ocupa el dominio catalítico que contiene aproximadamente 300 residuos (Kültz, 1998); por esta razón, las MAP cinasas se caracterizan por tener una estructura primaria muy conservada. Los residuos que corresponden a los N- y

C- terminales difieren más que los del núcleo catalítico; sin embargo, existen algunas MAP cinasas cuyas secuencias de aminoácidos se conservan en regiones externas al dominio de cinasa, lo que sugiere una función biológica importante en la especificidad del sustrato o bien, en el establecimiento de interacciones con otras proteínas (Bögge *et al.*, 2000).

En general, a las MAPKs vegetales se les conoce con el nombre PERK (Plant ERK), pues presentan una homología muy conservada con respecto a las MAPKs de la subfamilia ERK de mamíferos. Las PERKs se clasifican en dos subtipos: las que contienen un motivo TEY en el sitio de fosforilación y las que contienen un motivo TDY. Las MAPKs vegetales con estructura primaria descrita no presentan homología con el motivo TGY, presente en algunas MAPKs de levaduras y mamíferos, o con el TPY presente en algunas MAPKs de mamíferos (Ichimura *et al.*, 2002).

En la actualidad no existe una clasificación consenso para las MAPKs vegetales. Por esta razón, en el año 2002, los investigadores más reconocidos en el estudio de las MAPKs vegetales publicaron un artículo para proponer una nomenclatura que facilitara la agrupación de MAPKs con características similares. En el artículo se incluyeron cuatro grupos de MAPKs: A, B, C y D. Los grupos A, B y C comprenden MAPKs con una secuencia TEY en el sitio catalítico, y el grupo D a las que tienen una secuencia TDY. A su vez, las MAPKs de los grupos A y B, difieren del resto de los grupos, por la alta homología que presentan sus motivos CD localizados en el C-terminal. Las MAPKs del grupo D no contienen este motivo CD (Ichimura *et al.*, 2002).

En células de mamíferos y levaduras se ha demostrado que la activación de las MAPKs en el citoplasma determina su localización posterior, pues una vez fosforilada puede trasladarse hacia el núcleo para activar factores de transcripción, o bien, a otros sitios del citoplasma para fosforilar de manera específica a ciertas enzimas, tales como cinasas de proteína, fosfatasas, lipasas o componentes citoesqueléticos (Bögge *et al.*, 2000). En plantas el escenario es diferente, pues sólo se ha relacionado la fosforilación de MAPKs con la actividad de enzimas metabólicas, cinasas y factores de transcripción sin que se halla demostrado una interacción física que indiquen son sustratos directos (Suzuki, 2002). En la literatura, sólo existe un reporte en el que se identificó al primer sustrato *in vivo* de las MAPKs vegetales cuya identidad lo define como una proteína catalítica que interviene en la síntesis del etileno, su fosforilación incrementa la estabilidad de la enzima (Liu y Zhang, 2004).

Una MAPK activada fosforila proteínas que contengan al motivo fosfo-receptor Ser/Thr-Pro y otras regiones denominadas sitios de acoplamiento. Las reacciones de fosforilación mediada por MAPKs pueden ocurrir tanto en el citoplasma como en el núcleo para modificar la actividad de varias proteínas sustrato. Ejemplo de ello son la cinasa ribosomal S6 (RSK), la cinasa que interactúa con MAPKs (MNK), la cinasa de proteína activada por MAPK (MAPKAP) y las familias de cinasas de proteína activadas por mitógenos y estrés ambiental, muchas de las cuales regulan la expresión de genes a través de la fosforilación de histonas y proteínas reguladoras de la transcripción (Yang *et al.*, 2003).

b) Regulación de las cascadas de MAP cinasas

Los principales mecanismos de regulación en la transducción de señales mediada por MAP cinasas son la interacción por acoplamiento y por andamiaje. El primer mecanismo se refiere a la interacción establecida entre las regiones conservadas y específicas de las MAPKs y otras moléculas, que incluyen a sus MAPKKs activadoras, sus sustratos o bien sus inactivadores (fosfatasas), para formar complejos

específicos; mientras que el segundo mecanismo de regulación requiere de la participación de una tercera molécula que interactúe con las enzimas y los sustratos de las MAPKs (Tanoue y Nishida, 2003).

í. Interacción por acoplamiento

En la interacción por acoplamiento la formación del complejo específico es diferente para cada interacción enzima-sustrato, pues depende del centro activo de la reacción catalítica. La especificidad de esta asociación sugiere que el acoplamiento es un regulador de las vías de señalización mediadas por MAP cinasas (Tanoue y Nishida, 2003).

Aparentemente todas las proteínas que interactúan con MAPKs contienen en su estructura primaria el dominio de anclaje (dominio D). El sitio de anclaje está constituido por un grupo de residuos con carga positiva flanqueado en sus dos extremos por residuos hidrofóbicos; y está localizado fuera del dominio catalítico. La composición del dominio D promueve el establecimiento de las interacciones electrostáticas que se establecen entre el dominio D y el dominio CD de las MAPKs (Tanoue y Nishida, 2003).

Los factores de transcripción, además de contener al dominio D, presentan otros motivos que interactúan con MAPKs; uno de ellos está conformado por dos Phe separadas por un residuo cualquiera y seguida de una Pro (FxFP); se localiza en el C-terminal y sólo es eficiente cuando el sitio de fosforilación de la MAPK se localiza cinco residuos corriente arriba del motivo CD (Jacobs *et al.*, 1999; Fantz *et al.*, 2001; Galanis *et al.*, 2001). Otro motivo hidrofóbico que funciona como sitio de unión a MAPKs es el LxLxxxF (Seideel y Graves, 2002); sin embargo, su estudio ha sido menos extenso que el anterior, pues hasta recientemente fue descubierto.

Las fosfatasas son reguladores de la actividad de MAPKs que también contienen en su estructura primaria el dominio D. Estas proteínas defosforilan los residuos de Thr y/o Tyr de la secuencia TxY de las MAPKs (Meskiene y Hirt, 2000) o los residuos Ser/Thr de las MAPKKs.

íí. Andamiaje

En *Saccharomyces cerevisiae*, la MAPKKK Ste11 participa en al menos tres de las cinco cascadas de MAP cinasas identificadas en este organismo (Blumer y Johnson, 1994; Jonak *et al.*, 1994; Herskowitz, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Una de las formas en que las células regulan la actividad de las MAPKKKs y evitan un entrecruzamiento de diferentes cascadas de señalización con efectos diferentes a los requeridos por la célula, es el uso de proteínas de andamiaje que separa a las diferentes cascadas en compartimentos físicos. Las proteínas de andamiaje se unen simultáneamente a los diversos elementos de una misma vía que responden específicamente a una señal, para formar complejos proteicos de señalización (Yashar *et al.*, 1995; Garrington y Johnson, 1999; Posas *et al.*, 1998). En la levadura se han identificado dos proteínas de andamiaje, la Ste5p y la Pbs2p; ambas son capaces de secuestrar a la Ste11 con los miembros de la cascada activada por una señal específica: Por ejemplo, la Ste5p se une simultáneamente a los tres miembros de la cascada de MAP cinasas requeridas para el apareamiento y también enriquece la actividad de la MAPK correspondiente, la Fus3p (Elion, 1998). La unión de la MAPKK, Ste7p, a Ste5p, limita la activación cruzada con otras cascadas de señalización, sugiriendo que el andamiaje juega un papel importante en la especificidad de las señales (Yashar *et al.*, 1995). Por otro lado, la Pbs2p, es la MAPKK de la ruta de señalización activada por hiperosmolaridad, y se une tanto a Ste11p como a Hog1p (la MAPKKK y la MAPK, respectivamente, de esta cascada). Estos datos sugieren que los componentes de

una cascada de señalización están la mayor parte del tiempo asociados físicamente uno al otro (Somsen *et al.*, 2002) y que el andamiaje no requiere estrictamente de una tercera molécula.

De igual forma, en células de mamíferos se ha evidenciado la presencia de proteínas de andamiaje que posiblemente enriquecen la eficiencia de la transducción, amplificando la propagación de la señal (Elion, 1998; 2000; Levchenko *et al.*, 2000; Kholodenko *et al.*, 2000) y protegiendo a los miembros de las cascadas de MAP cinasas de la inactivación mediada por fosfatasa (Choi *et al.*, 1999).

2.3 CINASAS DE PROTEÍNA INVOLUCRADAS EN EL RECONOCIMIENTO DE MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN PRODUCIDAS POR LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas, como la mayoría de los organismos animales, rara vez presentan una enfermedad. En plantas, cuando se presentan síntomas de enfermedad, éstos se localizan generalmente en pequeñas regiones del tejido vegetal, pues las plantas han desarrollado a través de la evolución una serie de defensas constitutivas e inducidas cuya función es prevenir o evitar el ataque de bacterias, hongos, virus, invertebrados y otras especies vegetales (Buchanan *et al.*, 2000).

En las interacciones planta-patógeno ambos organismos desarrollan diversos mecanismos de defensa y de ataque, respectivamente. Dependiendo de la intensidad, temporalidad y mecanismos estratégicos que cada organismo ejerza, se establece la enfermedad, o bien, la resistencia en la planta.

Las células vegetales que establecen interacciones con patógenos activan una serie de mecanismos de defensa dirigidos a evitar el crecimiento y reproducción del agente invasor. Las principales reacciones que genera la planta son la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el incremento en el flujo de Ca^{2+} , la activación de cascadas de MAP cinasas y de genes de defensa y la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas como las fitoalexinas, o con capacidad de reforzar la estructura de la pared celular, como la calosa o la lignina. Cuando la activación de estas respuestas es suficiente para evitar el crecimiento y reproducción del patógeno, en el sitio de penetración se produce la respuesta de hipersensibilidad (HR), cuyo fenotipo característico es la muerte celular localizada en la región de invasión. Esta respuesta ocurre en la mayoría de las interacciones incompatibles que se establece entre un patógeno avirulento y una planta resistente. De forma contraria, cuando la activación de las respuestas de defensa no logran detener el crecimiento y propagación del patógeno en el sitio de infección, se producen síntomas de enfermedad que se reflejan en la fisiología de la planta y que, en algunos casos, derivan en necrosis del tejido. Este tipo de interacción es de tipo compatible y se establece entre un patógeno virulento y una planta susceptible (Dangl *et al.*, 1996).

En las interacciones incompatibles la planta puede percibir la presencia del invasor mediante dos mecanismos diferentes:

1) *Modelo gen-por-gen*: Este modelo propone la interacción física entre un producto codificado por un gen de avirulencia (Avr) contenido en el genoma del patógeno y un producto codificado por un gen de resistencia (R) del genoma de la planta. Su asociación es altamente específica y complementaria, tanto a nivel de la variedad de la planta, como de la cepa del patógeno. El resultado de esta interacción es una HR en la planta resistente (Dangl y Jones, 2001).

2) *Reconocimiento de evocadores*: Ocurre cuando la planta detecta compuestos de naturaleza química muy diversa producidos por la planta o bien, secretados por el invasor. Ejemplo de ellos son algunas proteínas, oligosacáridos, glicoproteínas y lípidos, los cuales se conocen como evocadores endógenos, si son producidos por la planta, o exógenos, si son secretados por los patógenos (Hammond-Kosack y

Jones, 1996; Baker *et al.*, 1997; Martin, 1999; Dangl y Jones, 2001). Aunque este tipo de interacción no es específica a nivel de subespecies, entre plantas y patógenos, es muy eficiente, pues se asocia a la resistencia y es muy generalizada.

Por el contrario, las plantas que establecen una interacción de tipo compatible con el patógeno, no obedecen al modelo gen-por-gen; sin embargo, aunque pueden llegar a reconocer la presencia del invasor por la presencia de evocadores endógenos o exógenos, las respuestas de defensa resultantes no son lo suficientemente intensas y persistentes para detener el crecimiento y reproducción del patógeno.

a) Cinasas membranales de proteína involucradas en el reconocimiento de moléculas de señalización producidas en la interacción planta-patógeno

Un mecanismo fundamental por el cual las células eucarióticas se comunican es la secreción de ligandos que se unen a receptores localizados en la membrana celular y cuya estructura puede contener un dominio de cinasa. Este tipo de receptores conocidos como cinasas de proteína receptoras (RPKs) se han identificado en células animales, donde su estudio ha permitido clasificarlas en al menos dos familias: (1) las cinasas que se auto-fosforilan en residuos de Tyr (RTKs) y (2) las cinasas que se autofosforilan en los residuos de Ser/Thr (STKRs) (Braun y Walker, 1996).

Las RPKs se definen como proteínas que contienen dentro de su estructura primaria un dominio extracelular, un sólo dominio transmembranal y un dominio intracelular de cinasa; se activan mediante una homodimerización inducida por la unión del ligando al receptor que acerca los dos dominios de cinasa y promueve la transfosforilación (Becraft, 2002). Dependiendo de la composición de su dominio extracelular, las RPKs se pueden unir a moléculas de naturaleza química diferente tales como carbohidratos, polipéptidos, componentes de la pared celular de microorganismos o esteroides.

En 1990, Walker y Zhang identificaron a la primera cinasa vegetal cuya estructura primaria comparte una alta similitud al receptor del factor de crecimiento epidermal de humanos (26% identidad, 55% similitud) (Walker y Zhang, 1990) y demostraron que las células vegetales, al igual que el resto de los organismos eucariontes, perciben señales o estímulos extracelulares a nivel de la membrana plasmática y no únicamente a través de los plasmodesmatas, como se supuso por mucho tiempo (Diévert y Clark, 2004). En varias especies de plantas, se han identificado diferentes genes homólogos a las RPKs; cuyos productos reciben el término cinasas de proteína similares a receptores (RLKs) pues no se ha descrito su función como molécula receptora (Becraft, 2002).

Con base en la descripción completa del genoma de *Arabidopsis*, se ha estimado que éste codifica más de 600 RLKs, a diferencia de *Caenorhabditis elegans* que contiene 43 (40 RTKs y 3 STKRs), *Drosophila melanogaster* 25 (20 RTKs y 5 STKRs) y *Homo sapiens* 70 (58 RTKs y 12 STKRs). La otra particularidad de las RLKs vegetales es la prevalencia de STKRs *versus* RTKs, pues todas las RLKs que se conocen en plantas contienen un dominio cinasa de Ser/Thr, a excepción de dos RLKs que tienen doble especificidad: la PRK-1 (receptor con actividad de cinasa del polen), que se autofosforila sobre los residuos de Ser y Tyr y la SERK (cinasa somática en la embriogénesis similar al receptor), que fosforila Ser, Thr y Tyr (Becraft, 2002).

De acuerdo al análisis filogenético a nivel de la estructura primaria del dominio cinasa, las RLKs se dividen en al menos 41 subfamilias (Diévert y Clark, 2003), aún cuando comparten un 40% de identidad entre todas ellas. Otro tipo de clasificación de las RLKs considera la secuencia de residuos en el dominio extracelular; con este criterio, la división incluye al menos 21 clases diferentes, siendo las más

representativas con respecto a su cantidad de miembros: la clase que contiene repeticiones ricas en Leu (LRRs), la del dominio-S, y la clase de proteínas que contienen repeticiones similares al factor de crecimiento epidermal (EGF) (Walker, 1994).

El motivo LRR se encuentra en proteínas que varían en función y localización subcelular. Sin embargo, se ha postulado que participan en las interacciones proteína-proteína. El motivo LRR está compuesto de 20-23 residuos con la secuencia consenso LxxLxxLxLxxNxLT/SGxIPxxLGx. Las repeticiones pueden ser interrumpidas por inserciones de residuos dentro o entre la secuencia consenso. La especificidad de las interacciones proteína-proteína puede ser determinada por la pequeña variación en el núcleo consenso. Fuera del núcleo, las LRR-RLKs muestran poca similitud en el dominio extracelular (Diévert y Clark, 2003).

Las RLKs que contienen la secuencia LRR, representan el grupo más grande de RLKs en el genoma de *Arabidopsis thaliana* con 216 miembros. Se ha sugerido que la función de las LRRs es la interacción con otras proteínas. Las RLKs con dominio LRR se han clasificado en 13 subfamilias (LRR-RLKs I a XIII) de acuerdo a su organización en el dominio extracelular (Shiu y Bleeker, 2001a y 2001b). Todas las RLKs con dominio LRR contienen en su secuencia primaria un dominio de cinasa con una especificidad hacia residuos de Ser/Thr. Aparentemente las LRR-RLKs participan en diversos procesos biológicos como crecimiento y desarrollo de las células vegetales. En células de animales los receptores que contienen LRRs participan en el desarrollo de neuronas, en la formación, diferenciación y crecimiento de las gónadas y glándulas tiroideas y en respuestas antifúngicas. Estos receptores contienen las LRR en la porción extracelular de la proteína y pueden contener un(os) dominio(s) transmembranal(es) o estar ancladas a la membrana plasmática mediante la unión con un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Una diferencia característica entre las proteínas que contienen LRRs en células animales y vegetales es la carencia de un dominio de cinasa en los receptores con LRRs de animales, de manera que para transducir las señales corriente abajo se requiere de la activación de co-receptores, mientras que la similitud entre los receptores con LRRs de animales y plantas consiste en los motivos LRRs que se encuentran en la parte extracelular, lo que sugiere que comparten los mismos mecanismos de unión a sus ligandos (Diévert y Clark, 2004).

La segunda clase más grande de RLKs contiene en sus ectodominios motivos de lectina (LecRLK), los cuales se unen a monosacáridos y a lectinas. Existen más de 40 miembros que contienen un motivo B-lectina en el ectodominio de los receptores S con actividad de cinasa (SRKs). El dominio extracelular S está involucrado en la auto-incompatibilidad reproductiva y su función está controlada por el locus S, el cual fue por primera vez identificado en plantas de *Brassica*. Las SRKs se encuentran en la membrana plasmática, su dominio cinasa tiene una especificidad de Ser/Thr y su ectodominio es muy similar a la glicoproteína del locus S (SLG), la cual es una proteína que se acumula en la pared celular en las células papilares y cuya función es el reconocimiento de ligandos (Stein *et al.*, 1996; Becraft, 2002).

Las cinasas asociadas a la pared celular (WAKs) están en la membrana plasmática y tienen un dominio cinasa de Ser/Thr localizado en el citoplasma (He *et al.*, 1996). Las WAKs están unidas a pectinas y en algunas ocasiones se ha identificado la unión entre las WAKs y las pectinas fosforiladas (He *et al.*, 1996; Wagner y Kohorn, 2001; Anderson *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la unión de la pectina a la WAK activa a la cinasa, sin embargo no hay evidencias de éste efecto y no se ha identificado algún sustrato para las WAKs (Kohorn, 2001). En *Arabidopsis* se han identificado 5 WAKs (WAK1-5), las cuales difieren entre sí únicamente en el dominio extracelular; pues tanto el número de repeticiones del factor de crecimiento epidermal (EGF), como el dominio de cinasa citoplasmático son muy similares (He *et al.* 1996; Kohorn *et al.*, 1996; He *et al.*, 1999). Las repeticiones de EGF contienen 6 residuos de Cys espaciados por otros

residuos que forman tres puentes de disulfuro intramoleculares, lo que le proporciona a la proteína un plegamiento muy particular (Davis *et al.*, 1987). En todos los ejemplos conocidos, los dominios de EGFs participan en interacciones proteína-proteína y en algunos casos presentan una secuencia sustrato para la adición de residuos de fucosa en enlaces O, esta modificación es la que tiene una función reguladora en la actividad de varios receptores localizados en la membrana celular (Moloney *et al.*, 2000).

í. RLKs involucradas en el reconocimiento específico de raza

➤ El gen de resistencia *Xa21*

La expresión del gen *Xa21* contenido en el genoma de *Oryza sativa* le proporciona a la planta resistencia contra diferentes razas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. El gen *Xa21* codifica una RLK cuyo dominio extracelular contiene LRR, un dominio transmembranal y un dominio cinasa de tipo Ser/Thr. El gen *Xa21* se encuentra en un *locus* denominado *Xa21*, que al menos contiene 8 diferentes genes, todos ellos relacionados con la resistencia de la planta ante la bacteria. La eliminación de este locus por herramientas moleculares y la infección con la bacteria, le produce a la planta una susceptibilidad que genera la muerte en su totalidad (Song *et al.*, 1995). En este sistema no se ha identificado al producto del gen de avirulencia que está interactuando con la RLK.

íí. RLKs involucradas en el reconocimiento de evocadores derivados de la interacción planta-patógeno

➤ Reconocimiento de evocadores exógenos vía FLS2

La movilidad de las bacterias depende del flagelo, el cual está compuesto de profilamentos formados de varias unidades de flagelina. La mayoría de la flagelina se ensambla en el flagelo; sin embargo, existe una pequeña cantidad que no se incorpora correctamente en la estructura, lo que provoca su fácil desprendimiento y acumulación alrededor de la bacteria. Las células de *Drosophila* y de mamíferos reconocen a las moléculas de flagelina por medio de un receptor cuyo dominio extracelular LRR es muy similar a las RLKs de plantas e inducen respuestas de defensa contra las bacterias. En plantas sucede algo similar, pues las células en suspensión de *Lycopersicon* y *Arabidopsis* inducen una explosión oxidativa, deposición de calosa, producción de etileno, activación de MAPKs e inducción de los genes de defensa: *PR1*, *PR5*, *PAL1* y *GST1*, como respuesta a la exposición de las células a la flg22, la cual es un péptido sintético que incluye la región N-terminal de la flagelina y que está altamente conservada en diferentes especies de bacterias. En *Arabidopsis* el producto del gen *FLS2* es una proteína receptora con actividad de cinasa compuesta de un dominio extracelular con repeticiones ricas en Leu (LRR), un sólo dominio transmembranal y un dominio intracelular de cinasa del tipo Ser/Thr. Se ha propuesto que el dominio extracelular de la proteína FLS2 es un componente del receptor que reconoce a la flagelina y a la flg22 (Gómez- Gómez y Boller, 2002).

➤ Reconocimiento de evocadores endógenos durante la defensa vegetal ante patógenos: Interacción entre la SR160 y la sistemina

La sistemina es un péptido que induce respuestas de defensa cuando las plantas son atacadas por insectos. El péptido induce un incremento en los niveles de inhibidores de proteasas y la expresión de genes de la polifenol oxidasa. En jitomate, la sistemina interactúa con la SR160, la cual es una proteína de tipo RLK, cuyo gen muestra una alta homología con el gen de *Arabidopsis Insensible a Brassinoesteroides* (*BRI1*), particularmente en el dominio de cinasa. Ambas proteínas contienen un dominio extracelular con

LRRs, las cuales tienen unas regiones denominadas “islas” cuya función propuesta es la unión del ligando. Con estas evidencias se ha sugerido que una sola RLK (BRI1/SR160) es capaz de unirse a varios ligandos en sitios de unión diferentes para producir efectos específicos al estímulo inicial (Morris y Walter, 2003).

iii. Otras RLKs involucradas en la interacción planta-patógeno

En la literatura se encuentran con frecuencia reportes que sugieren la participación de RLKs en la señalización de las plantas cuando éstas son atacadas por patógenos, si bien la mayoría de las investigaciones se han realizado únicamente a nivel de expresión.

En la Tabla I se resumen varios reportes que asocian la expresión de RLKs con el reconocimiento y defensa de las plantas ante el ataque de patógenos.

b) Cinasas de proteína citosólicas involucradas en el reconocimiento *raza-específico* de las interacciones planta-patógeno

En la literatura se encuentra únicamente reportada la participación de una cinasa de proteína citosólica cuya función es reconocer de forma específica la presencia de una molécula generada por el patógeno invasor. La interacción obedece al modelo gen-por-gen y ha sido el sistema de reconocimiento Avr más estudiado y caracterizado.

✦ El gen de resistencia *Pto*

El gen de resistencia *Pto* fue descubierto en 1970 en plantas de *Lycopersicon pimpinellifolium*; codifica una proteína de 321 aminoácidos que contiene un dominio cinasa de tipo Ser/Thr. La proteína *Pto* carece de dominios LRR y del dominio transmembranal, lo que sugiere que se trata de una proteína citosólica; tiene un sitio de miristilación en el N-terminal, que se ha propuesto sirve para dirigirse a la membrana plasmática. El producto del gen *Pto* le confiere a la planta resistencia a cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomate, las cuales expresan a su respectivo gen de avirulencia *avrPto* (Pedley y Martin, 2003). Entre las respuestas de defensa que producen las plantas que contienen al gen *Pto* se encuentran: la expresión de genes de defensa, la generación de EROs y la HR.

La interacción *Pto*/*AvrPto* se ha demostrado en plantas silvestres de jitomate y en *Nicotiana benthamiana* que expresa al transgen *Pto*. Ambas plantas desarrollan una HR en presencia del producto *AvrPto* y el desarrollo de las reacciones de defensa depende de la activación de su dominio cinasa. La interacción física *Pto*/*AvrPto* entre ambos productos involucrados en la interacción ya está establecida; sin embargo, aún no se ha logrado dilucidar cuáles componentes corriente abajo están siendo activados por esta proteína de resistencia (Pedley y Martin, 2003).

2.4 CINASAS DE PROTEÍNA QUE FUNCIONAN CORRIENTE ABAJO DEL RECONOCIMIENTO DE LAS SEÑALES PRODUCIDAS POR PATÓGENOS

a) MAPKs en las respuestas de las plantas contra patógenos

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa que les permiten responder de forma rápida y eficaz a los cambios que se presentan en su entorno. Si la inducción de estas respuestas es lo suficientemente intensa y persistente, la planta se adapta a las modificaciones de su ambiente. Uno de los mecanismos que la planta emplea con frecuencia para activar la defensa, es la cascada de MAP cinasas, la cual se caracteriza por responder a una gran variedad de estímulos de tipo

biótico y abiótico, a hormonas y a procesos de división y desarrollo celular (Tabla I del Apéndice I) (Hall *et al.*, 2002).

Tabla I. Inducción en la expresión de RLKs y cambios fenotípicos producidos por sus niveles de expresión en respuesta a estímulos bióticos

Especie/ Gen	Característica del dominio extracelular	Estímulo	Efecto	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>				
<i>PR5K</i>	Es muy similar a las proteínas acídicas PR5, las cuales se acumulan en el espacio extracelular en respuesta al ataque por patógenos	No se ha evaluado algún estímulo; sin embargo se sugiere que por su similitud a la PR5, participa en la defensa de las plantas	-	Wang X <i>et al.</i> , 1996
<i>WAK1</i>	Dominio EGF	Ácido jasmónico (JA), SA, etileno, <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Alternaria brassicicola</i>	Incremento en los niveles de Mrna	He <i>et al.</i> , 1998; Verica y He, 2002
<i>RLK-3</i>	25 aminoácidos que están organizados como C-x(8)-C-x-x-C-x(11)-C	Estrés oxidativo SA <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>	Incremento en los niveles de mRNA	Czernic <i>et al.</i> , 1999
<i>RKC1</i>	Contiene al motivo C-x(8)-C-x(2)-C	SA	Incremento en los niveles de mRNA	Ohtake <i>et al.</i> , 2000
<i>PERK1</i>	Dominio rico en Pro	Heridas	Incremento en los niveles de mRNA	Silva y Goring, 2002
<i>CRK5</i>	Repeticiones ricas en cisterna	<i>Pseudomonas syringae</i>	Su expresión constitutiva produce resistencia a la bacteria	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>CRK4</i> , <i>CRK9</i> , <i>CRK20</i>	Repeticiones ricas en Cys	SA <i>Pseudomonas syringae</i>	Incremento en los niveles de mRNA y desarrollo de HR	Chen <i>et al.</i> , 2004
<i>Nicotiana tabacum</i>				
<i>CHRK1</i>	Similar a la quitinasa clase V. No tiene actividad de quitinasa	<i>Phytophthora parasitica</i> Virus del mosaico de tabaco (TMV)	Incremento en los niveles de mRNA	Kim <i>et al.</i> , 2000
<i>Oryza sativa</i>				
<i>WRK1</i>	Dominio LRR	Herida HR	Incremento en los niveles de mRNA	Ito <i>et al.</i> , 2002
<i>Brassica oleracea</i>				
<i>SFR-2</i>	Dominio-S	Herida SA <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Escherichia coli</i>	Incremento en los niveles de mRNA	Pastuglia <i>et al.</i> , 1997
<i>PERK1</i>	Dominio rico en Pro	Heridas	Incremento en los niveles de mRNA	Silva y Goring, 2002
<i>Malus domestica</i> x				
<i>LRPKm1</i>	Dominio LRR	SA <i>Venturia inaequalis</i>	Incremento en los niveles de mRNA	Komjanc <i>et al.</i> , 1999

í. MAP cinasas y su asociación con el patrón de defensa basado en la interacción gen por gen

Recientemente se ha identificado una gran cantidad de genes de resistencia (*R*) en plantas; no obstante, poco se sabe de la transducción de señales que se genera después del reconocimiento R/Avr. El único reporte que evidencia la activación de MAP cinasas seguida del reconocimiento entre los productos de los gen *R* y *Avr*, fue publicado en 1999 por el grupo de investigadores dirigidos por Romeis, quienes demostraron que el producto de la expresión del transgen del resistencia *Cf-9* de *Lycopersicon peruvianum* en *Nicotiana tabacum*, reconoce a su producto complementario de avirulencia (*Avr9*) para activar posteriormente a las MAPKs: SIPK (cinasa de proteína inducida por ácido salicílico) y WIPK (cinasa de proteína inducida por herida) (Tabla II del Apéndice I). Estos resultados sugirieron además, que la activación de cascadas de MAP cinasas seguida del reconocimiento R/Avr es un mecanismo general en plantas (Romeis *et al.*, 1999).

íí. MAP cinasas y su asociación con el patrón de defensa basado en la acción de evocadores fúngicos y bacterianos

En la literatura se ha reportado la activación de algunos componentes de cascadas de MAP cinasas en plantas estimuladas con diferentes evocadores fúngicos y bacterianos, así como con algunas infecciones (Tablas II y III del Apéndice I). Estas evidencias indican que las cascadas de MAP cinasas son fundamentales en la señalización que conduce a la activación de las respuestas de defensa (Cardinale *et al.*, 2000) y sugieren además que las cascadas amplifican las señales con el objetivo de incrementar la inducción de la resistencia.

ííí. MAP cinasas y su asociación con la acción del ácido salicílico

De manera simultánea al estudio de la activación de MAP cinasas por evocadores también se ha evaluado su activación por otras moléculas de señalización implicadas en la defensa de la planta ante patógenos (Tabla I del Apéndice I), las cuales incluyen al ácido salicílico (SA), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico (NO), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA). De estas moléculas el más estudiado ha sido el SA, ya que en las interacciones planta-patógeno de tipo incompatible: a) los niveles endógenos de SA se incrementan; b) el SA induce la expresión de diversos genes relacionados con la defensa y, c) probablemente el SA es la molécula de la que depende el establecimiento y mantenimiento de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR), la cual protege a todos los tejidos de la planta (Shah, 2003).

En al menos tres especies vegetales, se ha identificado al SA como inductor de la activación de MAPKs. Sin embargo sólo en dos de las especies (*Glycine max* y *Nicotiana tabacum*), el SA activa a las MAPKs que también son inducidas por diferentes evocadores o infecciones con patógenos. Estos resultados propusieron al SA como una señal activadora de las cascadas de MAP cinasas durante la defensa de la planta ante patógenos. Fueron Lebrun-García y colaboradores quienes demostraron en el 2002 (Lebrun-García *et al.*, 2002), que la activación de la SIPK de *N. tabacum* inducida por criptogeína, era independiente del SA. Sin embargo, no se descarta una asociación indirecta entre ambos estímulos, ya que la acidificación del citosol y/o los eventos subsecuentes relacionados a ésta, podrían estar actuando como señales secundarias que activan cascadas de MAP cinasas de forma similar a lo demostrado en células animales (Busa y Nuccitelli, 1984; Frelin *et al.*, 1988).

iv. MAP cinasas y su asociación con la HR

La HR es un mecanismo de defensa relacionado con la actividad de MAP cinasas. Este mecanismo se ha observado durante la mayoría de interacciones que involucran una resistencia específica de raza y en varios casos de resistencia no hospedera (Dangl *et al.*, 1996; He, 1996). La inducción de la muerte celular después del reconocimiento del patógeno invasor resulta en la formación de una región de células muertas en y alrededor del sitio de infección, su establecimiento requiere del metabolismo activo de la planta y depende de la maquinaria de transcripción y traducción del hospedero (Yang *et al.*, 1993; He *et al.*, 1994). Se ha planteado que la HR resulta: a) de la activación de un programa de muerte celular intrínseco que es codificado dentro del genoma de la planta (Yang *et al.*, 1993; He *et al.*, 1994), y b) de la activación de una vía de señalización. La HR se considera como un tipo de muerte celular programada (Greenberg *et al.*, 1994; Greenberg, 1997; Jones y Dangl, 1996) y comparte algunas características bioquímicas y morfológicas con la apoptosis (Mittler y Lam, 1995; Mittler *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1996; Ryerson y Heath, 1996).

La asociación entre la activación de MAP cinasas y la HR se sustenta en varios reportes de la literatura que relacionan la activación prolongada de MAPKs (del orden de horas) con la manifestación de la HR (Tablas II y III del Apéndice I). El papel supuesto de estas enzimas en la HR podría ser muy similar al reportado en células animales, donde las subfamilias SAPK/JNK y p38 participan en la apoptosis inducida por estrés (Meskiene y Hirt, 2000).

v. MAP cinasas y su participación en la activación de genes de defensa

La activación de genes de defensa ha sido un tema de gran interés en el estudio de las respuestas de las plantas ante patógenos. Los genes activados en respuesta a agentes invasores se clasifican utilizando inhibidores de síntesis de proteínas en: eventos transcripcionales inmediatos, tempranos y tardíos. Los transcritos inmediatos y tempranos incluyen a los factores de transcripción WRKY y los genes relacionados a patógenos (PR), respectivamente. Los factores de transcripción WRKY activan la expresión de genes que contienen dentro de su promotor a la caja-W, la cual es el elemento *cis* responsable de inducir la transcripción de varios genes de defensa correspondientes a glucanasas, quitinasas, osmotinas, lipooxigenasas y proteínas relacionadas con la SAR (Kim y Zhang, 2004).

En plantas, no existen evidencias sobre una fosforilación de factores de transcripción mediada directamente por MAPKs y que conduzca a la activación transcripcional de genes de defensa. Sin embargo, la inhibición o activación de MAP cinasas conduce a la modificación correspondiente de la expresión del gen *WRKY*. El efecto ha sido estudiado en las cascadas de señalización conformadas en *Nicotiana tabacum*, por el módulo de NtMEK2 y SIPK/WIPK (MAPKK y MAPK, respectivamente), en *Nicotiana benthamiana*, la integrada por MEK1 y NTF6 (MAPKK y MAPK, respectivamente) y en *Arabidopsis thaliana*, por MEKK1, MKK4/MKK5 y MPK3/MPK6 (MAPKKK, MAPKK y MAPK respectivamente). Las cascadas de MAP cinasas que inducen la transcripción del factor WRKY son activadas por el virus del mosaico del tabaco, en las dos especies de *Nicotiana* y por el péptido flg-22, en *Arabidopsis thaliana* (Asai *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Kim y Zhang, 2004).

Otras evidencias que refuerzan la hipótesis de una asociación directa entre las MAPKs y los factores de transcripción se fundamenta en dos reportes que demuestran el transporte del citosol hacia el núcleo de MAPKs activadas (Cheong *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que durante las

respuestas de defensa, se requiere de cambios dinámicos que transporten y acumulen MAPKs dentro del núcleo, pues en ese compartimento posiblemente se encuentran algunos de los sustratos de MAPKs, incluyendo factores de transcripción.

b) Cinasas de proteína dependientes de calcio (CDPKs)

Las plantas, como organismos expuestos constantemente a cambios en su ambiente, han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten sobrevivir. Una de las primeras respuestas celulares que la planta realiza durante el estrés, es la modificación en los niveles citosólicos de Ca^{2+} . Las cinasas de proteína dependientes de calcio (CDPKs) perciben este incremento y se activan para producir eventos corriente abajo que respondan al estímulo que inició el cambio en la concentración del ión (Harmon *et al.*, 2000).

Las CDPKs son cinasas de proteína con especificidad de tipo Ser/Thr, cuyo dominio cinasa se localiza en la región central del N-terminal. Las CDPKs no se han identificado en células de levaduras y animales; el genoma de *Arabidopsis* contiene 34 miembros que pertenecen a esta familia de cinasas, lo que sugiere una función y vía de señalización particular para cada isoenzima (Romeis *et al.*, 2001).

Las CDPKs participan en la señalización de las plantas cuando éstas son expuestas a diferentes tipos de estrés abióticos y bióticos. Ejemplo de ello es el incremento en los niveles de transcrito de la CDPK en plantas de *Arabidopsis* expuestas a temperaturas extremas y a estrés osmótico e hídrico (Urao *et al.*, 1994; Tähtiharju *et al.*, 1997) y en plantas de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana* expuestas a evocadores y a heridas mecánicas (Romeis *et al.*, 2001).

2.5. APOPTOSIS, AUTOFAGIA, RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD Y COMPUESTOS ESFINGOIDEOS: EVENTOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD DE CINASAS

a) Características morfológicas de la apoptosis

Uno de los mecanismos mediante el cual los organismos multicelulares alcanzan y mantienen su homeostasis es la autodestrucción de células que ya no se necesitan o están dañadas. Este evento, conocido como muerte celular programada (PCD), se debe a la activación de una maquinaria de muerte regulada genéticamente. A diferencia de la PCD, la necrosis es comúnmente definida como la muerte celular que resulta de la exposición a compuestos altamente tóxicos, estrés intenso por calor o frío, o daños traumáticos que causan a la célula un daño inmediato en la membrana u organelos celulares. Además, otra característica de la necrosis es que no requiere de la participación organizada de la célula que está muriendo (Gilchrist, 1998).

El estudio de la PCD comenzó en 1972, con la publicación de un artículo que introdujo la palabra apoptosis y describió las características fundamentales del evento (Kerr *et al.*, 1972). El término apoptosis se deriva del griego *apo* (a distancia, constantemente) y *ptosis* (caer), que originalmente fue usado para describir las causas por las que se caen los pétalos de las flores o las hojas de los árboles. El reconocimiento de la importancia de la apoptosis no fue inmediato y tardó cerca de dos décadas en serlo. Una de las primeras dificultades en detectar indicadores morfológicos de la PCD en células que están muriendo, o en aquellas que se están programando para morir, es que el proceso está localizado generalmente en pocas células y no está sincronizado. Dada la velocidad de la PCD (minutos a horas), la observación de varios pasos del evento está muy limitada por la incapacidad de predecir cuáles células están destinadas a realizar PCD y cuáles comenzarán. Por esta razón, en plantas se ha estudiado la PCD

en tejidos en los cuales el proceso es continuo, semisincronizado y ocurre en un número suficiente de células, como son las células de la aleurona y las de raíces (Gilchrist, 1998).

La apoptosis en animales comienza con una disminución del tamaño celular, pérdida de contacto celular en tejidos organizados y condensación de la cromatina. Después hay una fragmentación del núcleo y posteriormente de la célula entera, formándose cuerpos apoptóticos (fragmentos celulares que contienen organelos y que están delimitados por membrana plasmática), que son fagocitados por las células adyacentes y degradados en minutos u horas. Se ha sugerido que la función de los cuerpos apoptóticos es proteger a las células vecinas del daño que puede ser causado por la fuga de contenidos tóxicos de la célula que está muriendo. La fragmentación ordenada del ADN nuclear ocurre en sitios internucleosomales y es catalizada por una endonucleasa que genera fragmentos en múltiplos de 180 pb (Gilchrist, 1998).

Entre los componentes que participan en el inicio y la ejecución de la apoptosis en animales destacan: receptores de la membrana plasmática, proteínas intracelulares que se unen a los dominios de muerte del receptor, segundos mensajeros incluyendo al inositol trifosfato y ceramidas, flujos de Ca^{2+} , EROs, factores de regulación del ciclo celular (ciclinas y las cinasas cdk) y las proteínas que actúan como supresoras (ej. Bcl2) o activadoras (ej. Bax) de la muerte celular. La mayoría de las PCDs en animales comparten dos características: la interrupción del ciclo celular en la fase G1 y la activación de una cascada de proteasas específicas de aspartato, llamadas caspasas, que contienen en su estructura primaria una Cys catalítica. Algunas de las caspasas conducen a la apoptosis al hidrolizar proteínas que mantienen la integridad celular [ej, poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), laminas, gelsolina, etc]. Particularmente, las caspasas hidrolizan a la proteína inhibidora de la ADNasa activada por caspasas (CAD), de manera que la CAD activada es la responsable de fragmentar el ADN internucleosomal. La activación de estas proteasas es un indicador de la apoptosis (Gilchrist, 1998).

Debido al gran interés de descubrir en plantas un fenómeno similar a la apoptosis, en los años recientes se han analizado plantas que presentan una forma de PCD. Algunas características son similares a la apoptosis de animales entre las que se encuentran:

- Condensación de la cromatina, citoplasma y núcleo (McCabe *et al.*, 1997).
- Liberación del citocromo c de la mitocondria hacia el citosol (Balk *et al.*, 1999; Stein y Hansen, 1999; Sun *et al.*, 1999). En animales, se ha demostrado que la liberación de algunos factores de la mitocondria (citocromo c, AIF) activan la apoptosis.
- Actividades similares a las caspasas. Las caspasas de animales se caracterizan por tener un sitio catalítico altamente conservado y una afinidad hacia péptidos que contengan secuencias DEVD o YVAD, entre otras. En plantas se han medido las actividades de DEVDasa e YVADasa, cuyas inhibiciones tienen efectos fisiológicos sobre la HR (del Pozo y Lam, 1998).
- Proteólisis de la PARP. En animales, la PARP es una de las proteínas que es hidrolizada por la caspasa-3. Se ha postulado que la PARP participa en la regulación de la reparación del ADN. Aún no se ha establecido la función de la PARP durante la PCD; sin embargo, se ha propuesto que la hidrólisis de la proteína previene la falta de ATP y NAD^+ y con ello inhibe la necrosis (Herceg y Wang, 1999). En plantas se ha detectado la proteólisis de una proteína de 116 kDa que reacciona con un anticuerpo PARP de ratón; además, se ha encontrado la activación e inhibición de la PCD por efecto del uso de inhibidores de PARP y la sobreexpresión de la proteína, respectivamente (Sun *et al.*, 1999).

- Fragmentación del núcleo y del ADN (Callard *et al.*, 1996; Ryerson y Heath, 1996; Wang H *et al.*, 1996; Wang M *et al.*, 1996; Katsuhara, 1997; Koukalova *et al.*, 1997; Orzaéz y Granell, 1997a y 1997b; Young *et al.*, 1997; Danon y Gallois, 1998; Yen y Yang, 1998; Fath *et al.*, 1999; Navarre y Wolpert, 1999; Stein y Hansen, 1999; Wang *et al.*, 1999).
- Pérdida de la asimetría de la membrana celular debido a la translocalización de la fosfatidilserina del plano interior al exterior de la membrana celular (O'Brien *et al.*, 1997).

La definición de apoptosis además de comprender estas características, incluye la fragmentación de la célula y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. En plantas ambos criterios no se han descrito, de manera que el término apoptosis no es estrictamente aplicado a la PCD de plantas; se recomienda que para hacer referencia a los cambios morfológicos de la apoptosis que presentan las plantas, es preferible emplear la frase *similar a la apoptosis* (Danon *et al.*, 2000).

b) La autofagia: proceso catabólico conservado en organismos eucariontes.

Los dos principales tipos de muerte celular programada que ocurren en células de animales son la apoptosis y la autofagia. Estos tipos de PCD se diferencian por la morfología que presentan las células que están en proceso de muerte y por el principal organelo que está involucrado (van Doorn y Woltering, 2005).

La autofagia es una palabra griega que significa “ingerirse a sí mismo”. La autofagia es un mecanismo fisiológico que degrada a las proteínas celulares y en algunas ocasiones a los organelos, cuando éstos se encuentran en exceso o bien, están dañados. La autofagia puede ser inducida por diferentes factores de estrés, que incluyen daño celular, carencia de nutrientes y ataque de patógenos (Seay *et al.*, 2006).

La autofagia se divide en tres tipos: la microautofagia, en donde los componentes citosólicos son tragados por los lisosomas; la autofagia mediada por chaperonas, en el que se usa el transporte de las proteínas para internalizar a los componentes celulares en el lisosoma; y la macroautofagia, en donde las proteínas y los organelos son secuestrados en vesículas de doble membrana (conocidas como autofagosomas) que se fusionan con los lisosomas o vacuolas, dependiendo del organismo, para formar a los autofagolisosomas, en donde termina la degradación. En plantas, existe otro tipo de autofagia nombrado megaautofagia, en donde se permeabiliza o rompe el lisosoma o el tonoplasto y se liberan las hidrolasas vacuolares que degradan los contenidos celulares (van Doorn y Woltering, 2005).

En este apartado únicamente nos referiremos a las características de la macroautofagia, que en términos generales denominaremos como autofagia, pues únicamente se ha involucrado a la macroautofagia en la inducción de muerte celular bajo ciertas condiciones (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

En levaduras, el estudio de diferentes mutágenos ha permitido la identificación y caracterización de los genes *AuTophagy (ATG)* que se requieren para la formación del autofagosoma y para la propia actividad autofágica. Las proteínas *Atg* se agrupan en cinco diferentes grupos funcionales: i) una cascada de cinasas importante para la iniciación del transporte vacuolar de la autofagia (CVT), ii) un complejo proteico que se requiere para el secuestro de la aminopeptidasa durante el transporte CVT, iii) una cascada de señalización lipídica para la nucleación de la vesícula, iv) la conjugación de dos vías de proteínas similares a las ubiquitininas que son importantes para la expansión de la vesícula, y v) una cascada de reciclaje para el desensamblaje de los complejos proteicos *Atg* de los autofagosomas maduros (Seay *et al.*, 2006).

En mamíferos, la macroautofagia se regula por dos cinasas de 3-fosfoinositol (PI3K) diferentes: las PI3K Clase III/VPS34 se asocia con la beclina 1, y juntas estas proteínas activan a la autofagia; y la PI3K

clase I que inhibe la autofagia, presumiblemente al activar a la cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK1) y a la proteína cinasa B (PKB/Akt). PDK1 y PKB son activadas cuando se encuentran unidas a fosfatidilinositol 3, 4,5-trifosfato, el cual es un producto de la PI3K clase I (Patel *et al.*, 2006). PDK1 interactúa directamente con PKB y la fosforila. Tanto PDK1 como la PKB/Akt regulan la actividad de mTOR (blanco de rapamicina). Aún no está claro, como la activación de mTOR inhibe la autofagia, pero el mecanismo puede involucrar la fosforilación de Atg13, la cual forma parte de un complejo proteico junto con la Atg1, una cinasa de Ser/Thr. La PI3K clase III promueve la nucleación de vesículas autofágicas. La expansión de vesículas autofágicas es mediada por dos sistemas de conjugación similares a las ubiquitinas: 1) la ruta atg12, que incluye a Atg12, Atg7, Atg10 y Atg5 y 2) la ruta atg8, en la que participan Atg8, Atg7, Atg3 y Atg4 (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

i) La autofagia como un mecanismo de sobrevivencia en células de mamíferos

Un descubrimiento que propuso a la autofagia como un mecanismo de pro-sobrevivencia fue la interacción entre la beclina 1 y la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo que sugiere un entrecruzamiento entre las dos vías más conocidas de muerte celular programada, si bien no queda claro si Bcl-2 afecta a la autofagia o cómo la autofagia afecta a la familia de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas. En la actualidad, existen dos hipótesis opuestas, una de ellas propone que la autofagia asiste a la muerte celular y la otra que la autofagia protege a la célula de la muerte. Sin embargo, ambas hipótesis pueden ser correctas, dependiendo del tipo celular, el estímulo y el estado de desarrollo de la célula (Seay *et al.*, 2006).

Algunos reportes recientes apoyan la hipótesis de que la autofagia juega un papel importante en la sobrevivencia celular durante la PCD. Se ha establecido que la autofagia promueve la sobrevivencia de las células durante la falta de nutrientes, pues incide en las capacidades de degradar y reciclar nutrientes. La autofagia también puede promover la sobrevivencia celular indirectamente al retardar o prevenir la apoptosis. En *Caenorhabditis elegans*, cuando se silencia la expresión de *BECLINA 1*, las células producen apoptosis de manera ectópica por una vía dependiente de CED-3/caspasa, sugiriendo que la beclina 1, que funciona en la autofagia, también se requiere para prevenir la apoptosis ectópica. Estos eventos son también muy similares en células de mamíferos y hongos, lo que implica que es un mecanismo de sobrevivencia conservado (Seay *et al.*, 2006).

ii) La muerte autofágica programada como un proceso alternativo a la apoptosis

Las células de fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en Bax/Bak no producen apoptosis en presencia de estímulos apoptóticos. Sin embargo, estas células presentan una pérdida en la capacidad de formar colonias y la membrana plasmática se rompe. En las células Bax/Bak^{-/-}, la muerte celular no apoptótica puede ser inhibida al suprimir la formación de autofagosomas. Estos resultados indican que al inhibirse la apoptosis, la autofagia es capaz de sustituir a la apoptosis como un mecanismo alternativo para inducir muerte celular (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

La muerte autofágica de los fibroblastos embrionarios deficientes en Bax/Bak requiere de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. Sin embargo, se desconoce si el mismo mecanismo se requiere para otras células. En estas células, la Bcl-2 y Bcl-xL tienen la capacidad de unirse a la beclina 1 o Atg6, de manera que las dos proteínas anti-apoptóticas pueden incidir en la formación de los autofagosomas (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

El grupo de Lenardo (Yu *et al.*, 2004) demostró que la muerte celular autofágica de las células L929 es dependiente de JNK; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cuál la JNK y la maquinaria de la autofagia están relacionados. JNK juega un papel muy importante en la muerte autofágica de los fibroblastos embrionicos de ratón deficientes en Bax/Bak pero no participa en la autofagia que promueve la sobrevivencia celular (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

En algunas formas de PCD se destruye un número masivo de células, de manera que los fagocitos pueden ser insuficientes para remover los cuerpos apoptóticos. Se ha propuesto, que en este escenario, la autofagia puede disminuir el trabajo de los fagocitos. La inhibición de la apoptosis es un evento crítico en la formación de tumores. Sin embargo, la eliminación de células carcinogénicas también puede ser mediada por la autofagia. Se ha sugerido que la inhibición de la autofagia, incrementa la proliferación celular (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

iii) Autofagia: un proceso conservado en plantas

En el genoma de Arabidopsis se han identificado 36 genes con homología a los genes *ATG* de levaduras. Algunos genes *ATG* de las plantas no se requieren para la autofagia de otros organismos eucariontes superiores (Seay *et al.*, 2006).

De forma similar a otros eucariontes superiores, Arabidopsis tiene al menos un homólogo de la mayoría de los genes *ATG* de levaduras, entre ellos a un homólogo de *ATG13*, gen que se ha perdido en humanos, *Drosophila* y *C. elegans*. En levaduras, se ha sugerido que Atg13 tiene un papel importante en la iniciación de la autofagia a través de su asociación/disociación con Atg6. Algunos eucariontes superiores, incluyendo humanos han mantenido la capacidad de formar autofagosomas y regular la autofagia en ausencia de Atg13, lo que sugiere que Atg13 no se requiere para la autofagia, o bien, que una proteína no relacionada estructuralmente, retiene la función de Atg13 en estos organismos eucariontes (Seay *et al.*, 2006).

Algunos genes *ATG* de Arabidopsis son incapaces de complementar delecciones en levaduras, pero se ha demostrado que algunos genes similares a *ATG* de mamíferos son funcionalmente equivalentes a sus contrapartes en levaduras y que son necesarios para la autofagia, aún cuando no son capaces de complementar a las mutantes de levadura (Seay *et al.*, 2006).

c) Respuesta de hipersensibilidad como una forma de PCD que responde a patógenos

La muerte celular y la enfermedad en plantas están relacionadas de alguna forma, pues la muerte celular es tanto un síntoma de susceptibilidad, como de resistencia ante patógenos. En el caso de la HR, la muerte celular (fenotipo característico) protege a la planta de la propagación del invasor y se produce únicamente en interacciones incompatibles donde las plantas resisten el ataque de patógenos avirulentos. De igual forma, la muerte celular es una característica de los síntomas de enfermedad durante las interacciones compatibles, en la que los patógenos que crecen y se reproducen en el sitio de infección son virulentos. Sin embargo, la muerte celular de plantas que establecen interacciones compatibles es una característica tardía en el curso de la enfermedad. Algunos estudios basados en las características morfológicas asociadas con la muerte celular, sugieren que al menos algunos de los pasos de la autofagia coinciden en la HR (Dangl *et al.*, 1996).

Un aspecto que resulta interesante para nuestro trabajo, es la regulación de la expresión de los genes *ATG* en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos. El análisis de microarreglos, indica que varios genes *ATG* de Arabidopsis son inducidos después de la infección con *Pseudomonas syringae*,

sugiriendo que la autofagia puede estar involucrada en las respuestas de inmunidad innata (Seay *et al.*, 2006).

La PCD mejor estudiada en plantas es la producida en la HR. La HR-PCD debe ser un proceso altamente regulado, ya que de otra manera, el proceso no controlado causaría daños a las células adyacentes no infectadas. Adicionalmente, a diferencia de las células animales que producen PCD, las células vegetales no son removidas por fagocitosis, por lo cual las células sanas deben ser protegidas de los detritos tóxicos surgidos de las células que están muriendo (Patel *et al.*, 2006).

En plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con el TMV, se ha demostrado que la beclina 1 y los productos de los genes de la autofagia *PI3K* clase III, *ATG3* y *ATG7* se requieren para limitar la HR al sitio de infección, lo que indica que la autofagia tiene una función de sobrevivencia al prevenir la muerte de las células sanas no infectadas por el virus (Liu *et al.*, 2005). Aparentemente, la autofagia no ocurre únicamente en las infecciones virales, ya que diferentes evocadores de HR derivados de hongos y bacterias causan muerte celular no controlada en las plantas en las que se silencia la expresión de algunos componentes de la autofagia.

En células de mamíferos hay indicios de que la activación de la muerte celular en respuesta al bloqueo de la autofagia es un proceso conservado. En células de humanos, por ejemplo, el bloqueo de la autofagia inducida por ayuno o químicos produce apoptosis. Esto implica que la autofagia suprime la apoptosis tanto en plantas como en humanos (Greenberg, 2005).

Liu *et al.* (2005) demostraron además, que los autofagosomas se forman en la región adyacente a la zona de infección y en el tejido sistémico. Sus resultados implican que existe una señal pro-muerte que se mueve de la lesión HR a tejidos no infectados y sugieren que el mecanismo de autofagia altera la inducción, movimiento y/o reconocimiento de la señal pro-PCD. Otra alternativa es que la autofagia *per se* podría estar facilitando la degradación de la señal pro-PCD en las células adyacentes al sitio en el que se están generando estas señales (Patel *et al.*, 2006). Los candidatos de la señal pro-muerte que se han propuesto son las EROs, NO, una proteína aún no identificada, o una señal de naturaleza lipídica (Patel *et al.*, 2006).

Otra proteína implicada en el proceso de la autofagia que está implicada en las respuestas de defensa es la enzima de procesamiento vacuolar (VPE). La VPE de plantas presenta una estructura primaria y una actividad similar a la caspasa-1 de humanos. VPE rompe enlaces peptídicos en el lado C-terminal de residuos de Asn expuestos en los precursores de las proproteínas, para generar las respectivas formas maduras. Sin embargo, VPE es capaz también de reconocer a un Asp cuando es parte de la secuencia YVAD, la cual se encuentra en los sustratos de la caspasa-1 (Nishimura *et al.*, 2005).

El procesamiento de VPE ocurre por el transporte de su precursor a la vacuola, lo cual sugiere que es similar al procesamiento de la carboxipeptidasa Y (CPY) de levaduras. El tráfico de CPY del citoplasma a la vacuola (CVT) usa varios componentes de la autofagia, incluyendo a *ATG6/beclina 1*. En plantas no se ha descrito una vía CVT; sin embargo, cuando se silencia la expresión de *BECLINA 1*, la célula presenta altos niveles de VPE. Este resultado sugiere que la beclina 1 facilita la degradación autofágica de VPE, o bien, que facilita el procesamiento y maduración de VPE (Patet *et al.*, 2006).

Al silenciar la expresión del gen *VPE*, la planta de tabaco infectada con TMV no presenta HR y no hay colapso vacuolar ni fragmentación de DNA. Además, la actividad deficiente de VPE, producida por el uso de inhibidores de la caspasa-1, previene la aparición de las características típicas de la muerte celular

inducida por el TMV. Tanto el silenciamiento en la expresión del gen VPE como el uso de inhibidores de la caspasa-1, no afectan la síntesis de proteínas relacionadas a patógenos. Esto significa que la HR involucra dos procesos independientes, la PCD y la inducción de genes de defensa y que VPE regula sólo la PCD (Hatsugai *et al.*, 2004).

El genoma de *Arabidopsis* contiene 4 genes *VPE*. Las VPEs se han clasificado en dos familias: las VPEs de tipo vegetativo (α VPE y γ VPE) y las VPEs de tipo semillas (β VPE y δ VPE). Las VPEs que pertenecen al tipo vegetativo se inducen durante la senescencia, herida e infección con patógenos (Kuroyanagi *et al.*, 2005).

Las plantas de *Arabidopsis* en las que se silencia la expresión de los cuatro genes *VPE*, no son capaces de producir muerte celular en respuesta a la FB₁ y sus vacuolas y membranas vacuolares permanecen intactas, contrario a lo que ocurre en plantas silvestres infiltradas con la misma micotoxina. Estos resultados indican que la deficiencia de VPE suprime la ruta de muerte celular al prevenir el colapso de las vacuolas. Además, la muerte celular inducida por la FB₁ está acompañada por la fragmentación de DNA (Asai *et al.*, 2000). Este resultado sugiere que la actividad de VPE está involucrada en la fragmentación de DNA vía fragmentación vacuolar (Kuroyanagi *et al.*, 2005).

d) Esfingolípidos: posibles mediadores de la apoptosis y de la autofagia

La relación entre la apoptosis y la señalización producida por ceramida se ha descrito en células de animales y plantas expuestas a micotoxinas análogas a la esfinganina (SAMs), que incluyen a las fumonisinas y las toxinas AAL sintetizadas por los hongos *Fusarium verticillioides* y *Alternaria alternata*, respectivamente.

La muerte celular inducida por la FB₁ y la toxina AAL en células de plantas ocurre en concentraciones (10-50 μ M) y tiempos (12-24 h) similares al que se presenta en células animales. Las células vegetales tratadas con estas micotoxinas presentan además, algunos indicadores de la apoptosis como la fragmentación de ADN y la activación de endonucleasas dependientes de Ca²⁺. De igual forma, ambas toxinas interrumpen el metabolismo de los esfingolípidos de células vegetales y animales al inhibir la actividad de la esfinganina *N*-acil transferasa (SAT), la cual es una enzima que cataliza la acilación de la esfinganina para producir ceramida en la ruta biosintética *de novo* de los esfingolípidos complejos. Estos datos en conjunto, sugieren que la muerte celular similar a la apoptótica inducida por las SAMs en animales y plantas, es causada por la alteración del metabolismo de la ceramida (Gilchrist, 1998).

Recientemente, se ha establecido en células de animales, que la adición de ceramida (Daido *et al.*, 2004) o dihidroceramida (Bedia *et al.*, 2005) exógena puede inducir la autofagia y además, que la autofagia inducida por agentes como el tamoxifeno, es inducida a través de los esfingolípidos endógenos (Scarlatti *et al.*, 2004). El tamoxifeno es un compuesto que incrementa los niveles de ceramida endógena al inhibir la actividad de la glucosil-ceramida sintasa.

Tanto la adición de ceramida C2, como de tamoxifeno incrementan los niveles de beclina 1, un regulador de la autofagia (Scarlatti *et al.*, 2004). El silenciamiento de la expresión del gen *BECLINA 1* hace a la célula menos sensible a la ceramida, posiblemente como consecuencia de una mayor interacción de PI3K con reguladores corriente arriba de la autofagia (Zeng *et al.*, 2006). La ceramida es un activador bien conocido de la PP2A, la cual inhibe la activación de AKT. Tanto la PI3K clase I como la AKT son supresores de la autofagia.

Actualmente se desconoce si la ceramida o dihidroceramida inducen otros blancos a los descritos ampliamente en apoptosis, tengan un efecto estructural como la inducción de cambios en la curvatura de la membrana, o bien un metabolito derivado de la ceramida o dihidroceramida (como por ejemplo, sus formas fosforiladas) jueguen un papel en la fagocitosis (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 2005).

Otro metabolito esfingoideo también relacionado con la autofagia es la esfingosina 1P, pues la sobreexpresión de la esfingosina 1 cinasa promueve la autofagia. La autofagia producida por los altos niveles de producción de la S1P, no es inhibida por la FB₁, lo que indica que el mecanismo no es dependiente de la acilación de las LCBs. A diferencia de la autofagia inducida por la ceramida, la autofagia mediada por la SphK1 no se ha asociado con un incremento en la expresión de beclina 1, ni con la inhibición de Akt o la PI3K clase I. Un resultado importante de este estudio, es que la supresión de la expresión de SphK1 o de la actividad por el uso de un inhibidor, produce una autofagia letal (Lavieau *et al.*, 2006).

Uno de los modelos que se han propuesto acerca de la relación esfingolípidos-autofagia, presume que altos niveles de ceramida o dihidroceramida inducen la formación de los autofagosomas. Después de la formación de los autofagosomas, las enzimas lisosomales comienzan a activarse, y entre ellas se encuentra la ceramidasa. Esta última enzima degrada a la ceramida para formar SN y S, y estos compuestos son liberados del lisosoma hacia el citosol, en donde son reacilados o fosforilados. La fosforilación de la SN y S remueve a estos compuestos que son altamente citotóxicos y activan blancos anti-apoptóticos que son controlados por LCB fosforiladas. En ausencia de la suficiente actividad de la SphK, las LCBs comienzan a acumularse, desestabilizando a los autofagolisosomas, y causando la liberación de las catepsinas y otros factores citotóxicos, produciendo de esta manera la letalidad (Zhen *et al.*, 2006)

ii. Compuestos esfingoideos

Los esfingolípidos son compuestos lipídicos que se encuentran distribuidos en membranas celulares, lipoproteínas (particularmente de baja densidad) y otras estructuras lipídicas de las células eucarióticas (Merrill *et al.*, 2001). Entre sus funciones destacan el mantenimiento de la estructura membranal, especialmente en microdominios (Riboni *et al.*, 1997; Iwabuchi *et al.*, 1998), la modulación de la actividad de receptores membranales (Iwabuchi *et al.*, 1998), la unión en sitios específicos de proteínas extracelulares, microorganismos, toxinas y virus (Karlsson, 1986; Fantini *et al.*, 1997). En años recientes se ha postulado a los esfingolípidos como moléculas altamente bioactivas que funcionan como precursores de segundos mensajeros que median las respuestas de citocinas y factores de crecimiento controlando así, la diferenciación (Hannun y Obeid, 1995; Fantini *et al.*, 1997; Merrill *et al.*, 1997; Kolesnick y Krönke, 1998; Spiegel, 1999).

Los precursores de los esfingolípidos son las bases de cadena larga (LCBs) cuyas estructuras constan de largas cadenas alquílicas de longitud variable (14-22 átomos de carbono) y de un arreglo 2-amino-1,3-dihidroxicanos o -quenos. Las bases pueden presentar hasta dos dobles enlaces y algunas de ellas contienen grupos hidroxilo en las posiciones 4 ó 6 y grupos metilo en las posiciones ω -1 (iso), ω -2(anti-iso) (Karlsson, 1970). La principal LCB en células animales es la esfingosina (S), mientras que en plantas predominan las insaturadas, como son las 8-esfingeninas, 4,8-diesfingeninas y 8- ó 9-fitoesfingeninas (Merrill, 2002).

La concentración basal de las LCBs libres en las células es generalmente baja, ya que la esfinganina (SN) biosintetizada *de novo* es rápidamente *N*-acilada con una larga cadena de ácido graso, por acción de la esfinganina *N*-aciltransferasa. Esta enzima además reacila a la S derivada de la degradación de la mayoría de los esfingolípidos complejos en las células de mamíferos (Merrill *et al.*, 1996a; Riley *et al.*, 1996).

Las LCBs pueden ser catabolizadas y para ello requieren de la adición de un grupo fosfato en su grupo 1-OH por acción de la esfingosina cinasa (SK) o esfinganina cinasa. El producto de la reacción es esfingosina-1-fosfato (S1P) o esfinganina-1-fosfato (SN1P), respectivamente, que pueden ser degradadas irreversiblemente en el retículo endoplásmico por una liasa para producir etanolamina y hexadecanal. Las células también contienen actividades de fosfatasas de S1P y SN1P y de ceramida sintetasa, por lo que las células mantienen un equilibrio dinámico entre los niveles de ceramida, S/SN y S1P/SN1P. Además, en plantas y levaduras la esfinganina puede ser hidroxilada en el carbono 4 para sintetizar a la fitoesfingosina (PS) (Fig. 1).

El producto de la reacción catalizada por la esfinganina *N*-aciltransferasa es la *N*-acil esfinganina (dihidroceramida), la cual requiere de una reacción de desaturación sobre el carbono 4 para formar a la ceramida, precursor de los esfingolípidos complejos, pues la adición de grupos polares (generalmente carbohidratos) en la posición 1 de la ceramida produce a los diferentes esfingolípidos celulares (Fig. 1) (Merrill *et al.*, 1997).

Los esfingolípidos complejos más abundantes de las plantas son los cerebrósidos (mono- y oligohexosilceramidas), los cuales contienen en sus estructuras moléculas de glucosa, galactosa, manosa e inositol (Lynch, 1993), también existen los aniónicos, con un grupo fosfato adicional (Markham *et al.*, 2006).

ii. Fumonisina B₁: inhibidor de la ruta biosintética de los esfingolípidos

Una de las herramientas más empleadas en el estudio de los esfingolípidos como mediadores en las vías de transducción de señales, son los inhibidores de su metabolismo. Entre éstos están la cicloserina, la toxina secretada por el hongo *Alternaria alternata*, las esfingofunginas, la miriocina y las fumonisinas (Merrill *et al.*, 1996b).

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides* (anteriormente llamado *F. moniliforme*), que frecuentemente contaminan al maíz y a otros granos. La toxina predominante de este grupo es la fumonisina B₁ (FB₁), estimándose que alrededor del 59% del maíz y productos derivados de éste se encuentran contaminados con cantidades variables de la micotoxina (Pittet *et al.*, 1992; Haschek *et al.*, 2001).

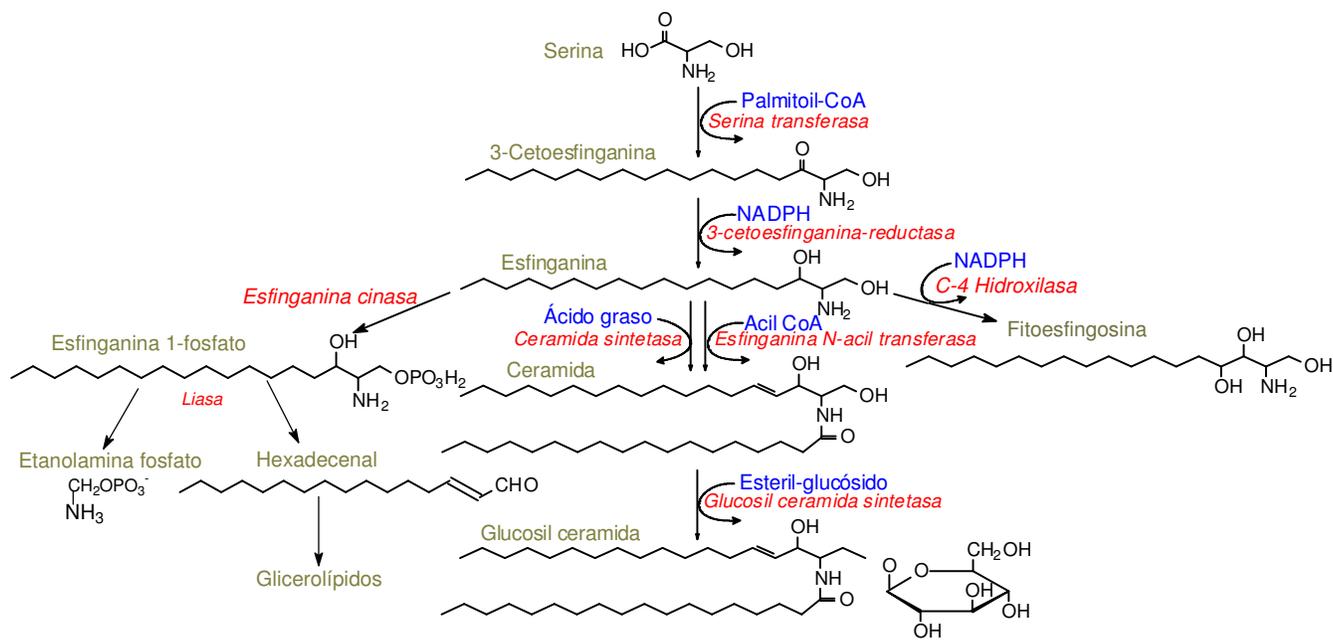


Figura 1. Ruta de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en plantas que muestra a las enzimas participantes (Tomada de Holthuis *et al.*, 2001).

La FB₁ está compuesta por dos ácidos tricarbálicos unidos mediante enlaces éster a una larga cadena de aminopentol (AP1) (Marasas, 2001); su estructura química es muy similar a la de las LCBs (Fig. 2). Al igual que el resto de las fumonisinas, la FB₁ altera el metabolismo de los esfingolípidos al inhibir a la esfinganina *N*-aciltransferasa (Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001), produciendo en diferentes tipos celulares animales una acumulación de las bases esfingoideas y de sus productos de degradación, y una inducción de cambios celulares importantes (Merrill *et al.*, 1997), como son la inhibición del crecimiento celular, la citotoxicidad (Merrill, 1983; Stevens *et al.*, 1990) y la muerte celular (Nakamura *et al.*, 1996).

Un modelo que explica el posible mecanismo de acción de la FB₁ sobre la SAT implica que el cuerpo de aminopentol de la toxina compite con la LCB (sustrato de la acilación) por la unión a la SAT y que los ácidos tricarbálicos de la FB₁ interfieren con la unión del acil-CoA (Merrill *et al.*, 2001).

Asimismo, la FB₁ podría estar modulando varias rutas de transducción de señales reguladas por esfingolípidos mediante tres mecanismos: (1) la inhibición de la SAT provoca la acumulación de LCBs libres en niveles que podrían estar mediando los efectos citotóxicos, citostáticos y mitogénicos de la FB₁ (Riley *et al.*, 1993; Riley *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1994), (2) la FB₁ podría estarse uniendo directamente a blancos celulares de las LCBs que son importantes para la modulación de rutas de transducción de señales reguladas por los esfingolípidos (Wattenberg *et al.*, 1996) y, (3) la FB₁ podría estar disminuyendo los niveles endógenos de ceramida y compuestos derivados de ésta que estuvieran involucrados en vías de señalización.

El efecto de la FB₁ sobre el crecimiento de las células se ha examinado principalmente en células de mamíferos con la finalidad de determinar si son estos efectos los causantes de las enfermedades asociadas a la toxina fúngica. Los resultados de estos trabajos han demostrado dos efectos diferentes sobre la proliferación celular: uno inhibitorio sobre las células epiteliales renales, queratinocitos, hepatocitos y células de hepatoma (Gelderblom *et al.*, 1994; Tolleson *et al.*, 1996), en las que se inducen la apoptosis (Tolleson *et al.*, 1996); y otro en el que se estimula la mitogénesis en fibroblastos Swiss 3T3,

siendo este evento asociado al cáncer (Schroeder *et al.*, 1994). En este último sistema celular se demostró posteriormente que la toxina modulaba la actividad de un par de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), ya que estas enzimas participan en las rutas de transducción de señales activadas por una gran diversidad de sustancias inductoras de la proliferación celular (Wattenberg *et al.*, 1996).

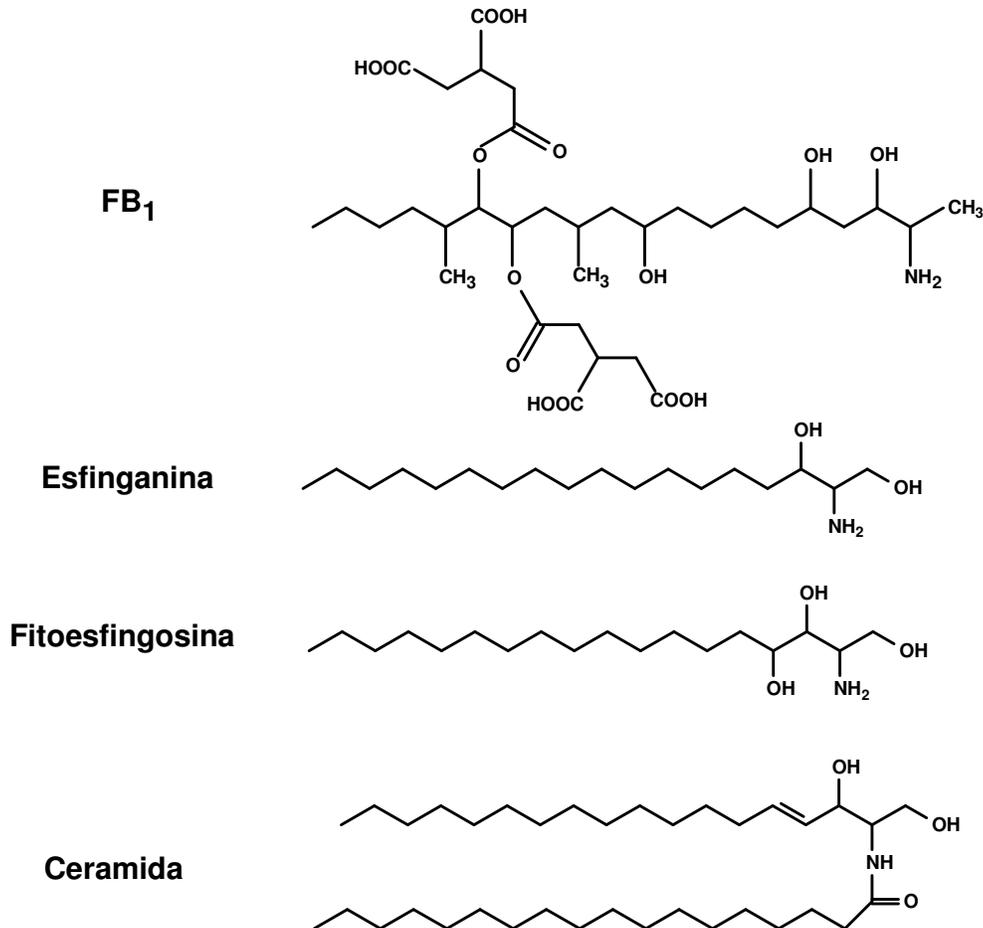


Figura 2. Estructuras químicas de la toxina fúngica FB₁, ceramida y de las bases esfingoideas predominantes en plantas: esfinganina y fitoesfingosina.

iii. Los esfingolípidos y su acción como segundos mensajeros

Los segundos mensajeros son un grupo de moléculas pequeñas que acarrean la información codificada por los estímulos extracelulares hacia blancos intracelulares responsables de la respuesta biológica; son sometidos a un reciclaje rápido y continuo; su vida media es relativamente corta y son rápidamente degradados y resintetizados (Ponce y López, 2003).

La interacción del ligando con sus receptores activa a proteínas efectoras que se encuentran cerca de la membrana, lo que les permite catalizar la transformación de moléculas precursoras a segundos mensajeros; éstos funcionan como efectores alostéricos, es decir, son reconocidos con una extraordinaria afinidad y especificidad por ciertas proteínas cinasas, las que a su vez fosforilan otras proteínas de la célula, activando o inhibiendo otras cinasas o fosfatasas (Ponce y López, 2003).

Las señales que regulan la apoptosis en animales son un tema de gran interés, particularmente la acción de algunos compuestos relacionados a la ceramida que afectan tanto al desarrollo como a la apoptosis. La ceramida se ha estudiado como un posible segundo mensajero que participa en estos

procesos, ya que se tiene como antecedente que los esfingolípidos participan en el contacto celular, el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular de mamíferos (Gilchrist, 1998). La ceramida es un esfingolípidido que se genera principalmente cuando la célula percibe un estrés celular y durante la apoptosis. En animales, el esfingolípidido puede ser producido además por la acción de una esfingomielinasa ácida (aSMasa) o neutra (nSMasa). Por su analogía con el diacilglicerol (DGA), se ha propuesto a la ceramida como un segundo mensajero cuya función es unirse a proteínas intracelulares para alterar la estructura membranal y el transporte vesicular intracelular (van Blitterswijk *et al.*, 2003).

La ceramida, a diferencia del DGA, tiende a mantenerse en la estructura de las bicapas lipídicas, no fluidiza a las membranas, pero sí incrementa el orden de las cadenas de acilo (aumentando el empaquetamiento y rigidización) y tiene una tendencia de auto-agregación en el plano de la bicapa en el que se encuentre, más aún en presencia de SM. Como resultado, la ceramida se concentra dentro de los microdominios, empaquetada fuertemente en homodímeros o multímeros en asociación con otros esfingolípidos y colesterol. Esto promueve y estabiliza la formación de balsas lipídicas/caveolas. La ceramida no tiende a realizar el “flip-flop” entre las bicapas lipídicas a diferencia del DGA, su velocidad de flip-flop se ha estimado en 22 min, de manera que la ceramida permanece por algún tiempo del lado de la bicapa en donde fue generada.

El movimiento limitado de la ceramida de una monocapa a otra predice que si se genera principalmente a partir de la esfingomielina (SM), en el lado exoplasmático de la membrana celular, particularmente en la balsa lipídica, es poco probable que la ceramida actúe como segundo mensajero sobre una proteína citoplasmática en el lado opuesto de la membrana. Sin embargo, la ceramida puede modificar las interacciones intermoleculares dentro y entre las balsas lipídicas, con consecuencias en la coalescencia de las balsas lipídicas, la curvatura de la membrana y la señalización (apoptótica) que emanan de estos dominios. Gulbins y Kolesnick y colaboradores (2001) demostraron que la ceramida generada o insertada exógenamente dentro de la capa externa de la bicapa del raft puede facilitar el agrupamiento del receptor de muerte CD95/Fas, que reside en las balsas lipídicas, y la subsecuente inducción de la apoptosis (Grassme *et al.*, 2001; Paris *et al.*, 2001; Cremesti *et al.*, 2001).

La función de la ceramida como segundo mensajero es un tema controversial, pues una de las características que define a los segundos mensajeros es que su síntesis es rápida y transitoria. En células de mamíferos a las que les es aplicado un tipo de estrés proapoptótico, la identificación de la formación de la ceramida es difícil, pues no se han desarrollado técnicas sencillas y precisas que permitan su cuantificación de manera rápida. Su función como inductor de la apoptosis es mediado por su papel estructural en la membrana plasmática, principalmente en los microdominios, donde su concentración incrementada en estas regiones en una de las primeras fases de la apoptosis, origina el reclutamiento de varios receptores cuya unión con su ligando promueven la muerte celular programada. En la fase efectora de la apoptosis, se ha sugerido que existe un intercambio de los lípidos entre la bicapa membranal, promoviendo la transferencia de la fosfatidilserina al plano externo de la membrana plasmática y de la esfingomielina al interior. Posiblemente la acción de una nSMasa hidroliza a la esfingomielina para producir a la ceramida en la monocapa interna, en donde varias proteínas de señalización se pudieran asociar a ella (van Blitterswijk *et al.*, 2003).

Aparentemente, los niveles elevados de la ceramida producen la activación de varias proteínas involucradas en la muerte celular programada, entre las que se encuentran la cinasa de proteína activada por ceramida (CAPK), la caspasa 3, la caspasa 7, la fosfatasa 2A de una proteína mitocondrial (PP2A), la SAPK y la ruta p21 WAF1/CIP1/Sdi (Yao *et al.*, 1995; Verheij *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Cullivier *et al.*, 1998). La ceramida es capaz además de inactivar a la Akt/cinasa de proteína B (PKB) y al protooncogene Bcl2. Todos estos eventos promueven la apoptosis (Prieschl y Baumruker, 2000) y pueden

ser contrarrestados por la acción de la S1P, la cual previene la activación de la SAPK y las caspasas 3/7 (Cullivier *et al.*, 1996, 1998) e induce la activación de la ERK1,2, SAPK, MEK1,2 y el flujo de iones Ca^{2+} . Estos eventos promueven el crecimiento celular e inhiben la apoptosis (Prieschl y Baumruker, 2000).

En general, los efectos de estos metabolitos son regulados por varias enzimas que los pueden interconvertir. La conversión de ceramida y S a S1P sustituyen a las señales pro-apoptóticas por unas señales de supervivencia y la conversión de S1P a ceramida y S tiene efectos contrarios. Esto ha sugerido la existencia de un reóstato de esfingolipídeos, ya que se ha demostrado que los niveles elevados de S1P protegen a la célula de la apoptosis y que la falta de S1P, enriquece a la apoptosis inducida por ceramida (Maceyka *et al.*, 2002).

3. ANTECEDENTES

Uno de los principales hongos fitopatógenos que atacan al maíz es *Fusarium verticillioides*, quien secreta diversas toxinas que le permite invadir a la planta hospedera. Dentro del grupo de micotoxinas que secreta *F. verticillioides* se encuentran las fumonisinas, las cuales poseen estructuras análogas a las LCBs. La fumonisina más abundante y tóxica de este grupo de micotoxinas es la FB₁.

En nuestro laboratorio, en el contexto de la interacción planta-patógeno se han utilizado embriones de maíz expuestos a la FB₁ como sistema de estudio, lo que permite explorar la serie de reacciones que desarrolla la planta hospedera en algunos de sus componentes celulares. En el modelo anterior, es necesario evaluar los efectos de la toxina a partir de dos acciones ya conocidas: como agente perturbador de la membrana plasmática y como inhibidor de la síntesis de esfingolípidos (Gutiérrez, 1999, Garibay *et al.*, 2000; Enriquez *et al.*, 2001; Rivas, 2001; Carmona, 2003; Gutiérrez, 2005). Para ello, nuestro grupo ha explorado el efecto de la FB₁, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre embriones de maíz. En casos particulares se han observado efectos diferentes en las condiciones *in vitro* e *in vivo*.

La exposición *in vivo* se refiere al procedimiento de imbibición de los embriones de maíz con la toxina; mientras que el tratamiento *in vitro* se refiere a la exposición del compartimento celular de interés, previamente aislado (homogenados totales, fracción membranal total, fracción de membrana plasmática, etc.), a la FB₁. En los estudios *in vitro* se ha evaluado el efecto de la toxina sobre componentes membranales, citosólicos y nucleares.

1. EFECTOS DE LA FB₁ EN ELEMENTOS DE DIFERENTE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

a) Pared celular

La pared celular de las células vegetales, después de la cutícula, representa una barrera a la que se enfrenta el patógeno durante la invasión a la planta. Este componente celular protege y da soporte a las células vegetales. La composición de la pared celular se modifica continuamente por acción enzimática durante el crecimiento y desarrollo, o bien como resultado de algún tipo de estrés y/o infección por microorganismos. Las proteínas que forman parte de la pared celular son ubicuas y relativamente abundantes en plantas y algas verdes, estas proteínas son ricas en uno o dos aminoácidos, dependiendo de la familia, tienen dominios de secuencias altamente repetitivos y algunas están glicosiladas (McNeil *et al.*, 1984).

- i. En presencia de la micotoxina FB₁, los transcritos de la glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP), una de las proteínas más abundantes de la pared celular, se incrementaron (SanJuan, 2001).

b) Membrana celular

El organismo patógeno tiene contacto con la membrana plasmática de la célula hospedera una vez que ha traspasado las barreras de la cutícula y la pared celular. En la membrana se desencadenan numerosas reacciones, entre las que se encuentran las aperturas de canales iónicos, la formación de EROs (Kombrink y Somssich 1995; Bestwick *et al.*, 1997; Wojtaszek 1997), modificaciones en la polaridad de la membrana y en la actividad enzimática de las NAD(P)H oxidasas, fosfolipasas, fosfatasa y cinasas (Yang *et al.*, 1997). Las primeras reacciones desencadenadas en la célula tienen efectos inmediatos en varias

rutas metabólicas inductoras de respuestas de defensa, lo que permite la supervivencia de la planta atacada (Somssich y Hahlbrock, 1998).

En el sistema embriones de maíz-FB₁ se encontraron las siguientes respuestas:

- i. *En la permeabilidad*: En condiciones *in vivo* un aumento en la fuga de electrolitos en un 61 a 80%, lo que sugiere que la micotoxina incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática (Gutiérrez, 1999).
- ii. *En la fluidez membranal*: En exposición *in vivo* un aumento de la rigidez membranal; mientras que en condición *in vitro* una disminución (Gutiérrez, 1999).
- iii. *En la actividad de la glucan sintetasa II*: *In vitro* la exposición causó una inhibición de la enzima en un 30% (Garibay *et al.*, 2000; Enríquez *et al.*, 2001).
- iv. *En la actividad de la ATPasa de H⁺*: En condición *in vivo* e *in vitro* la toxina produjo una inhibición de tipo competitivo de la ATPasa de H⁺ en un 23 a 43% (Gutiérrez, 1999).
- v. *En la actividad de la NADPH oxidasa*: En condición *in vivo* la toxina a una concentración 10 µM produjo una inhibición de la enzima, mientras que a 20 µM una activación (Rodríguez, 2006).
- vi. *En la actividad enzimática de cinasas membranales*: En embriones de maíz expuestos *in vitro* una inhibición de la fosforilación de cinco cinasas membranales y la activación de dos proteínas. La identidad de las cinasas se desconoce (Carmona, 2003).
- vii. *En la peroxidación de lípidos membranales*: En condiciones *in vitro* no se detectó una peroxidación de lípidos, mientras que *in vivo* se encontró una disminución del 45% (Palacios, 2002).

c) Citoplasma

En las células de la planta después de la detección del patógeno a nivel membranal, se activan diferentes rutas de señalización para producir una serie de respuestas en varios compartimentos intracelulares. Las moléculas de señalización son de naturaleza química muy diversa, entre ellas se encuentran segundos mensajeros, el SA, el NO, las EROs, el JA, el ET, proteínas-G, fosfatasa y cinasas.

- i. En embriones de maíz expuestos a la FB₁ se determinó la actividad de cinasas de proteína utilizando como sustrato de fosforilación a la proteína básica de mielina (MBP) de timo de bovino en un ensayo en solución. En la exposición *in vitro* de las proteínas citosólicas de embriones de maíz a la toxina se observó una notoria defosforilación de la MBP, mientras que en la exposición *in vivo* se presentó una discreta fosforilación del sustrato. Estos resultados indican que la FB₁ puede estar activando cinasas y fosfatasa simultáneamente y debido a que estas proteínas tienen diferentes cinéticas, el efecto observado fue el balance final neto en el nivel de fosforilación de la MBP. Por ello, es probable que durante la exposición *in vitro* se activen predominantemente fosfatasa, y durante la exposición *in vivo* preferentemente cinasas de proteína (Saucedo, 2004). La expresión de la actividad de unas y otras proteínas es dependiente de la condición de estudio, pues el sistema *in vitro* es un homogenado celular en el que el sustrato queda accesible a todas las cinasas y fosfatasa celulares que *in vivo* pudieran estar compartimentalizadas.
- ii. En embriones de maíz expuestos a la FB₁ durante 36 h, se detectó que la concentración de SA se duplicó con respecto a la concentración registrada en embriones de maíz germinados en ausencia de la micotoxina (Rivas, 2004).

d) Núcleo

Una reacción común en las plantas hospederas durante la resistencia a patógenos es la degradación del ADN. Mittler y Lam (1997) señalan que dicha degradación es uno de los mecanismos generales que ocurren en plantas con HR para evitar la incorporación de partículas virales dentro de su genoma.

- i. La FB₁ indujo la activación de tres proteínas con actividad de nucleasa con condiciones óptimas de pH de 7.7 y presencia de Mg⁺². La subsecuente degradación del ADN presenta un máximo durante las primeras 24-48 horas de exposición (Alcántara, 1998).

Estos resultados, junto con la detección de la acumulación del SA (que además de ser considerado una molécula de señalización, se ha asociado con la HR), sugieren que los embriones de maíz expuestos a la toxina activan respuestas de defensa y particularmente el proceso de muerte celular programada.

2. EFECTOS DE LOS NIVELES DE ESFINGANINA Y FITOESFINGOSINA EN LA ACTIVIDAD DE CINASAS Y NIVELES DE ÁCIDO SALICÍLICO

Entre los efectos más significativos de la FB₁ en células de animales y de plantas, se encuentra la inhibición de la SAT, cuya actividad es parte de la ruta biosintética de esfingolípidos complejos. Como resultado de este efecto, se inhibe la síntesis de ceramida (CE), esfingolípidos con actividad biológica y precursor de los esfingolípidos complejos, y se acumulan las LCBs que son los sustratos de la enzima inhibida por la FB₁. Dentro de los resultados del laboratorio se encontró un incremento en los niveles de SN y PS en embriones de maíz expuestos a la toxina. Estos resultados indican que la biosíntesis de esfingolípidos está siendo afectada por la micotoxina. La relación de las LCBs con respecto al control fue de:

- ii. 3 veces de PS en homogenados totales (Rivas, 2001)
- iii. 11 veces de SN en homogenados totales (Rivas, 2001)
- iv. 4.4 veces de PS en microsomas (Gutiérrez, 2005)
- v. 10.5 veces de SN en membrana plasmática (Gutiérrez, 2005)

Experimentos con adición de LCBs exógenas

Para evaluar si algunas de las modificaciones reportadas en embriones de maíz expuestos a la FB₁ eran consecuencia del incremento en los niveles endógenos de las LCBs, se repitieron algunos ensayos en los que se determinó:

- i. La actividad enzimática de cinasas membranales en embriones de maíz expuestos *in vitro* a SN exógena: En este sistema se reportó la activación de: i) las mismas cinasas activadas por FB₁, ii) las cinco cinasas inhibidas por la toxina y, iii) otras cinco proteínas (Carmona, 2003).
- ii. La actividad de cinasas de proteína en embriones de maíz expuestos *in vitro* a SN, PS o CE exógenas: En los diferentes tratamientos se observó la defosforilación de la MBP; la variación fue dependiente del compuesto, la concentración y el tiempo de exposición (Saucedo, 2004).
- iii. La actividad de cinasas de proteína en embriones de maíz expuestos *in vivo* a SN, PS o CE exógenas: De los diferentes compuestos añadidos, sólo la SN produjo un ligero, pero significativo incremento en el nivel de fosforilación de la MBP (13% con respecto al control). Este resultado sugiere que el aumento en el nivel de la fosforilación de la MBP en presencia de FB₁ es mediado por el incremento endógeno de la SN (Saucedo, 2004).
- iv. La acumulación de SA por efecto de SN, PS y CE exógenas: Los diferentes tratamientos incrementaron los niveles de SA en distinto grado. Con el primer compuesto la acumulación de SA fue

de 4-6 veces, mientras que PS y ceramida aumentaron tres veces la concentración con respecto a los controles. La acumulación de SA libre en presencia de SN y PS ocurre en mayor magnitud y en menor tiempo que con la FB₁, lo que sugiere que estos compuestos intervienen en el incremento observado de los niveles de SA (Rivas, 2004).

4. JUSTIFICACIÓN

En las interacciones planta-patógeno incompatibles es característica la aparición del fenotipo de HR, en donde se activa la muerte celular programada de manera muy localizada. Esta respuesta es activada y regulada genéticamente por la planta y presenta varios cambios morfológicos de la apoptosis descrita en animales.

La SN y la PS son las principales LCBs libres que se encuentran en tejidos vegetales; sin embargo, sus niveles endógenos son menores en comparación con las LCBs insaturadas que se hayan en la estructura de los esfingolípidos complejos. En levaduras, la SN, PS y sus análogos de 20 carbonos, tienen funciones en la respuesta al estrés por calor, endocitosis, transporte de aminoácidos, entre otras; mientras que las funciones de las LCBs en plantas no han sido bien documentadas (Wright *et al.*, 2003). En plantas, únicamente se ha reportado la función de la S1P como segundo mensajero en la regulación de la apertura de los estomas durante el estrés hídrico. Lo anterior nos permite suponer que los compuestos relacionados a S1P, con respecto a su estructura y localización en la ruta biosintética *de novo*, actúen como segundos mensajeros, en respuesta a la infección con patógenos.

La exposición de tejidos vegetales y protoplastos a las SAMs produce la inhibición de la ruta biosintética *de novo* de los esfingolípidos. Como consecuencia de este fenómeno, los niveles endógenos de SN y PS incrementan y se promueve la necrosis y la muerte celular similar a la apoptótica (Wright *et al.*, 2003).

En células animales expuestas a la FB₁ se ha observado la acumulación de la SN en su forma libre o fosforilada. La acción de la esfinganina-1-fosfato como segundo mensajero modifica la actividad de varias proteínas, incluyendo algunas cascadas de MAP cinasas. En plantas, además de la esfinganina cinasa, se ha identificado la actividad de una esfinganina hidroxilasa que cataliza la formación de PS. Aparentemente la actividad de estas dos enzimas no se afecta por la presencia de la FB₁.

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado diversas modificaciones a nivel bioquímico y molecular durante la germinación del maíz por acción de la FB₁. Específicamente se han identificado cambios en los componentes de la membrana plasmática (Gutiérrez, 1999; Garibay *et al.*, 2000; Enríquez *et al.*, 2001; Carmona, 2003); la expresión de componentes de la HR (Alcántara, 1998; SanJuan, 2001; De la Torre *et al.*, 2003; Rivas, 2004); y cambios en los niveles endógenos de SN y PS (Rivas, 2001; Gutiérrez, 2005). Varios de estos fenómenos están relacionados con la respuesta de defensa a patógenos, los cuales están probablemente mediados por la acumulación o ausencia de ciertos compuestos esfingoideos. En hojas de frijol expuestas a la toxina se ha detectado cualitativamente una acumulación en los niveles endógenos de LCBs (Noyola, 2006), así como la presencia de lesiones necróticas ubicadas en el sitio de infiltración (Palacios, 2007), lo que sugiere es una reacción análoga a la HR.

Con base en lo anterior, se decidió estudiar la activación de MAPKs de embriones de maíz expuestos a la FB₁ y a la SN, determinando el perfil de las proteínas activadas, su cinética de activación y su dependencia a la dosis de los compuestos. Además, se investigó el efecto de la acumulación de compuestos esfingoideos en otra especie vegetal (frijol), para compararla con el comportamiento observado en los embriones de maíz.

5. HIPÓTESIS

Las MAPKs involucradas en las reacciones de defensa ante patógenos son activadas por esfinganina y FB₁.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función de las bases de cadena larga como moléculas de señalización en la actividad de MAPKs de embriones de maíz y hojas de frijol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la posible actividad de MAPKs de embriones de maíz y hojas de frijol en respuesta a la FB₁ o SN a diferentes tiempos y concentraciones.
2. Explorar la capacidad de autofosforilación y la especificidad de las cinasas de MBP hacia otros sustratos de cinasas.
3. Analizar si las cinasas de MBP que responden a FB₁ o SN son reconocidas por un anticuerpo dirigido contra una de las MAPKs de animales.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

Embriones de maíz (*Zea mays* raza criolla Chalqueño), cosechas marzo del 2002 y septiembre del 2004, cultivadas en Chalco, Edo. de México.

Plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Canario 60), cultivadas en invernadero bajo riego diario y alterno con solución de Hoagland y agua. Fotoperiodo natural.

7.2. Exposición del sistema biológico a la fumonisina B₁ o esfinganina

a) Imbibición de embriones de maíz con fumonisina B₁ o esfinganina

Los embriones de maíz fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (concentración final de cloro activo 0.6%) y distribuidos homogéneamente en cajas de petri que contenían agarosa disuelta en buffer de imbibición, en donde fueron embebidos durante 23 h a 29°C. Transcurrido el tiempo, los embriones fueron sujetos a un segundo periodo de imbibición en presencia o ausencia de la FB₁ o SN a 29°C. Estos compuestos fueron adicionados a la solución de agarosa aún no solidificada en las concentraciones indicadas en cada experimento (ver Apéndice II).

b) Infiltración de hojas de frijol con agua, Silwet L-77, ácido salicílico, fumonisina B₁ o esfinganina

Las hojas de frijol que se usaron para realizar la infiltración, fueron de plantas con edad promedio de 30-45 días (desarrollo en el que presentaban dos trifolios adultos totalmente expandidos). A cada hoja se le realizaron infiltraciones en cuatro o seis puntos (dependiendo del tamaño de la hoja) en la superficie abaxial foliar con aproximadamente 20 µL de H₂O, Silwet L-77 (SW), SA, SN o FB₁. El tiempo de exposición varió de acuerdo a lo que se indica en cada experimento.

7.3. Extracción de la fracción soluble

Para la extracción de la fracción soluble, los embriones de maíz o las hojas de frijol congelados a -70°C fueron pulverizados en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente, los tejidos vegetales fueron homogenizados con un homogenizador eléctrico en presencia de un buffer de homogenización. El homogenizado se centrifugó primero a 17 000 g durante 10 min (4°C) y posteriormente a 100 000 g durante 1 hora (4°C). En ambas centrifugaciones se recuperó el sobrenadante y el último, que corresponde a la fracción soluble, se congeló a -70°C (ver Apéndice II).

7.4. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford

El ensayo se fundamenta en la unión del azul de Coomassie a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas e iónicas. Las proteínas estabilizan la forma aniónica del colorante causando un cambio de color visible en un intervalo de longitud de onda de 465 a 565 nm. Se utilizó el sistema de Bio-Rad (ver Apéndice II).

7.5. Ensayo en gel para determinar actividad de MAPKs

Para cada ensayo se utilizaron 20-40 µg de proteína de las fracciones solubles de embriones de maíz o de hojas de frijol. Las proteínas se separaron mediante la técnica de SDS-PAGE en un gel al 10% que

antes de su polimerización fue suplementado con una solución de proteína básica de mielina (MBP) a una concentración 0.30 mg/mL.

Después de la electroforesis el SDS fue removido con tres lavados de 30 min a temperatura ambiente con el buffer A [Tris-HCl (pH 7.5) 25 mM, DTT 0.5 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, NaF 5 mM, β-glicerofosfato 10 mM, BSA 0.5 mg/mL, Tritón X-100 0.1% (v/v)]. Posteriormente, el gel fue renaturalizado a través de tres lavados a 4°C con una duración total de 16 h con el buffer B [Tris-HCl (pH 7.5) 25 mM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, NaF 5 mM]. Por último, los geles fueron lavados con el buffer C por 30 min [Tris-HCl (pH 7.5) 25 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 12 mM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM] y después incubados en 10 mL del buffer C en presencia de ATP 5 μM y γ-[³²P]-ATP 50 μCi durante 90 min. Ambas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (Romeis *et al.*, 1999).

Las reacciones de fosforilación se detuvieron con cinco lavados consecutivos de una solución de TCA (ácido tricloroacético) 5% v/v y pirofosfato de sodio 1% (p/v) por al menos 3 horas. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, secados y usados para exponer dos películas fotográficas (ver Apéndice II).

7.6. Ensayo en gel para determinar actividad de cinasas de caseína o histona

El protocolo que se siguió para evaluar la actividad de cinasas de caseína o histona fue el mismo que se siguió para el estudio de cinasas de MBP. La concentración final en gel de la α caseína o de la histona de tipo III fue de 1 mg/mL. Estas son condiciones que se han descrito en la literatura como controles negativos para la identificación de las cinasas de MBP como MAPKs.

7.7. Ensayo en gel para evaluar la autofosforilación de cinasas

El protocolo fue el mismo que para el ensayo en gel de determinación de actividad de cinasas, omitiendo la presencia de los sustratos artificiales de las cinasas.

7.8. Ensayo de réplica en Western de las proteínas solubles con el anticuerpo anti-ERK1/2 o anti-fosfo-ERK1/2

Para cada ensayo de inmunotransferencia se separaron electroforéticamente 25 μg de proteína soluble siguiendo el procedimiento mencionado en el punto 7.5. Posteriormente, el gel se colocó en un casete de inmunotransferencia haciendo contacto con una membrana de PVDF y transfiriéndose a 250 mA durante 2 h con circulación de agua a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-ERK1/2 o anti-phospho ERK1/2 de Cell Signaling (Danvers, MA) y reveladas con peroxidasa (ver Apéndice II).

8. RESULTADOS

8.1. Estandarización del método para detectar la actividad de cinasas de MBP en gel

Con el objetivo de desarrollar un método sensible y reproducible para detectar la actividad de MAPKs en gel, se realizaron ensayos con el método diseñado por Mora-Álvarez *et al.*, 2004. Sin embargo, la falta de resultados positivos motivó realizar varias modificaciones a dicho método (Tabla II).

Tabla II. Resumen de las distintas condiciones evaluadas para la estandarización del método del ensayo de fosforilación en gel.

Embriones de maíz expuestos a:	Solución empleada para la reacción de fosforilación	Solución empleada para retirar el [γ P ³²]-ATP remanente	Otras variaciones	Visualización de la fosforilación de la MBP en autorradiografías
10 μ M SN	Mora-Álvarez <i>et al.</i> , 2004	Mora-Álvarez <i>et al.</i> , 2004	–	–
10 μ M SN	Modificado de Mora-Álvarez <i>et al.</i> , 2004: Concentraciones mayores de ATP y γ -[³² P]-ATP	Mora-Álvarez, <i>et al.</i> , 2004	Mayor cantidad de proteína aplicada al gel	–
10 μ M SN	Romeis <i>et al.</i> , 1999	Romeis <i>et al.</i> , 1999	–	Definida; sin embargo aparece la fosforilación de MBP mediada por una proteína de 16 kDa
10 μ M SN o 10 μ M FB ₁	Romeis <i>et al.</i> , 1999	Mora-Álvarez, <i>et al.</i> , 2004	–	Poco definida
10 μ M SN o 10 μ M FB ₁	Romeis <i>et al.</i> , 1999	Mora-Álvarez, <i>et al.</i> , 2004	Adición de PMSF como inhibidor de proteasas durante la extracción de las fracciones solubles.	Poco definida
10 μ M SN o 10 μ M FB ₁	Romeis <i>et al.</i> , 1999	Mora-Álvarez, <i>et al.</i> , 2004	✓	Poco definida
10 μ M PS o 10 μ M CE	Romeis <i>et al.</i> , 1999	Mora-Álvarez, <i>et al.</i> , 2004	✓	Poco definida
10 μ M SN o 10 μ M FB ₁	Modificado de Romeis <i>et al.</i> , 1999: Concentraciones mayores de ATP	Romeis <i>et al.</i> , 1999	✓	Bandas de fosforilación bien definidas. No se observó la banda de 16 kDa

NOTA: (–) significa ninguna modificación y (✓) que se mantuvo la condición anterior.

Con base en los resultados obtenidos, la composición de las soluciones de la reacción de fosforilación y la de lavado que retira el remanente de γ -[³²P]-ATP (Romeis *et al.*, 1999) se utilizó para medir la actividad de MAPKs en hojas de tabaco infiltradas con SA (control positivo) y en embriones de maíz expuestos a esfingánina (SN) (Fig. 3). En las autorradiografías se pudo detectar finalmente la fosforilación de la MBP en bandas entre 40 y 75 kDa, aunque el nivel de fosforilación fue bajo. También se detectó una proteína de 16 kDa, que resultaba muy diferente a la de las MAPKs reportadas (40 a 80 kDa). En éste, como en todos los ensayos de actividad en gel que se realizaron en este trabajo, se muestran los geles teñidos con azul de coomassie de los que se hizo la autorradiografía respectiva, para evidenciar las cantidades de proteína cargadas en cada carril.

Otras modificaciones se hicieron en la extracción de la fracción soluble y en la reacción de fosforilación (Tabla II). En la primera, se añadió PMSF como inhibidor de proteasas, además de la mezcla comercial de inhibidores (de composición desconocida) (Fig. 4). La fosforilación de la MBP mediada por la proteína de masa molecular relativa de 16 kDa no disminuyó por la adición del PMSF, lo que sugirió que no se trataba de productos de degradación de otras cinasas. No obstante, se mantuvo la adición de PMSF en las subsecuentes extracciones de fracciones solubles. En la reacción de fosforilación se utilizó la reportada por Romeis *et al.* (1999), pero incrementándose la concentración de ATP de 200 nM a 5 μ M.

8.2. Efecto de la fumonisina B₁ o esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz

Una vez estandarizada la técnica para el ensayo de actividad en gel, se determinó la activación temporal de MAPKs inducida por la Fumonisina B₁ (FB₁) o por la esfinganina (SN). Los embriones de maíz se embebieron en presencia o ausencia de FB₁ o SN durante un intervalo de 4 a 38 h, con una diferencia de 2 h por cada tiempo analizado. Como se muestra en la Fig. 5, la exposición de los embriones de maíz a la FB₁ evidenció un ligero incremento en la fosforilación de la MBP por bandas de 52 y 74 kDa en tiempos entre 4 y 12 h.

Con estos indicios de actividad se evaluó otra forma de exponer a los embriones de maíz a la toxina y que ya se había explorado previamente, en la que los embriones de maíz fueron embebidos 23 h en agar y entonces transferidos a un segundo medio en el que fueron embebidos en SN o FB₁ por diferentes tiempos. A este tipo de exposición se le denominó discontinua, para diferenciarla de la exposición continua previamente usada con la que la activación de MAPKs no fue satisfactoria. De aquí en adelante la exposición a los compuestos fue siempre discontinua.

Para evaluar la activación temporal de MAPKs, los embriones de maíz fueron expuestos a la FB₁ o SN por 10 y 30 min, y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h. Como grupo control se consideró embriones de maíz embebidos en los respectivos tiempos en agarosa. Los controles se utilizaron para determinar si la transferencia de los embriones de maíz, que podría implicar estrés de tipo mecánico u osmótico, provocaba la activación de MAPKs. Como éste resultó ser el caso, se determinó hacer la comparación de la activación de cinasas por los tratamientos experimentales, no contra la fosforilación del tiempo cero del tratamiento, sino con el tiempo respectivo en el control.

En las autorradiografías de la Fig. 6A se distinguieron dos bandas de 45 y 74 KDa que fosforilaron a la MBP. El análisis de los resultados de éste y el resto de los experimentos con embriones de maíz se enfocaron únicamente sobre la cinasa de 45 kDa, que se detectó de manera más consistente en las diferentes condiciones evaluadas. En la Fig. 6A se observa que el tratamiento control produjo un incremento en el nivel de fosforilación de la MBP a los 10 min, 2 y 8 h. En los embriones de maíz expuestos a la FB₁, se observó la activación de las mismas cinasas aunque con una cinética diferente a las del grupo control. La FB₁ produjo principalmente incrementos en la fosforilación de MBP mediada por la cinasa de 45 kDa. El aumento ocurrió a los 30 min y las 6 h (comparados siempre contra el tiempo respectivo del control), seguido por un nuevo incremento a las 12 h que se encontró también en el último tiempo explorado (24 h). Los tiempos en los que se observó una máxima activación de la cinasa de MBP de 45 kDa fueron los 30 min, 6 y 24 h.

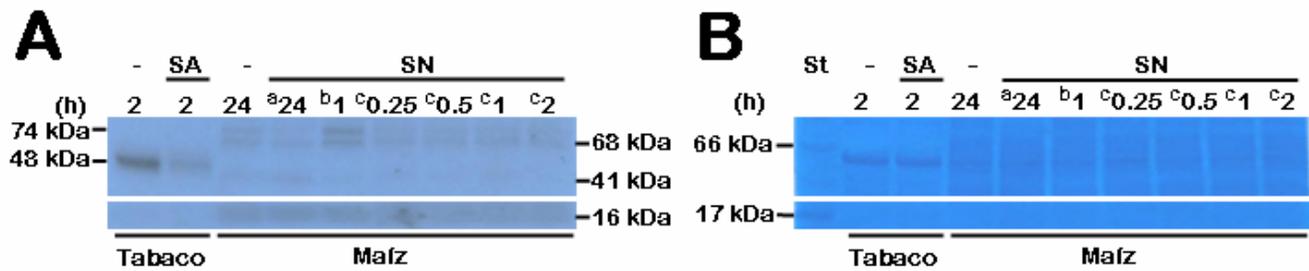


Fig. 3 Efecto de la SN *in vivo* e *in vitro* en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz. Determinación de la actividad según las condiciones de Romeis *et al.* (1999). Las hojas de tabaco se expusieron a 500 μ M de SA en los tiempos indicados (control positivo). Para maíz, la actividad de cinasas de MBP en gel se determinó a partir de: (a), fracciones solubles de embriones de maíz embebidos y expuestos 24 h a 10 μ M de SN (condición *in vivo* y exposición continua). (b), fracciones solubles de embriones de maíz embebidos 23 h en agarosa y transferidos a un medio con 10 μ M SN por 1 h (condición *in vivo*, exposición discontinua). (c), fracciones solubles de embriones embebidos 24 h en agarosa que se expusieron directamente a 10 μ M de SN por los tiempos indicados (condición *in vitro*). (A), autorradiografía expuesta 9 semanas con el gel en B. (B), gel teñido con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular. Se muestra un experimento representativo de 2 ensayos independientes.

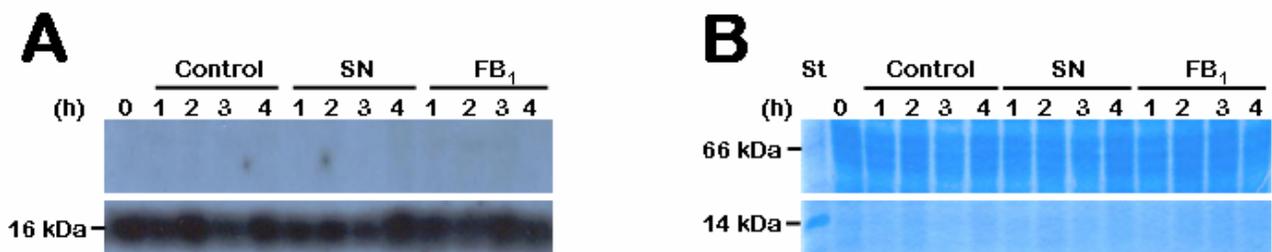


Fig. 4 Efecto de la FB₁ y SN en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz. Introducción de PMSF en el medio de obtención de las fracciones solubles. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de embriones de maíz embebidos 23 h y luego expuestos a 10 μ M de SN o FB₁ por los tiempos indicados. (A), autorradiografía expuesta 9 semanas con el gel en B. (B), gel teñido con azul de Coomassie. St estándares de masa molecular. Se muestra un experimento representativo de 4 ensayos independientes.

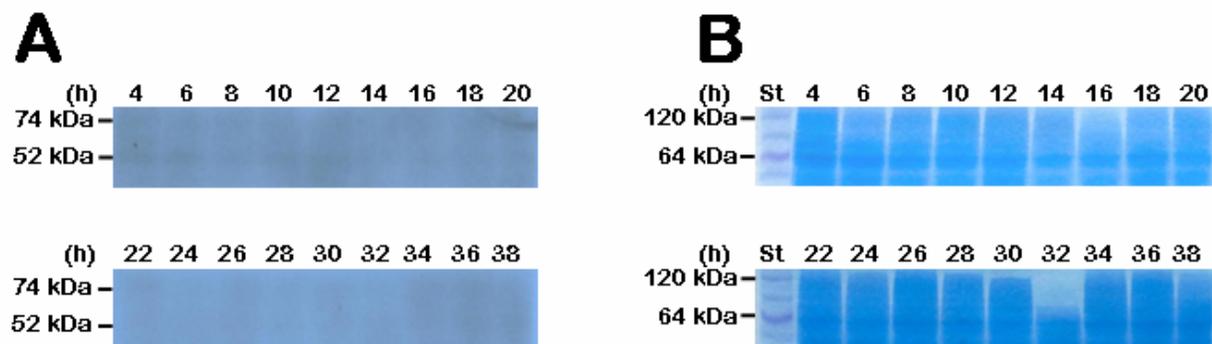


Fig. 5 Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma continua a la FB₁. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de embriones de maíz embebidos en presencia de 10 μ M de FB₁ en los tiempos indicados. (A), autorradiografía expuesta 8 semanas con el gel en B. (B), gel teñido con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular. Se muestra un experimento representativo de 2 ensayos independientes.

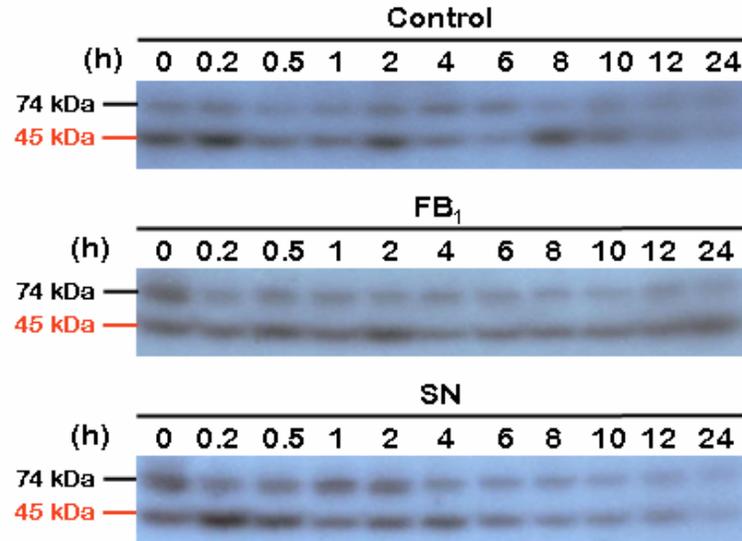
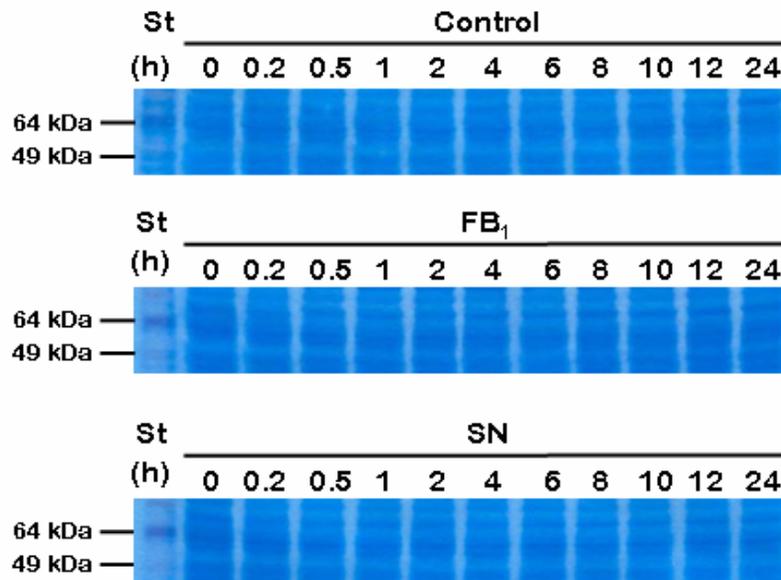
A**B**

Fig. 6 Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma discontinua a la FB₁ o SN. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de embriones de maíz embebidos 23 h y luego transferidos a un medio con 40 μ M de FB₁ o SN por los tiempos indicados. (A), autorradiografías expuestas 2 semanas con los geles en B. (B), geles teñidos con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular. Se muestra un experimento con tiempos continuos, teniéndose 3 réplicas con algunos de los tiempos incluidos.

La exposición discontinua de los embriones de maíz también se utilizó para evaluar la activación temporal de MAPKs por efecto de la SN (Fig. 6A). Al comparar la autorradiografía de los embriones de maíz embebidos en condiciones control y la obtenida para los embriones de maíz expuestos a la SN se observó que la cinasa de MBP de 45 kDa presentó un alto nivel de actividad a los 30 min y 4 h. En la

autorradiografía además se observó que a diferencia del efecto de la FB₁ a tiempos largos, la SN no incrementó la actividad de la cinasa de 45 kDa. Esta fue la principal diferencia entre los dos compuestos. En todos los casos, se observó también la activación de una banda de 74 kDa que presentó un patrón diferencial de fosforilación a lo largo de la cinética de activación.

8.3. Efecto de la concentración de la fumonisina B₁ o esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz

Una vez identificado el efecto activador de la FB₁ o SN sobre las cinasas de MBP, se evaluó el efecto de la concentración de estos dos compuestos a los 30 min de exposición, en el que se presentó una de las máximas actividades para ambos compuestos. A diferencia del experimento anterior (Fig. 6) en el que los embriones de maíz fueron expuestos a concentraciones altas (40 µM) de FB₁ o SN, ahora se estudiaron 0.4, 4.0 y 40.0 µM.

Como se muestra en la Fig. 7A, el nivel de fosforilación de la MBP mediada por la proteína de 45 kDa para la condición control fue muy alto e incluso mayor en comparación con cualquier compuesto de estudio, lo cual hace difícil la evaluación del efecto de los compuestos. Sin embargo, se compararon los niveles de fosforilación entre las concentraciones de cada compuesto. En la exposición de los embriones de maíz a distintas concentraciones de FB₁ se observó un mayor nivel de fosforilación en la concentración menor utilizada, a diferencia de mayores concentraciones del mismo compuesto. Sin embargo, es claro que el nivel de fosforilación, aún a 0.4 µM no fue mayor al que se presentó en la condición control. En este experimento se sobrecorrió el gel durante la electroforesis, lo que, junto con la gran incorporación de ³²P, permitió visualizar en la autorradiografía una tercera banda de 41 kDa cuya fosforilación se incrementó durante el tratamiento con la FB₁, siendo también mayor a la menor concentración probada. Se observó también claramente la fosforilación de MBP por la cinasa de 74 kDa.

En la exposición de los embriones de maíz a la SN a las mismas concentraciones que para la FB₁; nuevamente se observó que 0.4 µM fue la concentración en la que se presentó el mayor nivel de fosforilación de la MBP de la cinasa de 45 kDa. Sin embargo, la proteína de 41 kDa, que también incrementó su nivel de fosforilación en presencia de esfinganina, mostró un mayor nivel de fosforilación a concentraciones más altas (4.0 y 40.0 µM).

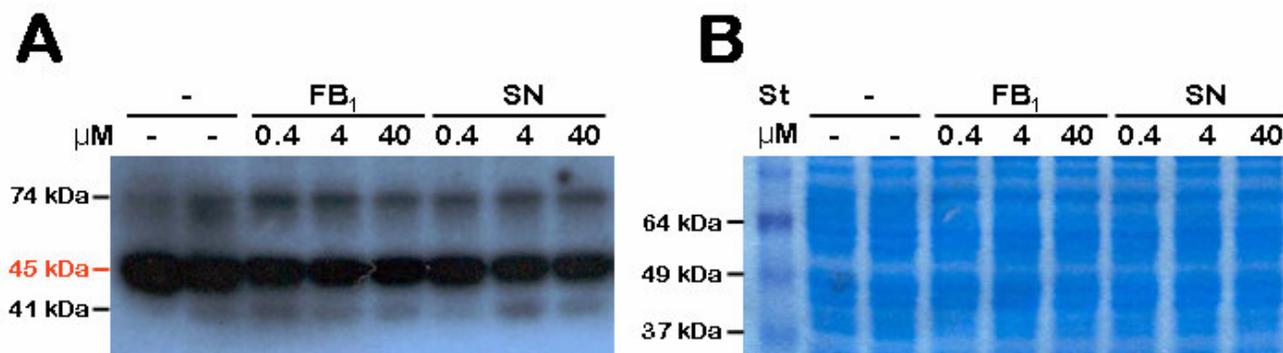


Fig. 7 Efecto de la concentración de la FB₁ o SN en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma discontinua. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de embriones de maíz embebidos 23 h y luego transferidos y expuestos 30 min a un medio con 0.4, 4.0 ó 40 µM de FB₁ o SN. (A), autorradiografía expuesta 2 semanas con el gel en B. (B), gel teñido con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular.

8.4. Evaluación de la actividad de las cinasas de MBP de embriones de maíz sobre otros sustratos

Las MAPKs son proteínas que fosforilan a sus sustratos en residuos de Ser/Thr localizados en regiones ricas en Pro, por lo que el uso de la MBP (que posee esta característica estructural) como sustrato resulta idóneo para el estudio de su activación.

La sustitución de la MBP por caseína o histona en el ensayo en gel para detectar actividad de MAPKs, resulta de gran utilidad para distinguir si las cinasas de MBP fosforilan de manera inespecífica a diferentes sustratos de cinasas. Tanto la caseína como la histona carecen de residuos fosforilables en regiones ricas en Pro, de manera que su uso permite hacer una clara discriminación entre MAPKs y otras cinasas.

Otro método alternativo e indirecto de identificar a cinasas de MBP como MAPKs, es el ensayo de actividad en gel en ausencia de cualquier sustrato para evaluar la capacidad de autofosforilación de las cinasas. Las MAPKs son proteínas incapaces de autofosforilarse, pues requieren estrictamente para su fosforilación de la unión con una MAPKK activadora.

Con base en estas premisas, se realizaron ensayos en gel en los que la MBP se sustituyó por caseína, histona o agua (Fig. 8), utilizando en los tres ensayos fracciones solubles de embriones de maíz expuestos o no a 40 μ M FB₁ o SN durante 30 min.

En las autorradiografías, se observó que las cinasas de MBP de 45 y 41 kDa no fueron capaces de fosforilar a la caseína o histona y que además no se autofosforilaron. Por su parte, la cinasa de MBP de 74 kDa, aparentemente sí fosforiló a la caseína e histona y tuvo capacidad de autofosforilación, sugiriendo que no se trata de una MAPK.

8.5. Reconocimiento de las proteínas solubles de embriones de maíz expuestos a la fumonisina B₁ o esfinganina por anticuerpos anti-ERK1/2 o anti-phospho-ERK1/2

Una vez observada la activación de dos cinasas específicas de MBP de 45 y 41 kDa en embriones de maíz expuestos a la toxina y a la LCB, se procedió a realizar una inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra ERK1/2 (Fig. 9A) o phospho-ERK1/2 (Fig. 9B). Las ERK1/2, son MAPKs de animales que responden a varios estímulos, particularmente a sustancias mitogénicas. La familia de las ERKs tiene una alta homología a todas las MAPKs identificadas en plantas.

Para este experimento se incluyeron las fracciones solubles de embriones de maíz expuestos a 40 μ M de FB₁ o SN durante 30 min, y una fracción soluble de hojas de tabaco infiltradas con agua. En esta última especie vegetal se han descrito dos MAPKs activadas por herida.

La inmunodetección con el anticuerpo anti-ERK1/2, mostró el reconocimiento de una gran variedad de proteínas, entre las que se distinguió la presencia de dos con masa molecular idéntica a las cinasas de MBP detectadas en los ensayos en gel: 45 y 41 kDa. De igual forma, en la membrana revelada con el anticuerpo anti-phospho-ERK1/2, se observó la presencia de varias bandas, entre las que se encontraron las de 45 y 41 kDa.

La mayor diferencia entre ambas especies fue que mientras en embriones de maíz se distinguió una principal de 45 kDa, en el caso de tabaco se observó una con masa molecular de 44 kDa. De acuerdo a su masa molecular, muy probablemente se trate de la NtWIPK, la cual es la principal MAPK que responde a daño mecánico en tabaco (Zhang y Klessig, 1998).

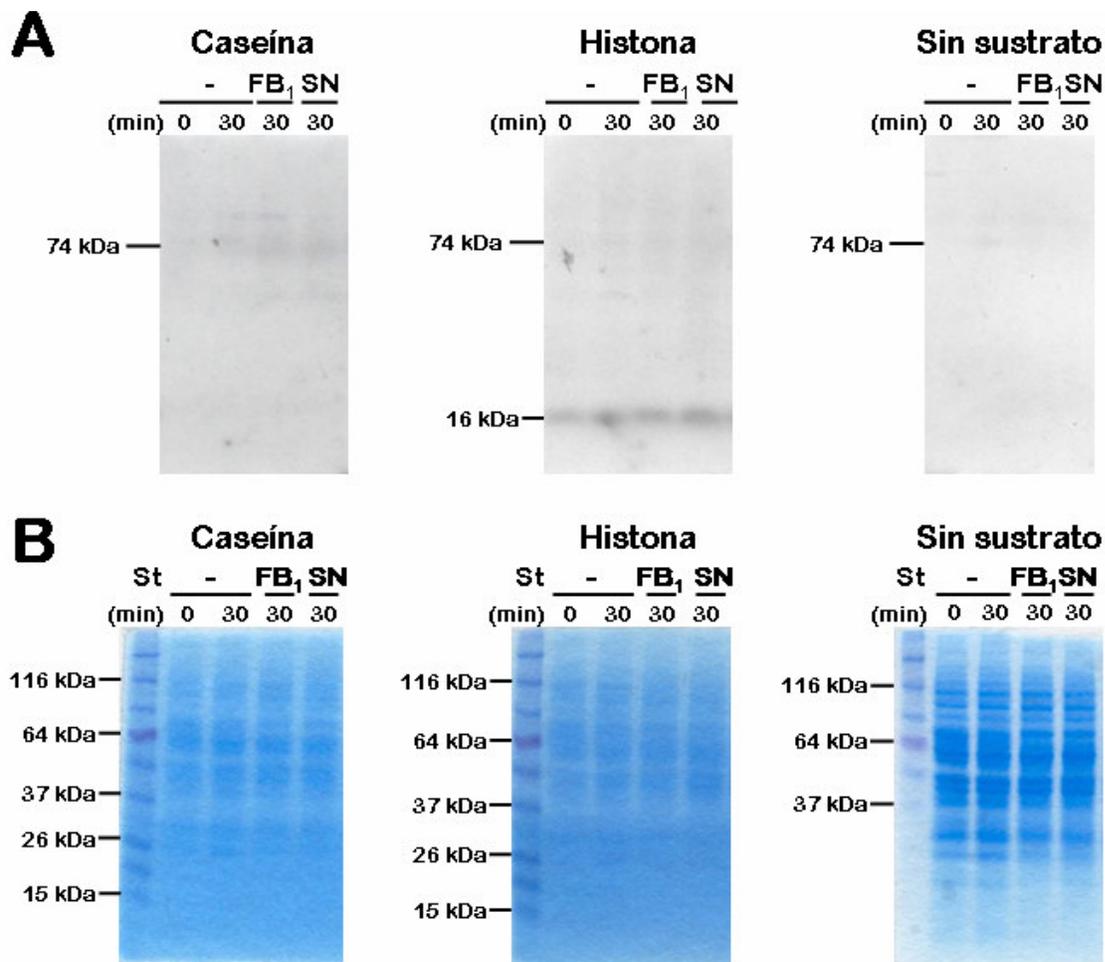


Fig. 8 Actividad de las cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos de forma discontinua a la FB₁ o SN por otros sustratos de cinasas. Fosforilación de caseína ó histona ó autofosforilación por proteínas citosólicas de embriones de maíz embebidos 23 h y luego transferidos y expuestos 30 min a un medio con 40 μ M de FB₁ o SN. (A), autorradiografías expuestas 4 semanas con los geles en B. (B), geles teñidos con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular.

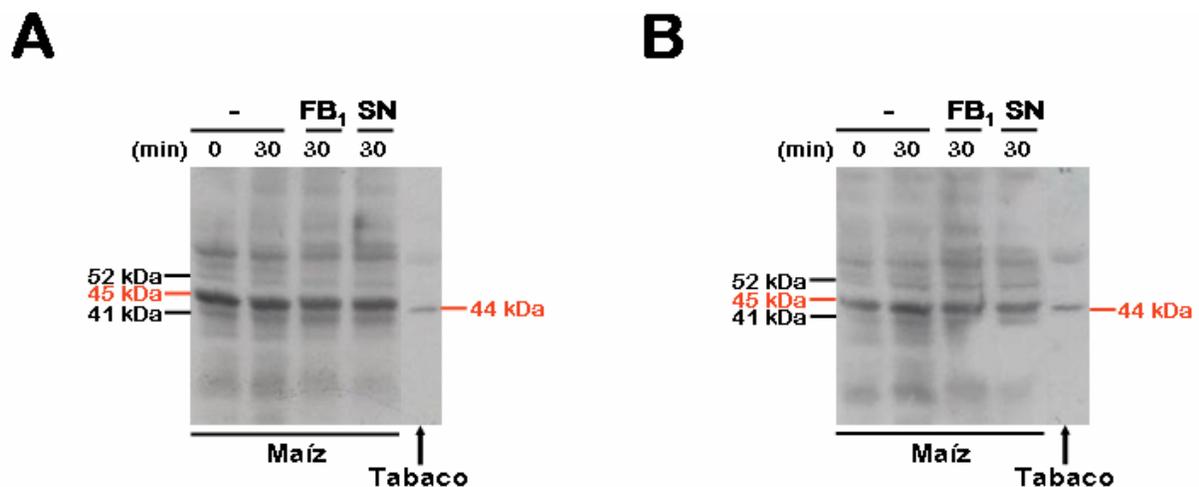


Fig. 9 Reconocimiento de proteínas de embriones de maíz expuestos de forma discontinua a la FB₁ o SN por anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-fosfo-ERK1/2. Proteínas citosólicas de embriones de maíz embebidos 23 h y luego transferidos y expuestos 30 min a un medio con 40 μ M de FB₁ o SN reveladas con anticuerpos anti-ERK1/2 (A) o anti-phosfo-ERK1/2 (B).

8.6. Efecto de la fumonisina B₁ y la esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol.

En hojas de frijol se evaluó la actividad de cinasas de MBP en respuesta a la FB₁ y SN infiltrando estos compuestos en el envés de la hoja. Los tiempos de exposición fueron 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 y 480 min. Para los grupos controles, que permitiesen evaluar la posible activación de cinasas en respuesta a estrés mecánico u osmótico, las hojas fueron infiltradas con agua o Silwet L-77 (solventes de la FB₁ y SN, respectivamente) con las mismas cinéticas.

En la Fig.10A se muestran las autorradiografías obtenidas en este experimento. En la parte superior se presenta la autorradiografía del grupo control infiltrado con agua, observándose la activación de una cinasa de MBP de masa molecular relativa de 48 kDa inducida en tiempos muy cercanos a la infiltración (5 y 10 min). En el intervalo de 30 a 480 min la activación de esta cinasa disminuyó a niveles basales (comparable al tiempo cero, sin infiltración). De manera similar a lo observado en embriones de maíz, en hojas de frijol también se activó una cinasa de MBP con masa molecular superior a los 70 kDa la cual, debido a su baja intensidad de fosforilación, no fue incluida en el análisis.

La exposición de las hojas de frijol a la FB₁ activó la misma cinasa de MBP de 48 kDa activada en el control. La cinética de activación de esta cinasa presentó diferencias con el tratamiento control, mostrando el primer incremento en el nivel de fosforilación a los 10 min, seguido de un intervalo de activación entre 45-90 min (máxima a 45 min) y un tercer incremento a los 240 min sosteniéndose hasta el último tiempo explorado (480 min).

Las fracciones solubles de hojas de frijol infiltradas con Silwet L-77 mostraron la activación de la cinasa de 48 kDa en una cinética de activación muy similar a la presentada tras la infiltración con agua (Fig. 10A). En la autorradiografía se muestra una mayor intensidad de la cinasa de 75 kDa en comparación con los tratamientos anteriores y que además respondía con activaciones a los 30, 90 y 480 min al compuesto.

El tratamiento de las hojas de frijol con SN produjo la activación de la cinasa de MBP de 48 kDa a los 30 y 45 min al compararse estrictamente con el control de Silwet.

8.7. Efecto del ácido salicílico en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol.

En hojas de tabaco se ha reportado la activación de una MAPK inducida por ácido salicílico (SIPK), que también se activa bajo estrés mecánico y por el ataque de patógenos. Debido a que en nuestros ensayos una MAPK de 48 kDa respondió tanto al daño mecánico como a la FB₁ o SN, se decidió determinar si esta cinasa respondía al SA. Para ello, las hojas de frijol fueron infiltradas con agua (control) o 1 mM SA, durante el mismo intervalo de tiempos que en los experimentos anteriores. La autorradiografía del grupo control fue la misma que para la FB₁, pues ambos experimentos se hicieron simultáneamente.

Como se observa en la Fig. 11, la cinasa de 48 kDa también fue activada por el SA con tiempos máximos de activación muy similares a los observados con la FB₁ (10 y 45 min), si bien la activación fue sostenida durante los primeros 60 min en el caso del SA.

8.8. Efecto de la concentración de la fumonisina B₁ o esfinganina en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol

Una vez detectada la actividad de la cinasa de MBP de 48 kDa inducida por los tratamientos descritos, se evaluó la capacidad de fosforilación de la cinasa de hojas de frijol infiltradas con diferentes concentraciones de FB₁, SN o SA. Las concentraciones analizadas para la FB₁ o SN fueron 0.4, 4.0 o 40 μ M; mientras que para el SA fueron 0.01, 0.1 ó 1.0 mM. Puesto que en los experimentos anteriores se detectó que 45 min fue el tiempo en el que se mostró la máxima actividad de la cinasa de MBP de 48 kDa inducida por la FB₁, SN y SA, se eligió este tiempo para la realización del experimento.

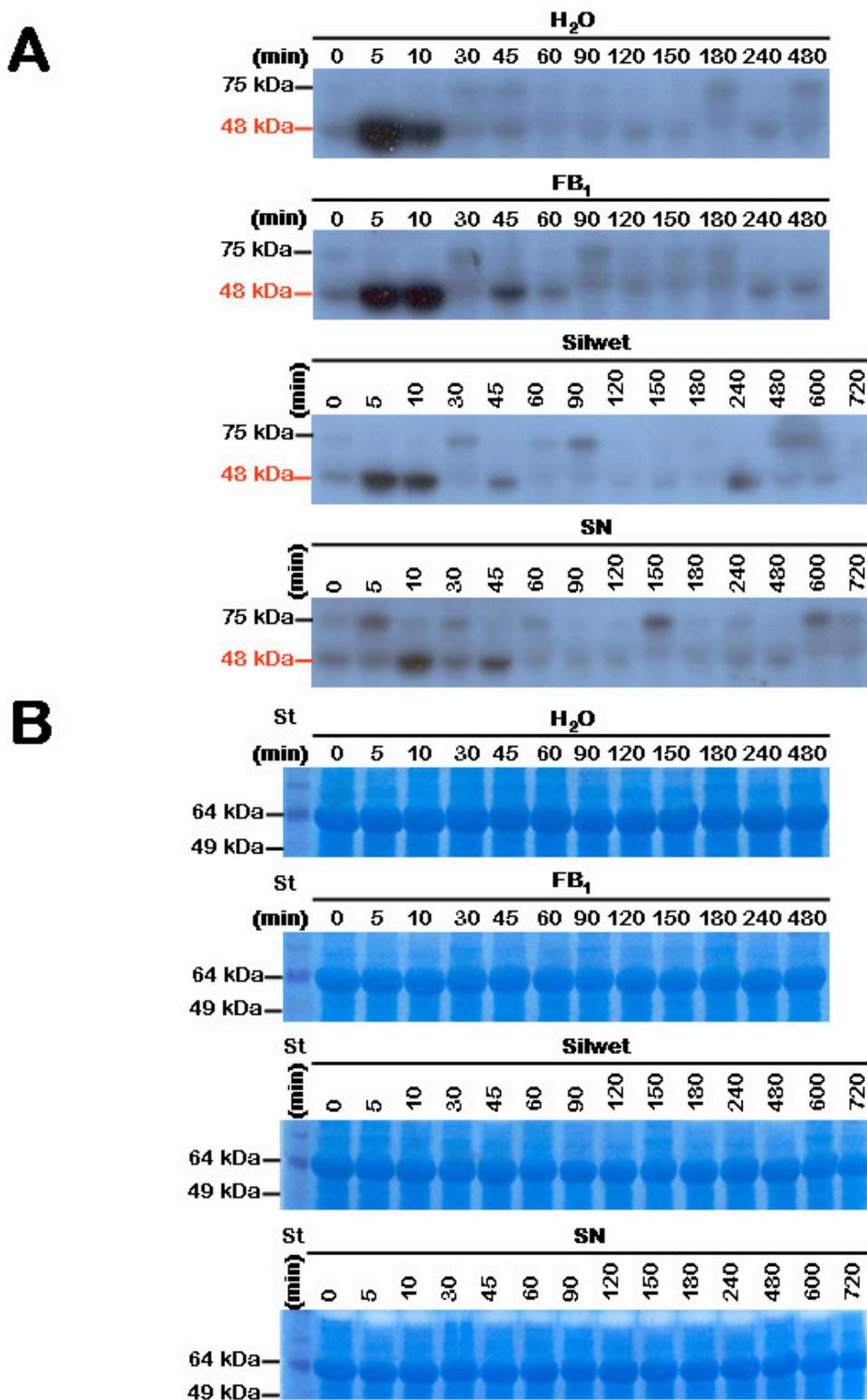


Fig. 10 Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol expuestas a la **FB₁** o **SN**. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de hojas de frijol expuestas a 40 μ M de **FB₁** o **SN** por los tiempos indicados. (A), autorradiografías expuestas 2 semanas con los geles en B. (B), geles teñidos con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular. Se muestra un experimento con tiempos continuos, teniéndose 5 réplicas con algunos de los tiempos incluidos.

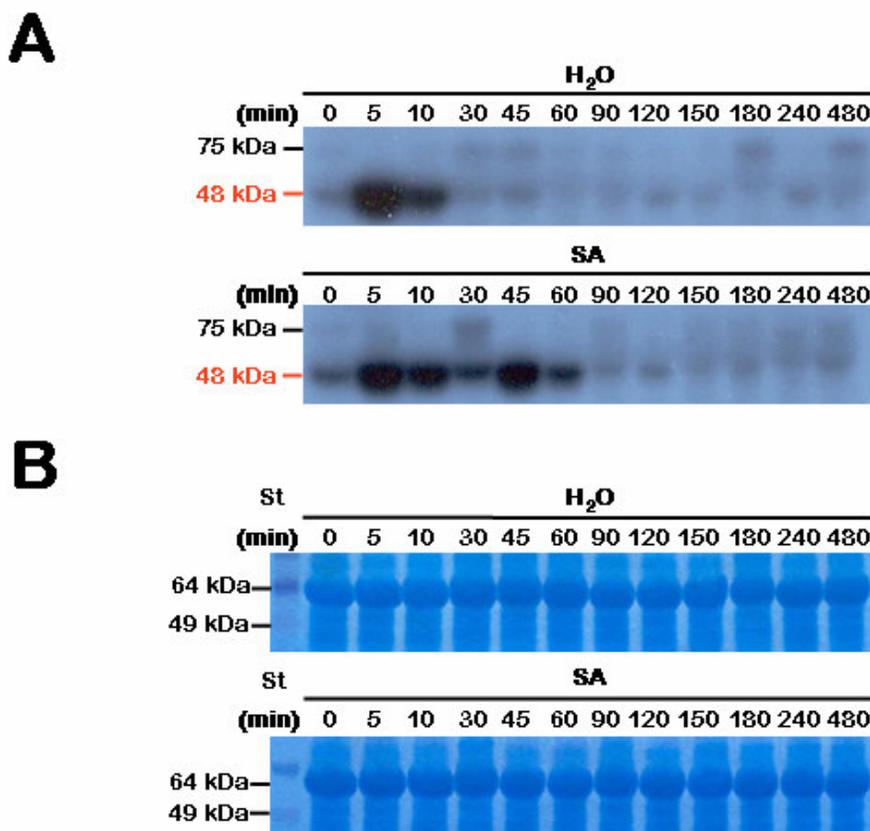


Fig. 11 Curso temporal de la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol expuestas al SA. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de hojas de frijol expuestas a 1 mM de SA por los tiempos indicados. (A), autorradiografías expuestas 2 semanas con los geles en B. (B), geles teñidos con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular. Se muestra un experimento con tiempos continuos, teniéndose 5 réplicas con algunos de los tiempos incluidos.

El sobrecorrimiento electroforético de los ensayos en gel mostrados en la Fig. 12, permitió distinguir una tercera banda fosforilada con masa molecular de 44 kDa.

En la condición control en el que las hojas fueron infiltradas y expuestas con agua durante 45 min, se observó una baja activación de las cinasas de 48 y 44 kDa. El tratamiento de las hojas con la FB₁ activó las mismas cinasas de 48 y 44 kDa; sin embargo la activación de estas cinasas fue diferencial con respecto a la concentración, pues al incrementarse la concentración de la toxina, aumentó el nivel de fosforilación de ambas cinasas. La exposición de las hojas a diferentes concentraciones de SA activó preferencialmente a la cinasa de 48 kDa, manteniéndose constante su actividad en las diferentes concentraciones analizadas. La cinasa de 44 kDa también se activó por SA; sin embargo, la activación ocurrió en las concentraciones 0.01 y 1 mM. Con respecto al tratamiento con silwet (control para la exposición con SN), se observó una baja activación de las cinasas de 48 y 44 kDa, en comparación con las intensidades de fosforilación observadas en el tratamiento con SN. La LCB fue el compuesto que produjo el mayor nivel de fosforilación en todas las concentraciones utilizadas.

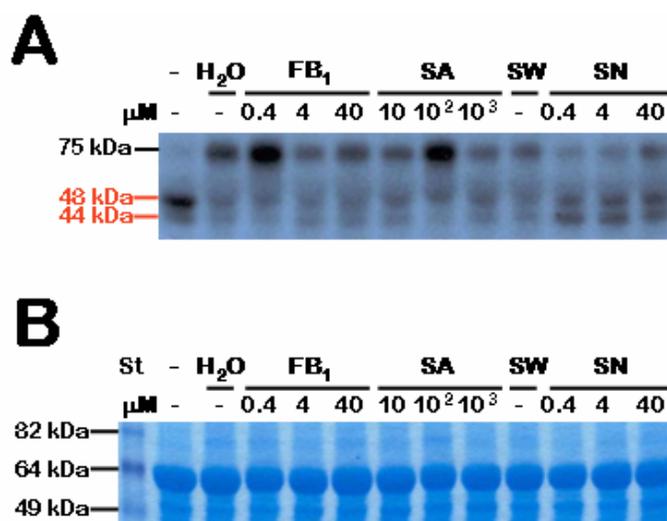


Fig. 12 Efecto de la concentración de la FB₁, SN o SA en la actividad de cinasas de MBP de hojas de frijol. Fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de hojas de frijol expuestas a ± 0.4, 4.0 o 40 μM de FB₁ o SN o 0.01, 0.1 o 1 mM SA por 45 min. (A), autorradiografía expuesta 2 semanas con el gel en B. (B), gel teñido con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular.

8.9. Evaluación de la actividad de las cinasas de MBP de hojas de frijol por otros sustratos

Para determinar si las cinasas de MBP detectadas en los experimentos anteriores en hojas de frijol correspondían a MAPKs, se realizaron ensayos en gel en los que se sustituyó a la MBP por caseína, histona o agua (Fig. 13).

En la autorradiografía del ensayo en gel con caseína se observa la fosforilación de una sola cinasa con masa molecular relativa de 61 kDa. Esta cinasa también se fosforiló cuando la MBP se sustituyó por histona o agua. Sin embargo, la intensidad de fosforilación varió de acuerdo al sustrato; la intensidad fue mayor en presencia de caseína e histona y menor en presencia de agua. Estos resultados indican que se trata de una cinasa inespecífica, que presenta afinidad por los diferentes sustratos de cinasas, y que tiene baja capacidad de autofosforilación.

8.10. Reconocimiento de las proteínas solubles de hojas de frijol expuestas a la fumonisina B₁ o esfinganina por anticuerpos anti-ERK1/2 o anti-phospho-ERK1/2

En hojas de frijol también se realizó una inmunodetección de proteínas con anticuerpos contra las ERKs de animales ERK1/2 (Fig. 14A) o phospho-ERK1/2 (Fig. 14B).

Para este experimento se incluyeron las fracciones solubles de hojas de frijol expuestas a ± 40 μM de FB₁ o SN o 1 mM de SA durante 45 min, y una fracción soluble obtenida a partir de hojas de tabaco infiltradas con agua (control positivo).

El revelado con peroxidasa de la membrana incubada con el anticuerpo anti-ERK1/2, mostró que el anticuerpo reconoció a tres proteínas con masas moleculares de 52, 48 y 44 kDa. El reconocimiento fue idéntico en la membrana incubada con el anticuerpo anti-phospho-ERK1/2. En ambas membranas se observó una menor intensidad de reconocimiento con las proteínas de 48 y 44 kDa, que con la de 52 kDa; que no se detectó en los ensayos en gel.

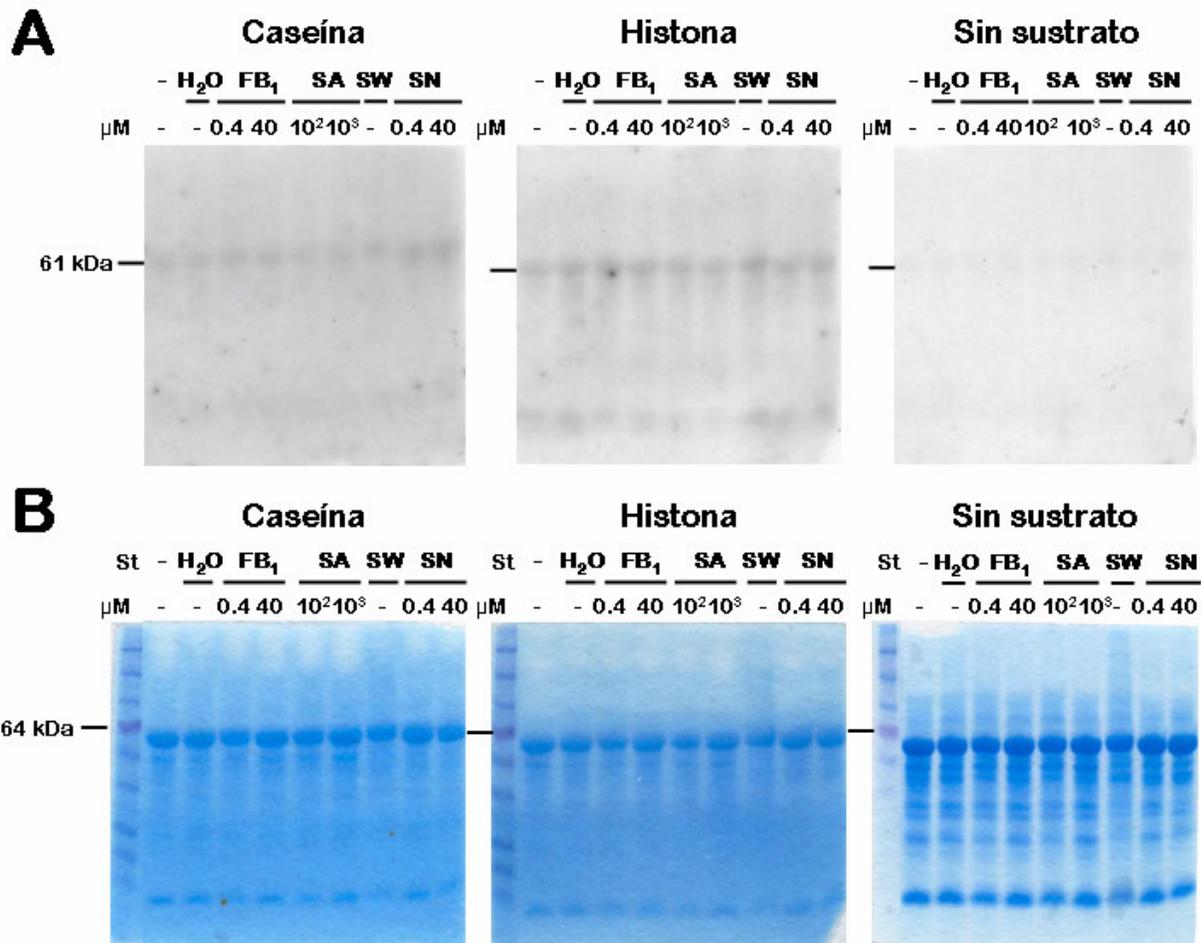


Fig. 13 Actividad de las cinasas de MBP de hojas de frijol expuestas a la FB₁, SN o SA por otros sustratos de cinasas. Fosforilación de caseína o histona o autofosforilación por proteínas citosólicas de hojas de frijol expuestas 45 min a 0.4 o 40 μM de FB₁ o SN o a 0.1 o 1 mM de SA. (A), autorradiografías expuestas 4 semanas con los geles en B. (B), geles teñidos con azul de Coomassie. St, estándares de masa molecular.

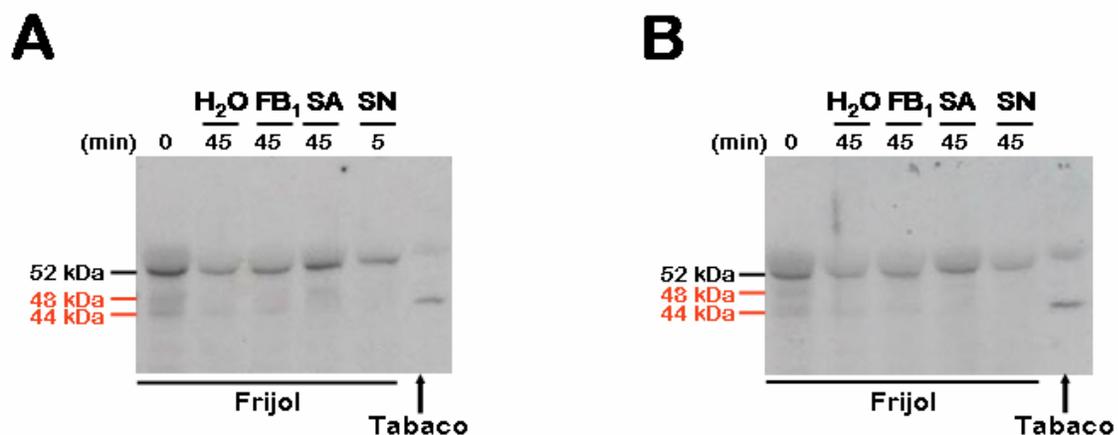


Fig. 14 Reconocimiento de proteínas de hojas de frijol expuestas a la FB₁, SN o SA contra anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-fosfo-ERK1/2. Proteínas citosólicas de hojas de frijol expuestas 45 min a 40 μM de FB₁ o SN o a 1 mM de SA reveladas con anticuerpos anti-ERK1/2 (A) o anti-fosfo-ERK1/2 (B).

9.1. El sistema experimental *in planta* para estudiar la activación de MAPKs

En plantas la caracterización de la actividad de MAPKs se apoya en evidencias experimentales derivadas del empleo de dos tipos de técnicas: el ensayo de fosforilación de la MBP en gel y detección con anticuerpos específicos contra sitios canónicos de fosforilación o contra regiones específicas de las enzimas, cuando esta información está disponible. La mayoría de los ensayos en gel con los que se ha detectado la actividad de MAPKs vegetales se ha realizado en células en suspensión (Suzuki y Shinshi, 1995; Zhang y Klessig, 1997; Lebrun-García *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; Romeis *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001; Yamagata *et al.*, 2001), en protoplastos obtenidos de hojas (Mori y Muto, 1997; Kovtun *et al.*, 2000) y en plantas transgénicas que sobreexpresan a la MAPK (Ren *et al.*, 2006; Shoresch *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Waller *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2006) y a la forma activa de la MAPKK activadora de la MAPK de estudio (Xing *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Liu y Zhang, 2004; Liu *et al.*, 2004; Hua *et al.*, 2006) o a la MAPKKK (Gray-Mitsumune *et al.*, 2006; Hadiarto *et al.*, 2006; Ichimura *et al.*, 2006; Meszaros *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2006). La baja disponibilidad de estudios de actividad de MAPKs *in planta* se debe a que estas son enzimas con actividades que requieren técnicas sensibles de detección, con pesos moleculares muy parecidos, cuya activación obedece a agobios ambientales diversos con mucha sensibilidad y que muestran cursos temporales complejos de activación (incluyendo tiempos tan cortos como 5 min y tan largos como 12 h y con patrones de varios máximos de activación), por lo que se prefiere examinar la activación de estas enzimas en condiciones en que su activación está muy controlada (accesibilidad efectiva y homogénea de las células a un único estímulo) o exacerbada (incremento de la señal detectable de activación). Si bien los estudios *in planta* resultan más complejos de interpretar, en contraste, aportan información muy valiosa en términos de la temporalidad y magnitud reales del proceso de activación, pues expresan el comportamiento de estas enzimas en un entorno celular más fisiológico. Tratándose de procesos de regulación, ésta es una ventaja que no se debe minimizar.

En este trabajo para determinar la fosforilación de la MBP, fue necesario probar diferentes condiciones, entre ellas, varias modificaciones al método de determinación de la actividad de MAPKs en gel reportado por Mora-Álvarez *et al.* (2004) para detectar la actividad de MAPKs en raíces de betabel. Tras obtener resultados negativos con esta técnica en nuestro sistema de embriones de maíz y en hojas de tabaco (usadas como control positivo), se decidió cambiar a un procedimiento reportado en hojas transgénicas de tabaco. Esta metodología fue reportada por Romeis *et al.* (1999) y diseñada para detectar con mayor sensibilidad la fosforilación de la MBP en hojas de plantas con el transgene para una proteína de resistencia de jitomate (Cf-9), después de haber obtenido resultados infructuosos con células en suspensión. En las especies utilizadas en el presente trabajo, se logró detectar con claridad y consistencia, la actividad de MAPKs en los tejidos intactos sin necesidad de ser sobreexpresadas.

La activación de MAPKs *in planta* que se describió en esta tesis para maíz, frijol y tabaco, tiene la desventaja de la activación de las enzimas en respuesta al estrés de la manipulación inicial, sin embargo, aún con ese fondo, se pudieron detectar cambios claros en la activación de MAPKs por compuestos esfingoideos en tiempos posteriores a los predeciblemente afectados por el estrés inicial de la manipulación, describiéndose así un patrón que se puede acercar más al patrón fisiológico real.

9.2. La expresión de la actividad de cinasas de MBP en la germinación requiere de ciertas condiciones fisiológicas

Si bien la exposición discontinua de los embriones de maíz a la FB₁ permitió ver la actividad de MAPKs, los resultados obtenidos no pudieron ser relacionados con otros del laboratorio generados en un sistema de exposición continua. Esto fue desafortunado, pues en este último se dispone de información referente a los niveles de bases de cadena larga endógenas y a la activación de genes de defensa en el intervalo de 6 a 32 h de exposición de embriones/ejes embrionarios a la toxina.

La única forma de ver fosforilación de MBP por proteínas de embriones de maíz con masas moleculares similares a las reportadas para MAPKs, fue embebiéndolos 23 h antes de ser expuestos a la FB₁ o SN (exposición discontinua), ya que cuando los compuestos se añadieron desde el principio de la imbibición (exposición continua), los resultados fueron siempre negativos. Estos resultados fueron inesperados, pues en embriones de maíz expuestos de manera continua a la FB₁, se había detectado un incremento en los niveles de transcritos de genes relacionados con la defensa contra patógenos como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) (Greaves, 2005) y la quitinasa ácida (SanJuan, 2001). Además, puesto que en la literatura hay evidencias que indican que se necesita la activación de MAPKs para la activación o expresión de ciertos factores de transcripción de la familia WRKY (activadores directos de la expresión de genes relacionados con patógenos) (Eulgem *et al.*, 2000), la activación de MAPKs en las mismas condiciones de germinación, era predecible.

Para explicar el resultado anterior, se propone que en las primeras horas de germinación, los embriones de maíz quizás no requieran de la activación de MAP cinasas para expresar genes de defensa. Para sustentar esta posibilidad hay que considerar los numerosos reportes de que los embriones de las semillas de muchos cereales almacenan una gran variedad de mRNAs (Sánchez y Aguilar, 1984). La función de tales mRNAs almacenados no ha sido dilucidada. También se ha descrito que estos sistemas cuentan con una maquinaria traduccional muy eficiente que puede favorecer el procesamiento de estos mRNAs hasta la síntesis de proteínas, lo cual facilita y promueve a su vez la síntesis de nuevo RNA. Estas capacidades llevarían a la síntesis de proteínas responsables de la activación transcripcional de los genes relacionados con la defensa (mismos que se han detectado en el laboratorio a 6 h de exposición a la FB₁ (SanJuan, 2001)) y cuya expresión debe ser expedita para defender a la semilla del ataque de patógenos y con ello asegurar una germinación exitosa (Sánchez, 2006). De esta manera, la célula ahorra tiempo y energía al no tener que sintetizar durante la germinación a una MAPK que active específicamente a un factor de transcripción que previamente ha sido sintetizado. A las 23 h de imbibición, aparentemente, esta condición deja de operar, quizás porque se han agotado los transcritos almacenados o bien también porque se produce la síntesis de una molécula que actúa corriente arriba de la MAPK. En un sistema similar al aquí descrito, en el que embriones de maíz germinados 20 h y expuestos luego durante 24 h al fitopatógeno *Fusarium verticillioides* (que es un productor común de FB₁), se pudo constatar, por un análisis del proteoma, la síntesis *de novo* de proteínas relacionadas con la defensa contra patógenos y con la síntesis, plegamiento y estabilización de proteínas (Campo *et al.*, 2004). Lo anterior implica que en las condiciones de exposición discontinua de los embriones de maíz a la toxina, la síntesis de proteínas está activa y que es necesaria la síntesis de nuevas proteínas para que los embriones de maíz sostengan respuestas de defensa. Entre estas proteínas pueden estar las mismas MAP cinasas o elementos activadores de su cascada.

9.3. La fumonisina B₁ activa a una MAPK de 45 kDa en embriones de maíz y a una de 48 kDa en hojas de frijol

Si bien la FB₁ es considerada como un agente abiótico, pues no es una molécula sintetizada por todos los organismos invasores de plantas, actúa como agente biótico en *Arabidopsis*, ya que la exposición de estas plantas a la toxina, desencadena las vías de defensa clásicas que se producen por evocadores derivados de patógenos e induce además, muerte celular (Asai *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2000).

El análisis de la activación de las cinasas de MBP en embriones de maíz u hojas de frijol inducida por la FB₁, requiere de la consideración de que la toxina puede estar actuando per se y/o a través de su acción de inhibir a la esfinganina *N*-acil transferasa (SAT) (Merrill *et al.*, 2001).

La exposición de los embriones de maíz a la FB₁, produjo la activación de una cinasa de MBP de 45 kDa que de acuerdo a la especificidad de sustrato y a su inmunodetección con anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-phospho-ERK1/2, se trata de una MAPK. La cinética de activación de la MAPK de 45 kDa en respuesta a la FB₁ mostró tres picos (30 min, 6 y 10-24 h).

La infiltración de hojas de frijol con FB₁ también indujo la activación de una cinasa de MBP de 48 kDa, misma que no presentó actividad cuando los ensayos en gel se realizaron con caseína o histona. Esta cinasa fue reconocida por los anticuerpos anti-ERK1/2 y anti-phospho-ERK1/2, de manera que se concluye que se trata de una MAPK también. Curiosamente, la exposición de las hojas de frijol a la micotoxina también produjo una cinética de activación trifásica (10, 45 y 4-8 h), si bien el intervalo de tiempo en el que se estudió la activación de las MAPK no fue idéntico al que se realizó en embriones de maíz.

La cinética de tres picos de activación en ambas cinasas, la de maíz y la de frijol, podría significar que cada una de las fases de activación obedece a eventos diferentes corriente arriba y también es capaz de desencadenar eventos específicos corriente abajo que conducen a respuestas fisiológicas diferentes. Estas posibilidades se abordan en secciones posteriores de la discusión.

Con respecto a la primera activación, en la literatura está ampliamente documentado que la rápida activación de las MAPKs se produce principalmente por un estrés de tipo abiótico (Zhang y Klessig, 1998). En nuestro caso, en las hojas de frijol infiltradas únicamente con agua, se pudo observar la rápida activación de la MAPK de 48 kDa a los 5 y 10 min.

Este resultado coincide con los resultados reportados por Zhang y Klessig (1998), en donde la infiltración de hojas de tabaco con agua produce la activación de la SIPK (48 kDa) a los 5 y 10 min. Con base a estas consideraciones, se propone que el primer pico de activación de la MAPK de 45 kDa (30 min) de maíz y de la MAPK de 48 kDa de frijol (10 min) en respuesta a la FB₁, corresponde principalmente a una respuesta a estrés mecánico u osmótico provocado por el tratamiento de infiltración. Lo anterior es relevante, ya que en plantas, la herida es un estímulo que se da por agresiones climáticas del ambiente o por el ataque de herbívoros y que resulta en la respuesta fisiológica de la planta. La SIPK y la WIPK son justamente MAPKs que responden a herida, además de patógenos (Zhang y Klessig, 1998).

El segundo pico de activación de las MAPKs en respuesta a la FB₁ se presentó en un tiempo aislado, dicho de otra manera, no se mantuvo prolongadamente en un intervalo de la cinética estudiada, tanto para embriones de maíz (6 h) como para hojas de frijol (45 min). Esta actividad de la MAPK, expresada por su nivel de fosforilación, parece producirse para dar efectos fisiológicos específicos y similares en ambas especies. En la literatura es frecuente encontrar reportes de MAPKs vegetales, principalmente de especies

dicotiledóneas, que responden a evocadores derivados de patógenos a tiempos entre los 45-60 min (Lebrun-García *et al.*, 1998; Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999; Desikan *et al.*, 2001). Esta analogía sugiere que en el segundo punto de activación de la MAPK inducida por FB₁ en las dos especies vegetales, la MAPK está ya involucrada en reacciones de defensa. En el presente trabajo no se obtuvieron evidencias experimentales sobre el mecanismo mediante el cual se llega a la activación de la MAPK encontrada, ni del efecto o efectos que esta activación está produciendo corriente abajo. Sin embargo, por resultados recientes en los que se detectó en hojas de frijol un aumento en los niveles de LCBs en respuesta a la FB₁ a los 30 min (Palacios, 2007), se puede especular que las LCBs, que tienen función señalizadora en vías transductoras en animales (Hannun y Obeid, 1995; Fantini *et al.*, 1997; Merrill *et al.*, 1997; Kolesnick y Krönke, 1998; Spiegel, 1999; Maceyka *et al.*, 2002) y en plantas (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2003; 2005), están mediando esta segunda activación de las MAPKs. Esta posibilidad se apoya en el hecho demostrado en este trabajo de tesis, de que la MAPK inducida por la toxina en ambas especies vegetales, también responde a la esfinganina añadida exógenamente. Dicha LCB se seleccionó a partir de resultados en embriones de maíz que indicaban que ésta era, junto con la fitoesfingosina, una de las principales bases acumulada en respuesta a la toxina FB₁ (por exposición continua) (Rivas, 2001; Gutiérrez, 2005). Actualmente, se está investigando en el laboratorio la cinética de acumulación de las LCBs inducida por la FB₁ en embriones de maíz expuestos de forma discontinua y en hojas de frijol.

La cinética de activación de las MAPKs de maíz (45 kDa) y de frijol (48 kDa) en respuesta a la SN exógena, presentó una importante diferencia con respecto a la producida por la FB₁: tuvo un comportamiento bifásico.

Curiosamente, los tiempos en los que se observó la activación de las MAPKs de maíz (30 min y 4 h) y frijol (10 y 45 min) en respuesta a la SN exógena, fueron muy similares a los que se observaron en el tratamiento con FB₁ (30 min y 6 h en maíz; 10 y 45 min en frijol). Ya se mencionó la propuesta de que el primer pico de activación producido por la infiltración de la toxina o de la SN corresponde a un daño de tipo mecánico u osmótico. El tiempo en el cual ocurre el segundo pico de activación por SN observado en las MAPK (de 45 y 48 kDa) y que coincide prácticamente con el producido por la FB₁ en cada especie sugiere un mecanismo de activación común a ambos compuestos.

Un mecanismo posible es que la activación esté dada por la LCB, ya sea la exógena que se añade, o la endógena que se acumula por la acción de la toxina sobre la esfinganina *N*-acil transferasa. En frijol, la accesibilidad de las células a la FB₁ y a la SN es más rápida por el proceso de infiltración, mientras que en los embriones de maíz, la difusión de los compuestos desde el agar hasta el embrión puede ser más lenta. Esta diferente cinética de disponibilidad puede explicar que en el caso de maíz la SN produzca la activación a las 4 h mientras que la FB₁ lo logra hasta las 6 h, cuando alcanza concentraciones inhibitorias en el RE. Sin embargo, una segunda posibilidad que puede contemplarse para la segunda activación de las MAPK no tiene que ver con un aumento de LCBs endógenas y sí con que la FB₁ y la SN sean percibidas por la célula como evocadores derivados de patógenos. La infiltración de hojas de frijol con SA, conocido por activar a una MAPK de tabaco (SIPK) que responde a patógenos (Zhang y Klessig, 1998), también activó a la MAPK de 48 kDa de hojas de frijol a los 45 min. Este resultado sugiere que ambos compuestos son reconocidos como evocadores generales, pues el ácido salicílico no es un evocador específico implicado en el modelo gen-por-gen, de manera que el mecanismo de activación de la MAPK

por FB₁ o SN podría ser similar al producido por el SA. Por otra parte, se ha determinado que la toxina es capaz de producir cambios en proteínas de la membrana plasmática (Carmona, 2006; Rodríguez, 2006; Vázquez, 2007) y ésta es capaz de alojar hasta 10 veces más de SN que el control no expuesto a la toxina (Gutiérrez, 2005).

Un punto muy importante que surge de la evidencia de que el SA active a la MAPK de 48 kDa que es también inducida por FB₁ o SN es que esta MAPK puede ser un ortólogo de la NtSIPK. La determinación de los niveles de LCB intracelulares en las condiciones de activación de las MAPKs por infiltración con la toxina o con la SN puede ayudar a discernir entre las dos posibilidades.

Como se mencionó anteriormente, tanto en embriones de maíz como en hojas de frijol expuestos a la FB₁, se presentó un tercer tiempo de activación de las MAPKs. A este respecto, se sugiere que en este período de activación, las MAPKs están involucradas directamente en la HR-PCD.

En embriones de maíz expuestos continuamente a la FB₁, no es posible observar un fenotipo de HR; sin embargo, tras la adición de FB₁ se han detectado marcadores de la PCD tales como la fragmentación del DNA y la activación de endonucleasas dependientes de Ca²⁺ y (Alcántara, 1998; De la Torre *et al.*, 2003). En el caso de las hojas de frijol, la infiltración con FB₁ sí produce lesiones similares a la HR. Curiosamente, este fenotipo no se reproduce cuando se infiltra SN exógena (Palacios, 2007).

De resultar cierta esta asociación MAPKs-HR, es probable que la perturbación en la síntesis de los esfingolípidos inducida por la toxina esté promoviendo la muerte celular a través de mecanismos que involucren a los esfingolípidos, ya sea a nivel estructural en la membrana mitocondrial (Siskind *et al.*, 2006; Elrick *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2006) o como mediadores en las vías pro-muerte celular (Daido *et al.*, 2004; Scarlatti *et al.*, 2004; Bedia *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2006).

En este trabajo también se estudió la activación de las MAPKs de embriones de maíz y hojas de frijol en respuesta a diferentes concentraciones de FB₁ y SN. En general, de estos resultados no se pudo concluir algo de relevancia, pues para ambas especies, la condición control presentó una alta actividad de la MAPK, lo cual impidió realizar un análisis estricto. Sin embargo, de los resultados se pudo extraer una información de gran interés: la detección de la activación de una MAPK de 44 kDa en hojas de frijol. El SA también activó a esta misma MAPK. Comparado con lo reportado en la literatura para las MAPKs de tabaco, lo anterior indica que las MAPKs que responden a SA en frijol parecen ser muy similares a las de tabaco: en su capacidad de respuesta a herida, a evocadores y en su masa molecular (Zhang y Klessig, 1998), reforzando la propuesta de que estas MAPKs activadas por FB₁ y SN son ortólogos de la NtSIPK y NtWIPK, mismas que como ya se ha reiterado, participan en vías transductoras de defensa contra patógenos.

Un dato interesante asentado en la literatura, es que la NtWIPK es una MAPK que se induce por evocadores a tiempos prolongados (del orden de 4 a 8 h) en células en suspensión de tabaco. La activación de esta MAPK ocurre a tiempos largos, ya que requiere primero de una activación post-transcripcional, mediada por la rápida y sostenida activación de la NtSIPK. La activación de la NtWIPK es el evento corriente arriba que acelera el desarrollo de la HR en plantas de tabaco (Liu *et al.*, 2003). Sería conveniente repetir el ensayo de cinética de activación de las MAPKs de hojas de frijol infiltradas con FB₁ ó SN, en condiciones en que se pueda evaluar la activación de la MAPK de 44 kDa, la cual suponemos, se trata de un ortólogo de la NtWIPK y por tanto, tendría que activarse a tiempos largos.

9.4. El posible mecanismo de activación de la MAPK por las bases de cadena larga y su participación en la conformación de una nueva vía de transducción en respuesta a patógenos en plantas

A diferencia de otros modelos vegetales, en las especies utilizadas en este trabajo de tesis se tiene información escasa que permita esbozar con certidumbre el probable mecanismo de acción a través del cual la adición de FB₁ o SN resulta en la activación de MAPKs. Por ello, el modelo que a continuación se presenta, se basa en resultados reportados en la literatura tanto en tejidos vegetales como en animales y si bien resulta un tanto especulativo, constituye un ejercicio que trata de integrar tales datos y los propios y de proponer nuevos componentes, cuya participación queda sujeta a experimentación posterior. Ya que las evidencias obtenidas sugieren que las MAPKs activadas son ortólogas de otras bien identificadas en vías de transducción de defensa ante patógenos, este modelo se ubica en este contexto y es resumido en la Fig. 15.

Se ha abundado anteriormente en que la primera fase de activación de la MAPK es consecuencia de una vía de señalización de respuesta a herida. El segundo pico de actividad de la MAPK en los dos sistemas vegetales podría ser resultado de la activación de la cascada a partir de la interacción de la MAPKKK con la LCB. Se ha reportado que algunos componentes de MAPKKK de animales son capaces de unirse a lípidos, específicamente a ceramida, a través de los dominios PH, (Huwillier *et al.*, 1996; van Blitterswijk *et al.*, 2003; Huwillier *et al.*, 2004), por lo que es probable que también algunas MAPKKKs vegetales tengan conservado este dominio y sean capaces de unirse a las LCBs, cuyos niveles endógenos se encuentran incrementados y concentrados en el RE como consecuencia de la inhibición de la SAT mediada por la FB₁ en nuestro sistema experimental. Tal posibilidad estaría apoyada por los altos niveles de fitoesfingosina detectados en la fracción microsomal tras la adición de la FB₁ a los embriones de maíz (Gutiérrez, 2005). Es también posible, como se mencionó anteriormente, que la MAPKKK sea activada a partir de un evento de interacción de la toxina o la SN con un receptor membranal. Posteriormente, seguiría el transporte de la MAPKKK hacia el RE, pues en la literatura se ha demostrado que una MAPKKK de *Arabidopsis* (CTR1), es capaz de dirigirse hacia este sistema membranal y asociarse a través de su interacción con un receptor (Gao *et al.*, 2003). La subsecuente activación de la MAPKK y la MAPK llevarían a la expresión de genes de defensa a través de la activación de factores de transcripción. De esta manera, la función de la segunda activación de la MAPK llevaría al establecimiento de la inmunidad innata, la cual es una defensa sistémica. Por ello, la activación de la MAPK induciría indirectamente la señal de larga distancia que se transmite a todos los tejidos, para asegurar la sobrevivencia de la planta (Truman *et al.*, 2007). A este respecto, en la literatura se ha demostrado que la infiltración de la FB₁ en las hojas bajas de *Arabidopsis* produce la expresión de genes relacionados a patógenos en las hojas superiores (Stone *et al.*, 2000), quedando de manifiesto el transporte de una señal que promueve la expresión de genes que podría estar mediada corriente arriba por una MAPK.

El H₂O₂ se ha propuesto como la molécula señal que se transporta al tejido sistémico para producir la inmunidad innata y recientemente se ha propuesto como una posible señal de pro-sobrevivencia (Torres *et al.*, 2005). El H₂O₂ es uno de los primeros componentes en producirse ante la presencia de patógenos. La síntesis del H₂O₂ puede ocurrir por varias vías. Una de ellas es a través de una peroxidasa de la pared celular y otra de las vías está mediada por la actividad de la NADPH oxidasa a nivel de la membrana plasmática (Neill *et al.*, 2002). Aún no se ha dilucidado la temporalidad en la que ocurren estas dos actividades en respuesta a patógenos; sin embargo, algunos reportes sugieren que la rápida síntesis de

H₂O₂, que ocurre en los primeros minutos después de haber detectado la presencia de evocadores, es mediada por la peroxidasa y que a tiempos más largos, la síntesis de H₂O₂ esté mediada por la NADPH oxidasa (Bindschedler *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de algunos componentes de cascadas de MAP cinasas vegetales promueve la síntesis de H₂O₂ a través de la actividad de la NADPH oxidasa (Yang *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003; Nakagami *et al.*, 2006), por lo que también es probable que sea la activación de MAP cinasas, la que promueva la expresión del gen de la NADPH oxidasa y que esta proteína sea la responsable de producir el H₂O₂ a tiempos más largos después de que la célula haya detectado la presencia del agente invasor.

Además de la expresión de genes de defensa o de la posible señal pro-sobrevivencia, la activación de la MAPK también podría estar incrementando la expresión de componentes de la autofagia, como por ejemplo la *BECLINA 1*, pues se ha demostrado que la expresión de este gen ocurre a tiempos muy tempranos después de infectar hojas de tabaco con el TMV. La beclina 1 es un componente que se requiere para restringir la expansión de la muerte celular hacia tejidos sistémicos no infectados (Liu *et al.*, 2005), de manera que en este caso, la autofagia tiene también una función de sobrevivencia.

Una vez que las señales de sobrevivencia han sido derivadas de las células tras su contacto con el agente invasor o sus productos (FB₁), comenzaría la marcha hacia una muerte celular programada altamente localizada en las células dañadas, para de esta manera asegurar que las células vecinas intactas no sean blanco del mismo agente invasor. En este proceso podría estar participando la activación de las MAPKs como un mecanismo de regulación en el que estaría implicada la fosforilación de proteínas de la familia Bcl-2 (Stoica *et al.*, 2005), o bien podría estar incrementándose la expresión de la *VPE*, pues en plantas de *Arabidopsis* con la expresión silenciada de las cuatro isoformas de *VPE*, no hay muerte celular en respuesta a la FB₁ (Kuroyanagi *et al.*, 2005); además, en hojas de tabaco con la *VPE* silenciada, no se produce muerte celular en respuesta al TMV y se mantiene un incremento de la expresión de los genes de defensa (Hatsugai *et al.*, 2004), de manera que la *VPE* sólo afecta el establecimiento de la muerte celular. *VPE* es una proteína que se ha propuesto se asocia a componentes de la autofagia (Patel *et al.*, 2006). En la actualidad se desconoce el tipo de muerte celular que está ocurriendo en las células infectadas, una de las posibilidades es que se trate de una muerte por autofagia. En células de mamíferos se ha demostrado que la activación de la JNK, MAPK asociada a muerte celular apoptótica en respuesta a diferentes tipos de estrés, se requiere para el establecimiento de la autofagia pro-muerte y no para la autofagia pro-sobrevivencia (Tsujiimoto y Shimizu, 2005). También se ha reportado que la S1P puede producir autofagia de tipo letal (Lavieu *et al.*, 2006). Con lo mencionado, se puede sugerir que en plantas también se requiere de las MAPKs activadas por esfingolípidos para inducir la autofagia pro-muerte.

Sin embargo, no se puede descartar que los esfingolípidos estén promoviendo la PCD a través de un efecto estructural en las membranas, pues como ya se había mencionado, la ceramida y la esfingosina pueden formar poros muy estables en la membrana externa de la mitocondria y con ello favorecer la liberación del citocromo c (Siskind *et al.*, 2006; Elrick *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2006), el cual es un marcador clásico de la apoptosis en animales y de la muerte similar a la apoptosis que ocurre en tejidos vegetales.

La identificación molecular de las MAPKs descritas en el presente trabajo y su relación con parámetros de defensa contra patógenos, en particular con las formas de muerte celular expresadas como estrategias

de protección, serán las aproximaciones que demostrarán la participación de estos elementos transductores en vías activadas por esfingolípidos en plantas.

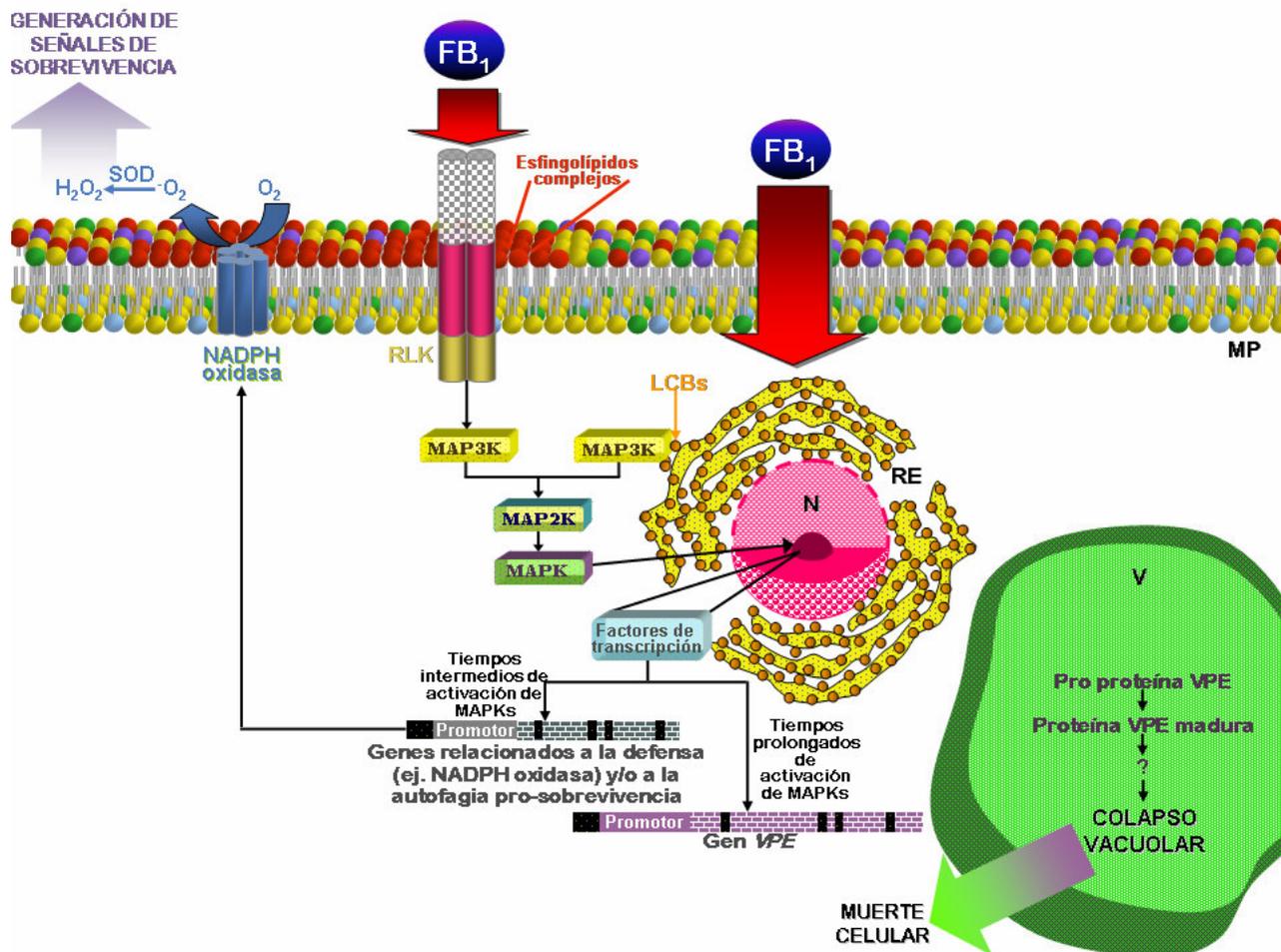


Figura 15. Modelo del posible mecanismo de acción de la FB_1 en embriones de maíz y hojas de frijol.

La MAPK de embriones de maíz (45 kDa) y de hojas de frijol (48 kDa) activada por la FB_1 probablemente desencadene respuestas diferentes en cada tiempo de activación. El primer pico de activación puede estar relacionado con cambios producidos por daño mecánico u osmótico y entonces la MAPK participa en una vía de señalización a herida o a estrés mecánico. La segunda activación de la MAPK, ya estaría implicada en las reacciones de defensa; en el modelo se propone que la activación de la MAPK ocurre a través de la activación de la MAPKKK por las LCBs acumuladas en el RE, o bien por una vía de señalización iniciada por la interacción de la toxina o la SN exógena con un receptor o proteína membranal. La activación de la cascada de MAP cinasas conduciría a la activación de genes y/o factores de transcripción que estimulan la transcripción de genes de defensa o de genes de una autofagia pro-sobrevivencia (genes *ATG*), cuya expresión genera las señales correspondientes que se transportarían a las células vecinas que no han sido infectadas directamente con la FB_1 , promoviendo así la inmunidad innata de la planta. Finalmente, en la tercera fase de activación, en la que la MAPK presenta una activación prolongada, la cinasa estaría regulando una vía que conduce a la muerte celular programada, a través de la expresión del gen *VPE*, requerido en la muerte celular que se manifiesta como HR.

10. CONCLUSIONES

- Existen MAPKs en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas que responden a bases de cadena larga endógenas y exógenas con cinéticas de activación similares. Estos resultados sugieren que las MAPKs activadas por bases de cadena larga son elementos conservados en los sistemas de transducción que responden a señales de estrés.
- Las bases de cadena larga parecen estar involucradas en diferentes vías de señalización en células vegetales.
- La MAPK de 45 kDa de embriones de maíz y la de 48 kDa de hojas de frijol activadas por bases de cadena larga son probablemente ortólogos de las NtSIPK y AtMPK6, de tabaco y Arabidopsis, respectivamente.
- La conclusión anterior abre la posibilidad de que las MAPKs reportadas en esta tesis estén involucradas en vías de señalización de defensa contra patógenos

CONCLUSIÓN GENERAL

- Existen MAPKs en mono y dicotiledóneas que son activadas por la fumonisina B₁ y una base de cadena larga, esfinganina.

11. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados aquí descritos, surgen varias interrogantes. Una de ellas es definir el mecanismo por el cual las MAPKs de embriones de maíz y hojas de frijol están siendo activadas en respuesta a la FB₁, es decir, determinar si la activación de las MAPKs depende, por lo menos en un tiempo de activación, del incremento en los niveles endógenos de las bases esfingoideas de cadena larga, cuya función incluye vías de señalización, o si bien, ocurre por una vía independiente de las bases esfingoideas.

La otra gran interrogante que se derivó de los resultados de este proyecto es saber qué efecto corriente abajo está promoviendo cada tiempo de activación de las MAPKs. Establecer si la activación de MAPKs se requiere a tiempos más cortos para la expresión de genes relacionados con la defensa, cuyo producto favorezca la síntesis de la posible señal que se ha sugerido se transporta a los tejidos sistémicos.

De igual forma, es muy importante determinar si la activación de la MAPK se necesita para inducir la muerte celular o por el contrario, para controlarla. Además sería de gran relevancia dilucidar el mecanismo por el cual la micotoxina promueve la muerte celular y por qué la esfinganina exógena no la produce.

Abreviaturas

ABA.....	Ácido abscísico
AP1.....	Aminopentol
AIF.....	Factor inductor de apoptosis
APAF-1.....	Factor activador de proteasas apoptóticas
aSMasa.....	Esfingomielinasa ácida
ATP.....	Adenosina trifosfato
Avr.....	Avirulencia
BI-1.....	Inhibidor I de Bax
CAD.....	ADNasa activada por caspasas
CaMK.....	Cinasa dependientes de calcio-camodulina
CAPK.....	Cinasa activada por ceramida
CDK.....	Cinasa dependientes de ciclinas
CDPK.....	Cinasa dependientes de calcio
CKII.....	Cinasa de la caseína II
DGA.....	Diacilglicerol
Dominio CD.....	Dominio de anclaje común
Dominio D.....	Dominio de anclaje
Dominio S.....	Dominio involucrado en la auto-incompatibilidad cuya función está controlada por el locus S
EGF.....	Factor de crecimiento epidermal
ERK.....	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERO.....	Especies reactivas de oxígeno
ET.....	Etileno
Flg22.....	Flagelina 22
FLS2.....	Receptor LRR que reconoce a la flagelina
GPI.....	Glicosilfosfatidilinositol
GSK.....	Cinasa de la glucógeno sintetasa
GST1.....	Glutati6n S transferasa
GTP.....	Guanosín trifosfato
H ₂ O ₂	Per6xido de hidr6geno
HR.....	Respuesta de Hipersensibilidad
HRGP.....	Glicoproteína rica en hidroxiprolina
JA.....	Ácido jasm6nico
JNK.....	Cinasa con N-terminal c-Jun
LCB.....	Base de cadena larga
LecRLK.....	RLK con motivos de lectina en su ectodominio
LRR.....	Repeticiones ricas en leucina
MAPK.....	Cinasa de proteína activada por mit6genos
MAPKK.....	Cinasa de la MAPK
MAPKKK.....	Cinasa de la MAPKK
MAPKAP.....	Cinasa de proteína activada por MAPKs
MBP.....	Proteína básica de mielina
MEK.....	MAPKK
MEKK.....	MAPKKK
MKK.....	MAPKK
MNK.....	Cinasa que interacciona con MAPKs
NO.....	6xido n6trico
nSMasa.....	Esfingomielinasa neutra
p38.....	MAPK de mamíferos con masa molecular de 38 kDa
PAL.....	Fenilalanina amonio liasa
PARP.....	poli-ADP-ribosa polimerasa
PCD.....	Muerte celular programada
PKA.....	Cinasa dependiente de cAMP
PKC.....	Cinasa dependiente de calcio-fosfolípidos
PKG.....	Cinasa dependientes de cGMP

PERK.....	MAPKs vegetales con similitud a las ERK
PP2A.....	Fosfatasa de proteína 2A
PR.....	Proteínas relacionadas a patógenos
PRK-1.....	Receptor con actividad de cinasa de polen receptor
Proteínas G.....	Proteínas de unión a GTP
PS.....	Fitoesfingosina
R.....	Resistencia
Rb.....	Proteína del retinoblastoma
RLK.....	Receptor con actividad de cinasa similar a la RPK
RPK.....	Receptor con actividad de cinasa
RSK.....	Cinasa ribosomal S6
RTK.....	Receptor con actividad de cinasa autofosforilado en Tyr
S.....	Esfingosina
S1P.....	Esfingosina-1-fosfato
SA.....	Ácido salicílico
SAM.....	Micotoxinas análogas a esfinganina
SAPK.....	Cinasa de proteína activada por estrés
SAR.....	Respuesta sistémica adquirida
SAT.....	Esfinganina <i>N</i> -acil transferasa
SERK.....	Cinasa somática en la embriogénesis similar al receptor
SIPK.....	MAPK inducida por ácido salicílico en <i>N. tabacum</i>
SH3.....	Dominio 3 con homología a Scr
SK.....	Esfingosina cinasa
SLG.....	Glicoproteína del <i>locus S</i>
SN.....	Esfinganina
SN1P.....	Esfinganina-1-fosfato
SNF1/AMP.....	Cinasa activada por azúcares no fermentables
STKR.....	Receptor con actividad de cinasa autofosforilado en Ser/Thr
SW.....	Silwet
TA.....	Toxina de <i>Alternaria alternata</i>
TMV.....	Virus del mosaico de tabaco
WIPK.....	MAPK inducida por herida en <i>N. tabacum</i>

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara S F (1998) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del ADN genómico de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays L.*) durante la germinación. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Alessi D R, Sarto Y, Campbell D G, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall C J y Cowley S (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, 13: 1610-1619.
- Anderson C A, Wagner T A, Perret M, He Z H, He D y Kohorn B D (2001) WAKs: cell wall associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol Biol*, 47: 197-206.
- Asai T, Stone J M, Heard J E, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J y Ausubel F M (2000) Fumonisin B1-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling. *Plant Cell*, 12: 1823-36.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann M R, Chiu W-L, Gómez-Gómez L, Boller T, Ausubel F M y Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415: 977-983.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B y Dinesh-Kumar (1997) Signaling in plant microbe interactions. *Science*, 276: 726-733.
- Balk J, Leaver C J y McCabe P F (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett*, 463: 151-154.
- Becraft P W (2002) Receptor kinase signalling in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18: 163-192.
- Bedia C, Triola G, Casas J, Llebaria A, Fabrias G (2005) Analogs of the dihydroceramide desaturase inhibitor GT11 modified at the amide function: synthesis and biological activities. *Org Biomol Chem*, 3: 3707-3712.
- Bergmann D C, Lukowitz W y Somerville C R (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, 304: 1494-1497.
- Bestwick C S, Brown I R, Bennet M H R y Mansfield J W (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of Letuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell*, 9: 209-221.
- Bindschedler L V, Dewney J, Blee K A, Stone J M, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies D R, Ausubel F M y Bolwell G (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* is required for pathogen resistance. *Plant J*, 47: 851-863.
- Blumer K J y Johnson G L (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *TIBS*, 19: 236-240.
- Bögre L, Meskiene I, Heberle-Bors E y Hirt H (2000) Stressing the role of MAP kinases in mitogenic stimulation. *Plant Mol Biol*, 43: 705-718.
- Braun D M y Walker J C (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signalling puzzle. *Trends Biochem Sci*, 21: 70-73.
- Buchanan B B, Griseem W y Jones R L (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, 1^a ed p p 1103.
- Busa W B y Nuccitelli R (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*, 246: 409-438.

- Callard D, Axelos M, Mazzolini L (1996) Novel marker for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence. *Plant Physiol*, 112: 705-715.
- Campo S, Carrascal M, Coca M, Abián J y San Segundo B (2004) The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics*, 4: 383-396.
- Cardinale F, Jonak C, Ligterink W, Niehaus K, Boller T y Hirt H (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem*, 275: 36734-36740.
- Carmona S L (2003) Identificación de polipéptidos fosforilados diferencialmente en embriones de maíz expuestos a la fumonisina B₁. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química, UNAM.
- Carmona Salazar L (2006) Aislamiento y caracterización de membranas resistentes a detergentes (DRM) en diferentes especies vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Chen K, Du L y Chen Z (2003) Sensitization of defense response and activation of a programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 53: 61-74.
- Chen K, Fan B, Du L y Chen Z (2004) Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 56: 271-283.
- Cheong Y H, Moon B C, Kim J K, Kim M C, Kim I H, Park C Y, Kim J C, Park B O, Koo S C, Yoon H W, Chun W S, Lim C O, Lee S Y y Cho M J (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis related protein expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol*, 13: 1961-1972.
- Choi K Y, Kranz J E, Mahanty S K, Park K S y Elion E A (1999) Characterization of FUS3 localization: active FUS3 localizes in complexes of varying size and specific activity. *Mol Biol Cell*, 10: 1553-1568.
- Contreras F X, Sot J, Alonso A y Goni F M (2006) Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes. *Biophys J*, 90: 4085-4092.
- Coursol S, Fan L-M, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S y Assmann S M (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cell involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 423: 651-654.
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch D V, Gilrey S, Assmann S M y Spiegel S (2005) *Arabidopsis* sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol*, 137: 724-37.
- Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E y Kolesnick R (2001) Ceramide enables Fas to cap and kill. *J Biol Chem*, 276: 23954-23961.
- Cross D V y Templeton D (2004) Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem J*, 381: 675-683.
- Cullivier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek P G, Coso O A y Gutkind (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381: 800-803.
- Cullivier O, Rosenthal D S, Smulson M E y Spiegel S (1998) Sphingosine-1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 273: 2910-2916.
- Czernic P, Visser B, Sun W, Savoure A, Deslandes L, Marco Y, Montagu M V y Verbruggen N (1999) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by stress and pathogen attack. *Plant J*, 18: 321-327.

- Daido S, Kansawa T, Yamamoto H, Takeuchi H, Kondo Y y Kondo S (2004) Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res*, 64: 4286-4293.
- Dangl J L, Dietrich R A y Richberg M H (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8: 1793-1807.
- Dangl J L y Jones J D G (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- Danon A y Gallois P (1998) UV-C radiation induces apoptotic like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 437: 131-136.
- Danon A, Delorme V, Mailhac N y Gallois P (2000) Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem*, 38: 647-655.
- Davis C G, Goldstein J L, Südhof T C, Anderson R G W, Russel D W y Brown M S (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, 326: 760-765.
- del Pozo O y Lam E (1998) Caspase and programmed cell death in hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biol*, 8: 1129-1132.
- De la Torre M E, Rivas S M, Cruz-Ortega R, Gavilanes-Ruíz M y Plasencia J. Introduction of nuclease expression and activity by disruption of sphingolipid metabolism in germinating maize seeds. 7th International Congress of Plant Molecular Biology. Barcelona, España. Junio 23-28, 2003.
- Desikan R, Kancock J T; Ichimura K, Shinozaki K y Neill S J (2001) Hairpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol*, 126: 1579-1587.
- Diévert A y Clark S E (2003) Using alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 507-516.
- Diévert A y Clark S E (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131: 251-261.
- Elion E A (1998) Routing MAP kinase cascades. *Science*, 281: 1625-1626.
- Elion E A (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol*, 3: 573-581.
- Elrick M J, Fluss S y Colombini M (2006) Sphingosine, a product of ceramide hydrolysis, influences the formation of ceramide channels. *Biophys J*, 91: 1749-1756.
- Enríquez M C, Gutiérrez N, Plasencia J y Gavilanes-Ruíz M. Cambios cinéticos en la actividad de la glucan sintetasa inducidos por la fumonisina B1 en embriones de maíz durante la germinación. XII Congreso de Bioenergética y Biomembranas, Querétaro, Qro. México. Noviembre 18-22, 2001.
- Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S y Somssich E (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5: 199-206.
- Fanger G R, Gerwins P, Widmann C, Jarpe M B y Johnson G L (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*, 7: 67- 74.
- Fantini J, Hammache D, Delézay O, Yahy N, André-Barrès C, Rico-Lattes I y Lattes A (1997) Synthetic soluble analogs of galactosyl-ceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp 120 and inhibit HIV-1 induced fusion and entry. *J Biol Chem*, 272: 7245-7252.

- Fantz D A, Jacobs D, Glossip D y Kornfeld K (2001) Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem*, 276: 27256-27265.
- Fath A, Bethke P C y Jones R L (1999) Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant J*, 20: 305-315.
- Felle H H y Zimmermann M R (2007) Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* (Published online: 17 January 2007)
- Frelin C, Vigne P, Ladoux A y Lazdunski M (1988) The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem*, 174: 3-14.
- Galanis A, Yang S H y Sharrocks A D (2001) Selective targeting of MAPK to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J Biol Chem*, 276: 965-973.
- Gao Z, Chen Y F, Randlett M D, Zhao X C, Findell J L, Kieber J J y Schaller G E (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, 278: 34725-34732.
- Garibay F J, Enríquez-Arredondo C, Plasencia J y Gavilanes-Ruíz M. Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la actividad de la glucan sintetasa II de embriones de maíz. XXII Congreso Nacional de Bioquímica. Acapulco, Guerrero. México. Noviembre 19-24, 2000.
- Garrington T P y Johnson G L (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 211-218.
- Gelderblom W C A, Cawood M E, Snyman S D y Marasas W F O (1994) Fumonisin B₁ dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. *Carcinogenesis*, 15: 209-214.
- Gelderblom W C A, Snyman S D, van der Lugt J J y Marasas W F O (1995) Mitoinhibitory effect of fumonisin B₁ on rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis*, 16: 625-631.
- Gilchrist D G (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu Rev Phytopathol*, 36: 393-414.
- Gómez-Gómez L y Boller T (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci*, 7: 251- 256.
- Gomi K, Ogawa D, Katou S, Kamada H, Nakajima N, Saji H, Soyano T, Sasabe M, Machida Y, Mitsuhara I, Ohashi Y y Seo S (2005) A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant Cell Physiol*, 46: 1902-1914.
- Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwartz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R y Gulbins E (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 276: 20589-20596.
- Gray-Mitsumune M, O'Brien M, Bertrand C, Tebbji F, Nantel A y Matton D P (2006) Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *J Exp Bot*, 57: 4171-4187.
- Greaves F N (2005) Efecto de los esfingolípidos en la expresión del gen de la glicoproteína rica en hidroxiprolina de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Greenberg J T (2005) Degrade or die: a dual function for autophagy in the plant immune response. *Dev Cell*, 8: 799-801.
- Greenberg J T, Guo A, Klessig D F, Ausubel F M (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77: 551-563.

- Greenberg J T (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 525-545.
- Gustin M C, Albertiny J, Alexander M y Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microl Mol Biol Rev*, 62: 1264-1300.
- Gutiérrez N N (1999) Efecto de la fumonisina B₁ sobre la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Gutiérrez N N (2005) Interacción de la fumonisina B₁ con la membrana plasmática: efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y, Azuma T y Yasuda T (2006) Activation of Arabidopsis MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta*, 223: 708-713.
- Hall M A, Novikova G V, Moshkov I E, Mur L A J y Smith A R (2002) Protein kinases in plants in the transduction of abiotic and biotic signals. *Russ J Plant Physiol*, 49: 107-119.
- Hammond-Kosack K E y Jones J D G (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- Hanks S K y Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB*, 9: 576-596.
- Hannun Y A y Obeid L M (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 20: 73-77.
- Harmon A C, Gribskov M y Harper J F (2000) CDPKs-a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci*, 5: 154-159.
- Haschek W M, Gumprecht L A, Smith G, Tumbleson M E y Constable P D (2001) Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 2): 251-257.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305: 855-858.
- He S Y, Bauer D W, Collmer A y Beer S V (1994) Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* hairpin requires active plant metabolism. *Mol Plant-Microbe Interact*, 7: 289-292.
- He S Y (1996) Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiol*, 112: 865-869.
- He Z H, Fujiki M y Kohorn B D (1996) A cell wall-associated receptor-like kinase. *J Biol Chem*, 271: 19789-19793.
- He Z H, He D y Kohorn B D (1998) Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J*, 14: 55-63.
- He Z Y, Cheeseman I, He D y Kohorn B D (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 39: 1189-1196.
- Herceg Z y Wang Z-Q (1999) Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 19: 5124-5133.
- Herskowitz I (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, 80: 187-197.

- Hinkovska-Galcheva V, Boxer L A, Kindzelskii A, Hiraoka M, Abe A, Goparju S, Spiegel S, Petty H R y Shaymann J A (2005) Ceramide 1-phosphate, a mediator of phagocytosis. *J Biol Chem*, 280: 26612-26621.
- Holthuis J C M, Pomorski T, Raggars R J, Sprong H y Van Meer G (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev*, 81: 1689-1723.
- Hua Z M, Yang X y Fromm M E (2006) Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active Arabidopsis MAPKK or MAPK proteins. *Plant Cell Environ*, 29: 1761-1770.
- Hucho F y Buchner K (1997) Signal transduction and protein kinases: the long way from the plasma membrane into the nucleus. *Naturwissenschaften*, 84: 281-290.
- Huse M y Kuriyan J (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 109: 275-282.
- Huwillier A, Brunner J, Hummel R, Vervoordeldonk M, Stable S, van den Bosch H y Pfeilschifter J (1996) Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 6959-6993.
- Huwillier A, Xin C, Brust A K, Briner V A y Pfeilschifter J (2004) Differential binding of ceramide to MEKK1 in glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1636: 159-168.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B E, Morris P C, Innes R W, Ecker J R, Scheel D, Klessig D F, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y y Walker J C (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trend Plant Sci*, 7: 301-308.
- Ichimura K, Casais C, Peck S C, Shinozaki K y Shirasu K (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 281: 36969-36976.
- Ito N, Takabatake R, Seo S, Hiraga S, Mitsuhashi I y Ohashi Y (2002) Induced expression of a temperature-sensitive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase gene by hypersensitive cell death and wounding in tobacco plant carrying the *N* resistance gene. *Plant Cell Physiol*, 43: 266-274.
- Iwabuchi K, Handa K y Hakomori S I (1998) Separations of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signalling. *J Biol Chem*, 273: 33766-33773.
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin A J y Kornfeld K (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev*, 13: 165-175.
- Jin H, Liu Y, Yang K, Kim C, Baker B y Zhang S (2003) Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N-gene mediated resistance in tobacco. *Plant J*, 33: 719-731.
- Jonak C, Heberle-Bors E y Hirt H (1994) MAP kinases: universal multi-purpose signalling tools. *Plant Mol Biol*, 24: 407-416.
- Jonak C, Ökrész L, Bögre L y Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 415-424.
- Jones A M y Dangl J L (1996) Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci*, 1: 114-119.
- Johnson L N, Noble M y Owen D J (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85: 149-158.

- Karlsson K A (1970) On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Lipids* 5: 6-43.
- Karlsson K A (1986) Animal glycolipids as attachment sites for microbes. *Chem Phys Lipids*, 42: 153-172.
- Katsuhara M (1997) Apoptotic-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol*, 38: 1091-1093.
- Kerr J F, Wyllie A H y Currie A R (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.
- Kholodenko B N, Hoek J B y Westerohoff H V (2000) Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes? *Trends Cell Biol*, 10: 173-178.
- Kim Y S, Lee J H, Yoon G M, Cho H S, Park S-W, Suh M C, Choi D, Ha H J, Liu J R y Pai H-S (2000) CHRK-1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol*, 123: 905-915.
- Kim C Y y Zhang S (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J*, 38: 142-151.
- Kohorn B D, He Z H, Fujiki M (1996) A receptor like-kinase with an EGF domain in the cell wall. In: *Protein phosphorylation in plants*. Shewry P. R., Halford N. G. y Hooley R. Ed. Claredon Press, pp. 297-304.
- Kohorn B D (2001) WAKs; cell wall associated kinases. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 529-533.
- Kolesnick R N y Krönke M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 643-665.
- Kombrink E y Somssich I E (1995) Defense responses of plants to pathogens. In: *Advances in Botanical Research* (Andrews J H y Tommerup I C eds). Academic Press, pp 1-34.
- Komjanc M, Fseti S, Rizzoti L, Cattivelli L, Cervone F y De Lorenzo G (1999) A leucine rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus x domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *Plant Mol Biol*, 40: 945-957.
- Koukalova B, Kovarik A, Fajkus J y Siroky J (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Lett*, 414: 289-292.
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G y Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2940-2945.
- Kültz D (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol*, 46: 571-588.
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 280: 32914-32920.
- Lam E (2005) Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends Cell Biol*, 15: 124-127.
- Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P (2006) Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem*, 281: 8518-8527.
- Lebrun-García A, Ouaked F, Chlitz A y Pugin A (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J*, 15: 773-781.
- Lebrun-García A, Chlitz A, Gout E, Bligny R y Pugin A (2002) Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogein in tobacco cells. *Planta*, 214: 792-797.

- Lee J, Rudd J J, Macioszeck V K, y Scheel D (2004) Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (*PR*) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem*, 279: 22440-22448.
- Levchenko A, Bruck J y Sternberg P W (2000) Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signalling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 5818-5823.
- Levine A, Pennel R I, Alvarez M E, Palmer R y Lamb C (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* 6: 427-437.
- Link V L, Hofmann M G, Sinha A K, Ehness R, Strnad M y Roitsch (2002) Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Physiol*, 128: 271-281.
- Liu Y, Hin H, Yang K-Y, Kim C Y, Baker B y Zhang S (2003) Interaction between two mitogen-activated protein kinase during tobacco defense signalling. *Plant J*, 34: 149-160.
- Liu Y, Schiff M y Dinesh-Kumar S P (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, *COI1* and *CTR1* in *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 38: 800-809.
- Liu Y y Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK-6, a stress responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 3386-3399.
- Lynch D V (1993), Sphingolipids. In: *Lipid Metabolism in Plants*. Moore T.S. Jr., ed. Boca Raton, F. L. CRC Press, pp. 285-308.
- Maceyka M, Payne S G, Milstien S y Spiegel S (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585: 193-201.
- Marasas W F O (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Env Health Persp*, 109 (Suppl 2): 239-243.
- Markham J E, Li J, Cahoon E B, Jaworski J G (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, 281: 22684-22694.
- Martin G B (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr Opin Plant Biol*, 2: 273-279.
- Matte A, Tari L W y Delbaere L T J (1998) How do kinases transfer phosphoryl groups? *Structure*, 6: 413-419.
- McCabe P F, Levine A, Meijer P J, Tapon N A, y Pennell R I (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cell cultured at low cell density. *Plant J*, 12: 267-280.
- McNeil M, Darvill A G, Fry S C y Albersheim P (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann Rev Biochem*, 53: 625-663.
- Merrill A H Jr (1983) Characterization of serine palmitoyltransferase activity in chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 754: 284-291.
- Merrill A H Jr, Liotta D C y Riley R T (1996a) Bioactive properties of sphingosine and structurally related compounds. In: *Handbook of Lipid Research 8. Lipid second messengers*, ed Elsevier Science. Plenum Press. New York.

- Merrill A H Jr, Liotta D C y Riley R T (1996b) Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends Cell Biol*, 6: 218-223.
- Merrill A H Jr, Schmelz E M, Dillehay D L, Spiegel S, Shayman J A, Schroeder J J, Riley R T, Voss K A y Wang E (1997) Sphingolipids- the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 142: 208-225.
- Merrill A H Jr, Sullards M C, Wang E, Voss K A y Riley R T (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Env Health Persp*, 109 (Suppl 2): 283-289.
- Merrill A H Jr (2002) *De novo* sphingolipid biosynthesis: a necessary but dangerous pathway. *J Biol Chem*, 277: 25843-25846.
- Meskiene I y Hirt H (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol*, 42: 791-806.
- Meszáros T, Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardoczy V, Teige M, Koncz, Peck S y Bogre L (2006) The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J*, 48: 485-498.
- Mittler R y Lam E (1995) Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell*, 7: 1951-1962.
- Mittler R, Shulaev V y Lam E (1995) Coordinate activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell*, 7: 29-42.
- Mittler R y Lam E (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Cell*, 7: 1951-1962.
- Moloney D J, Shair L H, Lu F M, Xia J, Locke R, Matta K L y Haltiwanger R S (2000) Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem*, 275: 9604-9611.
- Mora-Álvarez Y, Nava-Vargas J M, Valle-Villanueva C H, López-Gómez R, López-Meza J E, Valdez-Alarcón J J, Cano-Camacho H y Baizabal-Aguirre V M (2004) Osmotic stress induces the activation of a mitogen-activated protein kinase (MAPK) and a calcium-independent protein kinase from beet root (*Beta vulgaris* L.) *Plant Science*, 167: 561-567.
- Mori I C y Muto S (1997) Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol*, 113: 833-839.
- Morris P C (2001) MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytol*, 151: 67-89.
- Morris E R y Walker J C (2003) Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 339-342.
- Nakagami H, Pitzschke A y Hirt H (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci*, 10: 339-346.
- Nakagami H, Soukupova H, Schikora A, Zarsky V y Hirt (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 281: 38697-38704.
- Nakamura S, Kosutzumi Y, Sun Y, Moyake Y, Fujita T y Kawasaki T (1996) Dual roles of sphingolipids in signalling of the scape from and onset of apoptosis in a mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2. *J Biol Chem*, 271: 1255-1257.

- Navarre D A y Wolpert T J (1999) Victorin induction of an apoptotic/senescence-like responses in oats. *Plant Cell*, 11: 237-249.
- Neill S, Desikan R y Hancock J Hydrogen peroxide signalling (2002) *Curr Opin Plant Biol*, 5: 388-389.
- Ng C K Y, McAinsh M R, Powell B y Hetherington A M (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410: 596-599.
- Nishimura-H I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M y Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme and executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 404-408.
- Noyola M L (2006) Determinación de bases esfingoideas y ceramida por TLC tras la adición de la micotoxina FB1 a tejidos vegetales. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Nühse T S, Peck S C, Hirt H y Boller T (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK. *J Biol Chem*, 275: 7521-7526.
- O'Brien I E W, Reutelingsperger C P M y Holdaway K M (1997) Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry*, 29: 28-33.
- Ohtake Y, Takahashi T y Komeda Y (2000) Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 41: 1038-1044.
- Orzaéz D y Granell A (1997a) DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant J*, 11: 137-144.
- Orzaéz D y Granell A (1997b) The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Lett*, 404: 275-278.
- Palacios B S (2002) Efecto de la FB₁ sobre la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Palacios B S (2007) Participación de esfingolípidos membranales en respuesta de defensa. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. (en proceso)
- Paris F, Grassme H, Cremesti A, Zager J, Fong Y, Haimowitz-Friedman A, Fuks Z, Gulbins E y Kolesnick R (2001) Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase (-/-) hepatocytes. *J Biol Chem*, 276: 23954-23961.
- Pastuglia M, Roby D, Dumas C y Cock J M (1997) Rapid induction by wounding and bacterial infection of an *S* gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell*, 9: 49-60.
- Pedley K F y Martin G B (2003) Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol*, 41: 215-243.
- Pittet A, Parisod Y y Schellenberg M (1992) Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based products from the Swiss market. *J Agric Food Chem*, 40: 1352-1354.
- Ponce C M y López C F (2003) *Biología Celular y Molecular*. Jiménez L F y Merchant H, ed. Prentice Hall, pp. 215.
- Posas F, Takekawa M y Saito H (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*, 1: 175-182.
- Prieschl E E y Baumruker T (2000) Sphingolipids:second messengers, mediators and raft constituents in signalling. *Immunol Today*, 21: 555-560.
- Ren D, Yang H y Zhang S (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277: 559-565.

- Ren D, Yang K Y, Li G J, Liu Y y Zhang S (2006) Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiol*, 141: 1482-1493.
- Rentel M C, Lecourieux D, Ouaked F, Usher S L, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck S C, Grierson C S, Hirt H y Knight M R (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 427: 858-861.
- Riboni L, Viani P, Bassi R, Prinetti A y Tettamanti G (1997) The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res*, 36: 153-195.
- Riley R T, An N H, Showker J L, Yoo H S, Norred W P, Chamberlain W J, Wang E, Merrill A H, Motelin G, Beasley V R y Haschek W M (1993) Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 118: 105-112
- Riley R T, Voss K A, Yoo H, Gelderblom W C A y Merrill A H (1994) Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenicity. *J Food Protect*, 57: 528-535.
- Riley R T, Wang E, Schroeder J J, Smith E R, Plattner R D, Abbas H, Yoo H-S y Merrill A H Jr (1996) Evidence of disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Nat Toxins*, 4: 3-15.
- Riley R T, Enongene E, Voss K A, Norred W P, Meredith F I, Sharme R P, Spitsbergen J, Williams D E, Carlson D B y Merrill A H Jr (2001) Sphingolipid perturbation as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 2): 301-308.
- Rivas S M (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoides en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B1. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Rivas S M (2004) Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Robinson M J y Cobb M H (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 180-186.
- Rodríguez M P (2006) Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, compuestos esfingoides y respuesta a patógenos en células vegetales. Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Química. UNAM.
- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig D F, Hirt H y Jones J D (1999) Rapid Avr-9 and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell*, 11: 273-287.
- Romeis T, Ludwig A A, Martin R y Jones J D G (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J*, 20: 5556-5567.
- Ryerson D E y Heath M C (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell*, 8: 393-402.
- Sánchez J E y Aguilar R (1984) Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol*, 75: 231-234.

- Sánchez R D (2006) Acumulación de bases esfingoideas durante la respuesta de defensa de maíz al patógeno *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- SanJuan B A (2001) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Saucedo, 2004. Efecto de la fumonisina B1 y los compuestos esfingoideos en la actividad de MAP cinasas en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Saucedo G M y Gavilanes-Ruíz M (2005) Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. REB, 24: 4-11.
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vanderwalle A, Ghidoni R y Codogno P (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. J Biol Chem, 279: 18384-18391.
- Schägger H y von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem, 166: 368-379.
- Schaller A y Oecking C (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. Plant Cell 11: 263-272
- Schroeder J J, Crane H M, Xia J, Liotta D C y Merrill A H Jr (1994) Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. A molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*. J Biol Chem, 269: 3475-3481.
- Seay M, Patel S y Dinesh-Kumar S P (2006) Autophagy and plant innate immunity. Cell Microbiol, 8: 899-906.
- Seger R, Ahn N G, Posada J, Munar E S, Jensen A M, Cooper J A, Cobb M H y Krebs E G (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. J Biol Chem, 267: 14373-14381.
- Seideel J J y Graves B J (2002) An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. Genes Dev, 16: 127-137.
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. Curr Opin Plant Biol, 6: 365-371.
- Shiu S H y Bleecker A B (2001a) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signalling. Sci STKE, re 22 (electronic resource).
- Shiu S H y Bleecker A B (2001b) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10763-10768.
- Shoresh M, Gal-On A, Leibman D y Chet I (2006) Characterization of a mitogen activated protein kinase gene from cucumber required for thrichoderma-conferred plant resistance. Plant Physiol, 142: 1169-1179.
- Silva N y Goring D (2002) The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK-1) gene is rapidly induced by wounding. Plant Mol Biol, 50: 667-685.
- Siskind L J, Kolesnick R N y Colombini M (2006) Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. Mitochondrion, 6: 118-125.

- Somsen O J, Siderius M, Bauer F F, Snoep J L y Westerhoff H V (2002) Selectivity in overlapping MAP kinase cascades. *J Theor Biol*, 218: 343-354.
- Somssich I E y Hahlbrock K (1998) Pathogen defense in plants. A paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci*, 3: 86-89.
- Song D, Chen J, Song F y Zheng Z (2006) A novel rice MAPK gene, OsBIMK2, is involved in disease-resistance responses. *Plant Biol*, 8:587-596.
- Song W Y, Wang Z Y, Li J M, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Garner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C y Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 270: 1804-1806.
- Spiegel S (1999) Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukocyte Bio*, 65: 341-344.
- Stein J C, Dixit R, Nasrallah M E y Nasrallah J B (1996) SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 8: 429-445.
- Stein J C y Hansen G (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol*, 121: 71-79.
- Stevens V L, Nimkar S, Jamison W C, Liotta D C y Merrill A H Jr (1990) Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for an involvement of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1051: 37-45.
- Stoica B A, Movsesyan V A, Knoblach S M y Faden A I (2005) Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol Cell Neurosci*, 29: 355-371.
- Stone J M y Walker J C (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, 108: 451-457.
- Stone J M, Heard J E, Asai T y Ausubel F M (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell*, 12:1811-22.
- Sun Y L, Zhao Y, Hong X y Zhai Z H (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett*, 462: 317-321.
- Suzuki K y Shinshi H (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell*, 7: 639-647.
- Suzuki K, Yano A y Shinshi H (1999) Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol*, 119: 1465-1472.
- Suzuki K (2002) MAP kinase cascades in elicitor signal transduction. *J Plant Res*, 115:237-244.
- Tähtiharju S, Sangwan V, Monroy E F, Dhindsa R S y Borg M (1997) The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role of calcium. *Planta*, 203: 442-447.
- Tanoue T y Nishida E (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, 15:455-462.
- Tolleson W H, Melchior W B, Morris S M, McGarrity L J, Domon O E, Muskhelishvili L, James S J y Howard P C (1996) Apoptotic and antiproliferative effects of fumonisin B₁ in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 17:239-246.
- Torres M A, Jones J D y Dangl J L (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 37: 1130-1134.

- Truman W, Bennet M H, Kubigsteltig I, Turnbull C y Grant M (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signalling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 1075-1080.
- Tsujimoto Y y Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*, 12: 1528-1534.
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T y Yamaguchi-Shinozaki K (1994). Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 244: 3231-340.
- van Blitterswijk W J, van der Luit A H, Veldman R J, Verheij M y Borst J (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics?. *Biochem J*, 369: 199-211.
- van Doorn W G y Woltering E J (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci*, 10: 117-122.
- Vázquez Vázquez C A (2007) Mecanismo de inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por disminución de ceramidas endógenas en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
- Verheij M, Bose R, Xin H L, Yao B, Jarvis D W, Grant S, Birrer M J, Szabo E, Zon L I, Kyriakis J M, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z y Kolesnick R N (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 380: 75-79.
- Verica J y He Z-H (2002) The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol*, 129: 455-459.
- Wagner T A y Kohorn B (2001) Wall associated kinases, WAKs, are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell*, 13: 303-318.
- Walker J C (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinase of higher plants. *Plant Mol Biol*, 26: 1599-1609.
- Walker J y Zhang R (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature*, 345: 743-746.
- Waller F, Muller A, Chung K M, Yap Y K, Nakamura K, Weiler E y Sano H (2006) Expression of a WIPK-activated transcription factor results in increase of endogenous salicylic acid and pathogen resistance in tobacco plants. *Plant Cell Physiol*, 47: 1169- 1174.
- Wang H, Li J, Bostock R M y Gilchrist D G (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*, 8: 375-391.
- Wang M, Oppedijk B J, Lu X, Van Duijn B y Schilperoort R A (1996) Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 32: 359-364.
- Wang M, Hoekstra S, van Bergen S, Lamers G E M, Oppedijk B J, van der Heidjen M W y Schilperoort R A (1999) Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol*, 39: 489-501.
- Wang X, Zafian P, Choudhary M y Lawton M (1996) The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 2598-2602.

- Wattenberg E V, Badria F A y Shier W R (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B₁. *Biochem Biophys Res Commun*, 227: 622-627.
- Wei L, Hubbard S R, Smith R F y Ellis L (1994) Protein kinase superfamily-comparisons of sequence data with three-dimensional structures. *Curr Opin Struct Biol*, 4: 450-455.
- Widmann C, Goibson S, Jarpe M B y Johnson G L (1999) Mitogen-activated protein kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79: 143-180.
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection: *Biochem J*, 322: 681-692.
- Wright B S, Snow J W, O'Brien T C y Lynch D V (2003) Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Arch Biochem Biophys*, 415: 184-192.
- Wrzaczek M y Hirt H (2001) Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biol Cell*, 93: 81-87.
- Xing T, Malik K, Martin T y Miki B L (2001) Activation of tomato PR and wound-related genes by mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways. *Plant Mol Biol*, 46: 109-120.
- Yamagata H, Saka K, Tanaka T y Aizono Y (2001) Light activates a 46-kDa MAP kinase-like protein kinase in soybean cell culture. *FEBS Lett*, 494: 24-29.
- Yang H S, Huang H C y Collmer A (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*: 73: 1255-1266.
- Yang K Y, Liu Y y Zhang S (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 741-746.
- Yang S-H, Sharrocks A D y Whitmarsh A J (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signalling cascades. *Gene*, 320: 3-21.
- Yang Y, Shah J y Klessig (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev*, 11: 1621-1639.
- Yashar B, Irie K, Printen J A, Stevenson B J, Sprague G F Jr, Matsumoto K y Errede B (1995) Yeast MEK-dependent signal transduction: response thresholds and parameters affecting fidelity. *Mol Cell Biol*, 15: 6545-6553.
- Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S y Kolesnick R (1995) Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature*, 378: 307-310.
- Yen C H y Yang C H (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol*, 39: 922-927.
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones J D y Doke N (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 15: 706-718.
- Young T E, Gallie D R, Demason D A (1997) Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunken2* genotypes. *Plant Physiol*, 115: 737-751.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke E H y Lenardo M J (2004) Regulation of an ATG7-Beclin1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304: 1500-1502.
- Zeng X, Overmeyer J H y Maltese W A (2006) Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci*, 119: 259-270.

- Zhang S y Klessig D F (1997) Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell*, 9: 809-824.
- Zhang S y Klessig D F (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7225-7230.
- Zhang S, Du H y Klessig D F (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, 10: 435-449.
- Zhang S, Liu Y y Klessig D F (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J*, 23: 339-347.
- Zhang S y Liu Y (2001) Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell*, 13: 1877-1889.
- Zhang Y, Yao B, Delikat S, Bayoumy S, Lin X-H, Basu S, McGinley M, Chan-Hui P-Y, Lichenstein H y Kolesnick R (1997) Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell*, 89: 63-72.
- Zheng C F y Guan K L (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J*, 13: 1123-1131.
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood J C, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards M C, Cabot M y Merrill Jr A H (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 1864-1884.