

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de
México



Departamento de Biología Molecular de
Plantas

REGULACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL mRNA Y DEL
PROCESAMIENTO DE LA METACASPASA AtMCP1b EN
RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON *P.syringae* pv
tomato (*Pst*) EN PLANTAS DE *A. thaliana* DURANTE LA
RESPUESTA HIPERSENSIBLE.

T E S I S

QUE PARA TENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS PRESENTA:
ANTONIO ZAVARIZ VERGARA

Director de tesis: Dr. Mario Rocha Sosa

Cuernavaca, Morelos 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
APT	fosforibosil transferasa de adenosina-1
avr	gen de avirulencia asociado al patógeno
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ácido ribonucleico interferente
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtMCP1b	metacaspasa de tipo 1b de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BTH	benzo (1, 2, 3)-thiadiazole-7- carbothioic acid S-methyl ester
BSMT1	Sa metil-transferasa
°C	grados centígrados
CTAB	bromuro de cetiltrimetil amonio
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
CASPASA	Cysteine Aspartate Specific Proteases
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
EOR	especies de oxígeno reactivas
ET	etileno
eds-16	enhanced disease susceptibility-16
g	gramo
GFP	proteína verde fluorescente
GUS	β-glucoronidasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
<i>H. brasiliensis</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>
HR	respuesta hipersensible
ICS1	isocorismato sintasa 1
JA	ácido jasmónico
Kb	kilobases
KCl	cloruro de potasio
KDa	kilodaltones
KH ₂ PO ₄	fosfato de potasio
L	litro
LeMCA1	metacaspasa de tipo II de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)
LSD1	lesions simulating disease 1
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinases
mclI-Pa	metacaspasa de tipo II de abeto noruego (<i>Picea abies</i> .)
MeSa	metil salicilato
mg	miligramo
μg	microgramo
mL	mililitro
μL	microlitro

mM	milimolar
mm	milímetros
mRNA	ácido ribonucléico mensajero
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sodio dibásico
NaCl	cloruro de sodio
NaClO	hipoclorito de sodio
ng	nanogramo
nm	nanómetros
NO	óxido nítrico
•O ₂ -	oxígeno en singulete
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAL	fenilalanina amonio liasa
PAT	fosfinotricina acetil transferasa
Pb	pares de bases
PBS	búffer de fosfatos salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pmoles	picomoles
<i>psm</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>macuicola</i>
<i>pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>pstavr</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>avrRpm1</i>)
<i>P.syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
R	gen de resistencia
PR	pathogenesis-related
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	retrotranscripción de PCR
Sa	ácido salicílico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
SaBP2	proteína de unión al ácido salicílico 2
SAR	respuesta sistémica adquirida
SaMT	Sa metil-transferasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
Sid-2	Sa induction-deficient 2
TAE	tris-acetato-EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetra metil etilen diamina
TMV	virus del mosaico de tabaco
Tris	tris (hidroxi metil) amino metano
VPE	enzima de procesamiento vacuolar
YCA-1	yeast caspase-1

ÍNDICE

Resumen

Introducción	1
La respuesta hipersensible	3
La hipótesis “Gen por gen”	3
La hipótesis “Guardián”	4
Las respuestas de defensa previas a la HR	5
La respuesta sistémica adquirida	6
La participación de la fitohormona ácido salicílico en la respuesta hipersensible	8
La muerte celular programada y la defensa en las plantas	10
Las caspasas	11
Las metacaspasas	12
Antecedentes	15
Hipótesis	21
Objetivos	21
General	21
Específicos	21
Materiales y métodos	22
I. Generación de las plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP	22
Diseño de los oligonucleótidos	22
PCR para la obtención de la región promotora (progra) flanqueada por los sitios <i>attB</i>	23
Reacción de recombinación BP	23
Transformación con células competentes One Shot [®] Top 10	24
PCR en colonia	24
Extracción del ADN de bacterias	25
Reacción de recombinación LR MultiSite Gateway [®]	26
Transformación en <i>Agrobacterium</i>	28
Transformación en <i>Arabidopsis</i>	29
Material vegetal	29
Inoculación de las plantas	29

Selección de las posibles plantas transgénicas	30
Verificación de la inserción en las plantas transgénicas	31
II. Análisis de la expresión del ARNm y del procesamiento de la proteína	
AtMCP1b en las plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP	32
Extracción del ARN	32
RT-PCR	33
PCR	33
Extracción de la proteína total y experimentos tipo western blot	34
Resultados y discusión	35
I. Generación de las plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP	35
II. Análisis de la expresión del ARNm y del procesamiento de la proteína	
AtMCP1b en plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP en los fondos	
wt y <i>eds-16</i> inducidos por la infección con <i>pstavr</i>	41
III. Generación y selección de las plantas transgénicas 35s::1b::GFP	45
IV. Análisis de la expresión del ARNm y del procesamiento de la proteína	
AtMCP1b en las plantas transgénicas 35s::1b::GFP en los fondos wt y <i>eds-16</i>	
inducidos por la infección con <i>pstavr</i>	48
Conclusiones	51
Perspectivas	52
Bibliografía	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	2
Figura 2	4
Figura 3	5
Figura 4	12
Figura 5	13
Figura 6	14
Figura 7	17
Figura 8	18
Figura 9	18

Figura 10	19
Figura 11	20
Figura 12	20
Figura 13	27
Figura 14	35
Figura 15	36
Figura 16	36
Figura 17	38
Figura 18	39
Figura 19	40
Figura 20	41
Figura 21	42
Figura 22	42
Figura 23	43
Figura 24	46
Figura 25	47
Figura 26	47
Figura 27	48
Figura 28	49

Resumen

Durante las interacciones planta-patógeno, las plantas pueden responder rápidamente matando a las células que se encuentran alrededor del sitio de la infección, evitando así el avance y el crecimiento del patógeno en la planta.

Se ha propuesto que el ácido salicílico (Sa) y las especies de oxígeno reactivas (EOR) actúan positivamente ante el ataque de un patógeno, amplificando las respuestas de defensa y la muerte celular. Esta relación entre la respuesta al ataque de patógenos y la acumulación de Sa se ha analizado en mutantes de *Arabidopsis thaliana* como la línea *eds-16/sid2/ics1*. Las plantas *eds-16* tienen una elevada susceptibilidad al ataque por patógenos y dificultad para montar la respuesta sistémica adquirida (SAR).

En metazoarios la apoptosis es la forma de muerte celular programada (MCP) más estudiada. Entre los reguladores de la apoptosis están las caspasas, proteínas altamente específicas, las cuales participan en la señalización y corte de proteínas blanco específicas. En plantas, hongos y protozoarios se encuentran proteínas tipo caspasas a la que se denomina metacaspasas. Se ha propuesto a las metacaspasas como uno de los candidatos en la regulación de la MCP en plantas, ya que las metacaspasas presentan la díada catalítica universalmente conservada de cisteína e histidina catalítica presente en las caspasas.

En este trabajo se analizó la expresión del ARNm y la proteína de la metacaspasa AtMCP1b en plantas wt y *eds-16* de *Arabidopsis* infectadas con la línea avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato avrRpm1* (*pstavr*). Los resultados mostraron acumulación de ARNm durante la infección con *pstavr* siendo ésta menor en las *eds-16*. En las plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP en fondo wt y *eds-16* se observó la acumulación del zimógeno de AtMCP1b al tratar las plantas con *pstavr*. Al no observar el procesamiento de la misma se utilizaron plantas transgénicas sobre expresoras 35s::1b::GFP, observando procesamiento del zimógeno de AtMCP1b que puede deberse a un autoprosesamiento sin que esto signifique que la metacaspasa se encuentre activa puesto que no se observó un fenotipo de muerte aún al tratarlas con *pstavr*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas frecuentemente se enfrentan al ataque por patógenos de diversas especies pertenecientes a los grupos de virus, bacterias, hongos y nemátodos (Baker et al. 1997). Para las plantas es común poder superar la mayoría de embates a los que se enfrentan; aquellos que son capaces de causar una enfermedad son “la excepción, no la regla” (Staskawicz et al. 2001). Para poder resistir este ataque, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa. Estas respuestas de defensa pueden ser agrupadas principalmente en dos categorías: constitutivas e inducidas.

Las respuestas constitutivas se pueden dividir en dos tipos (físicas y químicas): **físicas**, como son la presencia de una capa de cera en las hojas, el engrosamiento de la pared celular, los tricomas, las vellocidades en las hojas por mencionar algunas y las **químicas** como compuestos de bajo peso molecular, tales como: fenoles y quinonas, compuestos alifáticos de cadena larga, aldehídos, saponinas, terpenoides, etc. y compuestos de alto peso molecular como: taninos, péptidos y proteínas con acción antimicrobiana (tioninas, taumatina, defensinas, lisozimas, inhibidores de proteinasas, etc).

Los patógenos capaces de sobrepasar estas barreras establecerán una relación con la planta, provocando que se encienda la respuesta activa en la planta.

A los pocos minutos del contacto entre el patógeno y el huésped, se producen respuestas inducidas por el ataque como el estallido oxidativo que consiste en la formación de EOR detectadas a los pocos segundos después del ataque del patógeno, sobre todo el radical de $\cdot O_2^-$, el radical hidroxilo OH y H_2O_2 los cuales son tóxicos no sólo para el patógeno sino también para la planta. Además, el H_2O_2 puede inducir el entrecruzamiento de glicoproteínas de la pared y activar la producción *de novo* de fitoalexinas (compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular) y la síntesis de lignina, haciendo a la célula menos accesible al patógeno (Rausher, M.D. 2001; León et al. 2001).

Otras respuestas inducidas por el ataque del patógeno involucran el incremento en los niveles de compuestos antimicrobianos y la respuesta hipersensible (HR) que es la

muerte celular en el sitio de infección de la planta como una forma de restringir el crecimiento del patógeno en la misma (Heath, M.C. 2000).

La HR está acompañada por otras respuestas de la planta, entre las que se incluyen la acumulación de proteínas PR (pathogenesis-related), la acumulación de moléculas mensajeras intra e intercelulares como el Sa, así como la activación transcripcional de genes que codifican para proteínas relacionadas con la defensa ante una agresión mediada por patógenos y el desarrollo de la SAR (Fig. 1) (Vaitkunas, K.E. 2003).

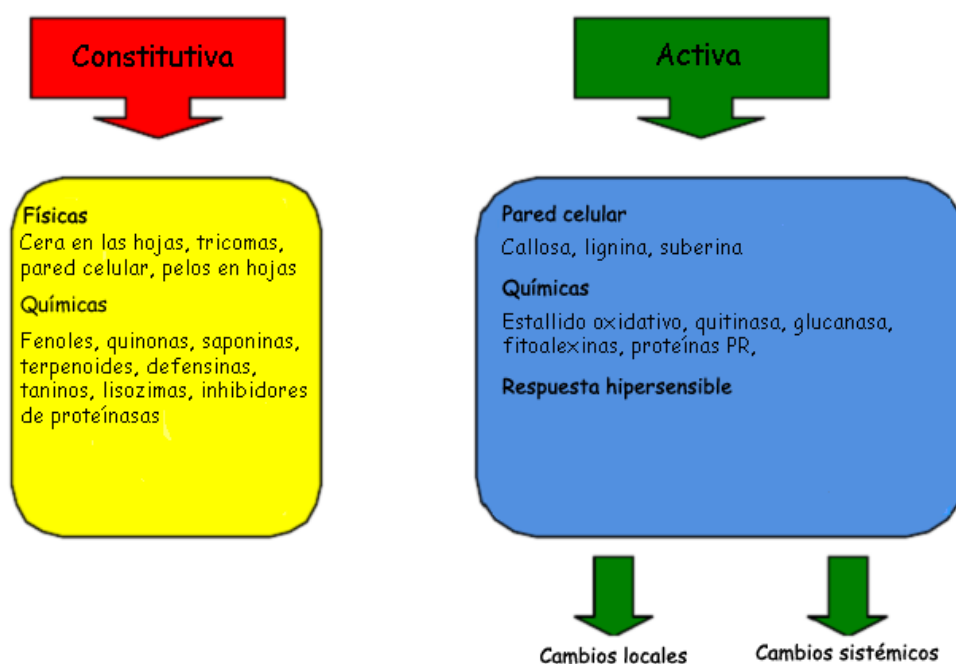


Fig. 1. Diagrama del sistema de defensa característico en plantas basado en las respuestas basales (constitutivas) o en las inducidas (activas). Adaptado de (Vaitkunas, K.E. 2003).

Las moléculas encargadas de disparar estos mecanismos de defensa se conocen como “elicitors”; éstos pueden ser abióticos o bióticos. Los elicitors bióticos (moléculas secretadas por el patógeno) pueden ser específicos y en algunos casos son productos de genes de avirulencia de los patógenos; otros elicitors son característicos de algunas clases de microorganismos como la flagelina de las bacterias o la quitina y el ergosterol de los hongos. Algunos microorganismos tienen una colección de compuestos diversos que actúan como elicitors tales como polisacáridos, enzimas, ácidos grasos, glicoproteínas y proteínas.

El que la defensa activa de la planta se ponga en marcha para protegerse de un invasor potencial depende de la percepción del patógeno a través de sus elicitores activando la transducción de señales de defensa.

LA RESPUESTA HIPERSENSIBLE

La HR es el mecanismo de defensa más poderoso que tienen las plantas; está coordinado tanto temporal como espacialmente. Sin embargo, aunque la respuesta de defensa es poderosa y puede parar la infección por virus, nemátodos, bacterias y hongos, sus limitaciones son que ésta normalmente se dispara solamente por un reconocimiento altamente específico a través de una proteína de resistencia (*R*) y de una proteína efectora (proteína que actúa directamente sobre una segunda, provocando una modificación en el comportamiento de ésta) asociada al patógeno (*avr*). Aún cuando los patógenos estén cercanamente relacionados a aquellos que producen al efector específico, pero que carecen de éste, al infectar a la planta no inducen ninguna HR (Quirino y Bent, 2003).

Existen principalmente dos modelos propuestos que tratan de explicar cómo es que el reconocimiento específico *R-avr* se lleva a cabo; la hipótesis del gen por gen o modelo genético y el modelo molecular del guardián.

La hipótesis “Gen por gen” (modelo genético)

Esta hipótesis fue postulada por Flor en 1956 para explicar la herencia de la patogenicidad en el hongo causante de la roña del lino *Melampsora lini*. Esta hipótesis consiste en que un gen dominante *R* del huésped interactúa con un gen dominante *avr* del patógeno para inducir respuestas de defensa en la planta; el modelo predice que las proteínas *R* funcionan como receptores y las proteínas *avr* como ligandos. En este modelo, la resistencia específica a un patógeno está condicionada a la presencia de un gen *avr* en el patógeno y su correspondiente gen *R* en la planta. (Fig.2). Sin embargo, hasta el momento la interacción directa entre el producto de un gen *R* y su efector bacteriano *avr* solo ha podido ser demostrada en algunos casos como: Pto/AvrPto, Pi-ta/avr-Pita, RRS1-R/PopR2 (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000; Quirino y Bent, 2003).

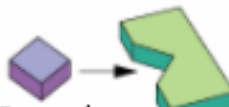

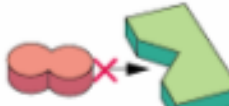
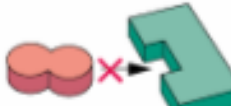
Genotipo del patógeno	Genotipo de la planta hospedera	
	R1	r1
Avr1	 <p>Proteínas Avr1 R1 NO enfermedad</p> <p>Incompatibilidad planta-patógeno</p>	 <p>Proteínas Avr1 r1 Enfermedad</p> <p>Compatibilidad planta-patógeno</p>
avr1	 <p>Proteínas avr1 R1 Enfermedad</p> <p>Compatibilidad planta-patógeno</p>	 <p>Proteínas avr1 r1 Enfermedad</p> <p>Compatibilidad planta-patógeno</p>

Fig. 2. La resistencia de las plantas al ataque de patógenos (incompatibilidad) ocurre por la complementariedad de genes dominantes, uno de la planta y otro del patógeno. La alteración o pérdida de alguno de los genes induce la enfermedad (compatibilidad) (Modificado de Buchanan et al. 2000).

La hipótesis del “Guardián” (modelo molecular)

Propuesto por Jonathan Jones y Jeff Dangl en el 2001. En este modelo, las proteínas R interactúan físicamente con los blancos celulares de los efectores, ya sea reconociendo al complejo efector-blanco o bien reconociendo a los productos de esta interacción, disparando de este modo las señales de defensa (Fig. 3) (Dangl y Jones 2001).

Proteínas guardián: son proteínas R típicas (NBS-LRR, RLP, RLK).
Proteínas guardadas: son las proteínas blanco de las proteínas efectoras (avr) del patógeno.

Las proteínas guardián son las encargadas de monitorear los cambios en la actividad y el estado de las proteínas de la planta, causados por una proteína avr del patógeno.

Ejemplo de interacciones guardián-guardado: Prf/Pto, RPM1/RIN4, RPS2/RIN4, RPS5/PBS1 y Cf2/Avr2.

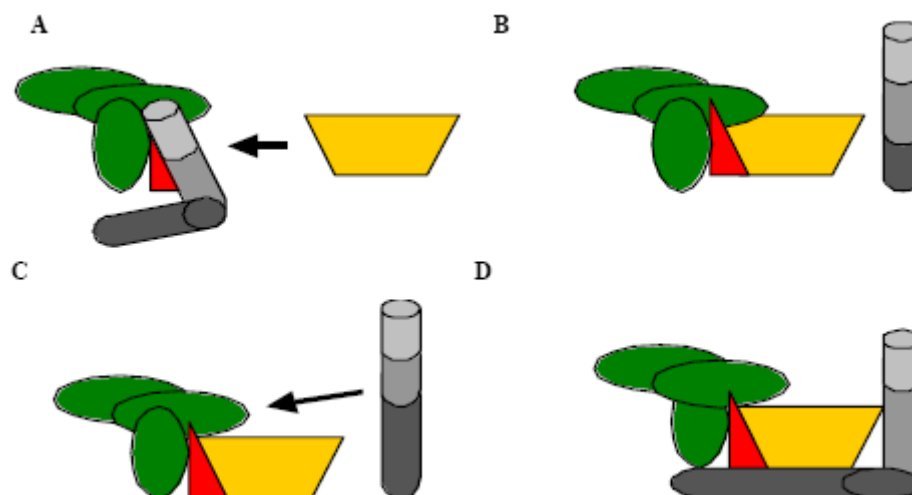


Fig. 3. **Hipótesis del guardián.** **A.** Un complejo de proteínas celulares (verde), una molécula “guardada” (rojo), y una proteína NBD-LRR (sombreada en gris desde el N-terminal hasta los dominios NB y LRR) son blanco de una molécula efectora de un patógeno (amarillo). **B.** La molécula efectora se une a su blanco lo que resulta en la disociación y activación de la proteína NBD-LRR causando la resistencia a la enfermedad. **C.** Otro escenario puede ser en el que la proteína NBD-LRR se une al complejo sólo hasta que la molécula efectora del patógeno se une al complejo. **D.** Activación de la proteína NBDLRR después de que se forma por completo el complejo guardia-efector. (Modificado de Dangl and Jones 2001).

Para el caso de la interacción de *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato* con *Arabidopsis* se ha demostrado que tanto *avrRpt2* y *avrRPM1* (proteínas efectoras) son transportadas por el patógeno al interior de las células en *Arabidopsis*, donde modifican a la proteína RIN4 de la planta huésped, esta proteína está involucrada en la resistencia basal. *avrRpt2* causa la proteólisis de RIN4 mientras que *avrRPM1* induce su fosforilación.

Durante la co-evolución planta-patógeno, la planta adquirió la capacidad de detectar estas modificaciones en la molécula efectora blanco. De esta manera, la proteína de resistencia RPS2 de *Arabidopsis* puede reconocer la desaparición de RIN4, mientras que RPM1 reconoce su fosforilación. El reconocimiento de las modificaciones en RIN4 ya sea por RPS2 o RPM1 dispara las respuestas de defensa, lo que culmina entre otras respuestas, en la HR (Koch et al. 2006).

LAS RESPUESTAS DE DEFENSA PREVIAS A LA HR

La HR de la planta al ataque del patógeno implica la activación de numerosos mecanismos entre los que se encuentran: genes de defensa como los PR, canales iónicos, EOR, modificaciones de proteínas o activación de enzimas que alteran los metabolismos primario y secundario de la planta. Además se generan señales

secundarias para ayudar a coordinar la respuesta. Frecuentemente, la HR induce rápidamente la muerte de las células invadidas y sus vecinas, para aislar al patógeno, y de esta forma reducir el acceso de éste a los nutrientes de la planta y en ocasiones, para liberar sustancias inhibitorias.

Previo a la muerte por HR, se pueden inducir otros mecanismos de defensa como:

- Producción de óxido nítrico (NO), el cual inhibe a las catalasas y ascorbato peroxidases, y potencia el aumento de EOR e induce la muerte celular por daño oxidativo (Overmyer et al. 2003). Al igual que las EOR, el NO también es inductor de otros genes de defensa como *PAL* (fenilalanina amonio liasa) y *PR-1* (Klessig et al. 2000).
- Inducción de rutas paralelas de transducción de señales como la del Sa y NO. La interacción y balance entre estas rutas determina hasta qué punto se debe detener la muerte.
- Generación de señales secundarias, como ácido benzoico, ácido jasmónico (JA) o etileno (ET), implicadas en la inducción de genes de resistencia local y sistémica.
- Inducción de “antidigestivos” contra herbívoros, como péptidos inhibitorios de proteasas.

La activación total de estos mecanismos de forma rápida conduce en pocas horas a la muerte de las células y de los tejidos atacados. Las células muertas contienen altas concentraciones de compuestos antimicrobianos, por lo que se evita el ataque de otros organismos oportunistas.

LA RESPUESTA SISTÉMICA ADQUIRIDA

La SAR es la resistencia que desarrollan las plantas a distancia del sitio inicial de la infección y es efectiva contra un espectro amplio de patógenos. Se sabe que las plantas que han sido inoculadas y que presentan lesiones necróticas locales se vuelven resistentes a una segunda infección. La resistencia se manifiesta en la expresión retrasada o reducida del síntoma producido por el segundo patógeno. El patógeno usado como segundo inóculo puede ser el mismo que el primario o uno

diferente. El período en el cual la SAR se desarrolla varía de acuerdo a la planta y al inóculo primario y puede ser desde unas cuantas horas hasta un par de semanas.

La acumulación de proteínas PR en partes de la planta distantes al sitio de infección es la característica más distintiva de la SAR y se considera como un marcador de este fenómeno; algunos ejemplos resultantes de la SAR son la lignificación, la producción de callosa y la producción de compuestos tóxicos para los patógenos. Otra propiedad es la “sensibilización” de las plantas para montar algunas respuestas de resistencia más rápidas y eficientes que aquellas no “sensibilizadas”.

La SAR necesita usualmente de un evento inicial de HR en el sitio de la infección para disparar la respuesta sistémica; se ha visto que esta respuesta es dependiente del Sa. Sin embargo, los experimentos con tabaco demuestran que el Sa no es la única señal sistémica aunque es requerida en partes distantes de la planta para encender la SAR.

Estudios realizados en tabaco revelaron que después de que la planta es atacada por un patógeno se produce Sa en el sitio de infección. Parte de este Sa activa señales de defensa localmente, mientras que otra parte es convertida a metil salicilato (MeSa) por la enzima Sa metil-transferasa (SaMT). El SaMT es biológicamente inactivo, ya que no puede inducir una respuesta inmune. El MeSa se mueve del sitio de infección a través del floema hacia el tejido no infectado; una vez que el MeSa alcanza el tejido no infectado es convertido a Sa por la proteína de unión al ácido salicílico 2 (SaBP2); así, mediante este mecanismo el Sa es distribuido por toda la planta induciendo una respuesta de defensa sistémica (Park et al. 2007).

Al parecer este fenómeno no se presenta en *Arabidopsis* donde se ha demostrado que la producción de MeSa se incrementa en hojas inoculadas con líneas de *P.syringae* que inducen SAR pero que la mayoría del MeSa producido se libera a la atmósfera. Además, se observó, en algunas mutantes en las vías de defensa en *Arabidopsis*, que el fenotipo deficiente de SAR no era causado por una falla en la producción de MeSa. De la misma forma, las mutaciones en los genes de la enzima Sa metil-transferasa (*BSMT1*) suprimen por completo la producción de MeSa, pero no afectan la SAR; demostrando que la producción de MeSa no es necesaria para la SAR en *Arabidopsis*

y que el incremento sistémico de Sa no está basado en el transporte del MeSa sino que podría deberse a la síntesis *de novo* de Sa.

LA PARTICIPACIÓN DE LA FITOHORMONA ÁCIDO SALICÍLICO EN LA RESPUESTA HIPERSENSIBLE

Las moléculas señalizadoras mejor caracterizadas que actúan en la defensa de la planta contra patógenos en *Arabidopsis* son: el ET, Sa y JA. Otras hormonas cuya participación en la HR también se ha estudiado son las, citocininas y auxinas (Novacky 1972; Mayda et al. 2000; Kunkel y Brooks, 2002; Navarro et al. 2006; Zhang et al. 2007). Las señales de defensa inducidas por estas hormonas no actúan independientemente, ya que se han observado cruzamientos tanto positivos como negativos entre sus vías indicando que existe una intrincada red respuestas enfocadas en la activación de los mecanismos de defensa por parte de la planta. Por ejemplo, se ha visto que Sa y ET inducen la muerte celular, mientras que JA parece participar como contenedor del proceso de muerte celular (Overmyer et al. 2003).

El Sa es una molécula clave en la señalización durante las respuestas de defensa inducidas por patógenos; la vía dependiente de Sa ha sido analizada a detalle en plantas de tabaco y *Arabidopsis*, usando la línea transgénica NahG que expresa constitutivamente el gen nahG de *Pseudomonas putida*, que codifica para una hidrolasa de salicilato que degrada el Sa a catecol (van Wees and Glazebrook 2003). Después de inocular las plantas transgénicas de tabaco NahG con el TMV (virus del mosaico de tabaco), se observa que estas plantas presentan un desarrollo tardío de la HR, así como una disminución en la respuesta en el estallido oxidativo después de la inoculación con bacterias virulentas. La aplicación exógena de Sa o de análogos funcionales como BTH (benzo (1, 2, 3)-thiadiazole-7- carbothioic acid S-methyl ester) restauran la SAR.

En *Arabidopsis*, las plantas NahG tienen bloqueada la expresión de PR-1, PR-2 y PR-5 que contribuyen en las vías de resistencia contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*pst*) y *Peronospora parasitica*, así como una susceptibilidad mayor a una gran variedad de patógenos fúngicos, bacterianos, víricos y oomicetos (Delaney et al.

1994). Esta relación entre la respuesta al ataque de patógenos y la acumulación de Sa también se ha analizado en mutantes de *A. thaliana* como la línea *eds-16/sid2/ics1*, la cual tiene una mutación en el gen de la isocorismato sintasa 1 (*ICS1*) que es necesaria para una de las rutas de biosíntesis del Sa (Torres et al. 2005). Las plantas con el alelo mutante *sid2* tienen una susceptibilidad elevada al ataque por patógenos y dificultad para montar SAR (Wildermuth et al. 2001).

Se ha observado que la expresión de *ICS1* ocurre en hojas infectadas con el hongo biotrófico *Erysiphe orontii* o con la bacteria necrotrófica *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*psm*). Cuando las plantas de *Arabidopsis* son infectadas con una línea avirulenta de *psm* acumulan Sa y SAR en las hojas sistémicas. El tiempo de expresión de *ICS1* es similar a la acumulación de Sa cuando se hacen tratamientos con estos patógenos y correlaciona con la expresión del gen *PR-1* que es un marcador molecular de la SAR.

Existen evidencias bioquímicas que sugieren la función del Sa río arriba a la muerte celular en la HR. El Sa puede afectar el estado de fosforilación de las MAPK's de la ruta de señalización que regula la activación de un estallido oxidativo en perejil (Alvarez, M.E. 2000). De manera similar, la fumonisina-B1, una micotoxina producida por el hongo *Fusarium moniliforme* y que produce MCP (muerte celular programada) en hojas de tomate, requiere de la señalización de Sa para inducir muerte celular en protoplastos de *Arabidopsis* (Asai et al. 2000).

Las células infectadas que sufren un proceso de MCP tienen más Sa que las adyacentes no infectadas que no mueren. Por lo tanto se sugiere que las bajas concentraciones de Sa pueden ser insuficientes para la inducción de muerte celular en células u hojas adyacentes, pero suficientes para activar las señales de respuesta para la supervivencia y defensa. Ésto sugiere que los bajos niveles de Sa regulan la limitación de la lesión, mientras que los altos niveles de Sa inducen muerte celular (Alvarez, M.E. 2000).

El Sa y las ROS participan en la muerte celular alrededor de los sitios de infección durante el ataque por patógenos. La regulación de los niveles de Sa en las células tiene por objeto que las células no mueran e inicia las respuestas de defensa apropiadas más allá del sitio de infección (Torres et al. 2005).

LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y LA DEFENSA EN LAS PLANTAS

Inicialmente, el estudio de la muerte celular programada en las plantas se enfocó en identificar similitudes con la apoptosis en animales (apoptosis en griego significa “caída de los pétalos de una flor” o “caída de las hojas de un árbol durante el otoño”). La apoptosis está asociada a distintos cambios bioquímicos y físicos que envuelven al citoplasma, al núcleo y a la membrana plasmática (Lawen, A. 2003). La apoptosis es un proceso importante en un gran número de procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la metamorfosis, la atrofia dependiente de hormonas, la muerte celular inducida por químicos, el control en el número de células, la eliminación de células anormales, etc. (Cohen, G.M. 1997; Baehrecke, E.H. 2002).

Al inicio de la apoptosis, las células se vuelven redondas y se encogen, perdiendo así contacto con sus vecinas. En el citoplasma, el retículo endoplásmico se dilata y la cisterna se hincha para formar vesículas y vacuolas. En el núcleo, la cromatina se condensa, se agrega en masas compactas y es fragmentada internucleosomalmente por endonucleasas; el núcleo se fragmenta y se encapsula dentro de los cuerpos apoptóticos en formación. En la membrana plasmática se desintegran las uniones celulares haciendo que eventualmente se formen ampollas, dentro de las cuales se encuentra el contenido celular identificado como cuerpos apoptóticos de varios tamaños. Durante este proceso ocurren ciertas modificaciones en la membrana plasmática que permiten el reconocimiento de la fosfatidilserina en los cuerpos apoptóticos por parte de las células fagocíticas. Los cuerpos apoptóticos están rodeados por la membrana plasmática por lo que la apoptosis usualmente ocurre sin escape de contenido celular o inflamación.

Se han descrito varias similitudes tanto morfológicas como bioquímicas entre células animales que experimentan apoptosis y células vegetales en proceso de muerte, como la condensación y reducción tanto del núcleo como del citoplasma, así como la degradación del ADN genómico y de proteasas con actividad tipo-caspasa (ver más adelante) (Danon et al. 2000). Sin embargo, en las plantas no hay apoptosis. La MCP en las plantas es de tipo autofágica. En este tipo de MCP algunas porciones del

citoplasma que contienen componentes celulares son englobadas en vacuolas lisosomales donde son digeridas, lo que ayuda al movimiento y degradación de los constituyentes celulares antes de la muerte celular. Este tipo de MCP ocurre tanto en el desarrollo normal de la planta como en la formación del cigoto o el embrión y durante la senescencia. También existe la de tipo no-lisosomal en la que, aparentemente, las células se suicidan al inhibir algunas rutas biosintéticas principales, ya sea desestabilizando sus membranas ó a través de otras rutas todavía desconocidas. (van Doorn and Woltering 2005).

LAS CASPASAS

En metazoarios las caspasas son las ejecutoras de la apoptosis. Las caspasas pertenecen a la familia de las proteasas de cisteína. Estas enzimas muestran un alto grado de especificidad por sus substratos cortándolos después de un residuo de ácido aspártico, de ahí su nombre: (**Cysteine Aspartate Specific Proteases**). Las caspasas se sintetizan como pro-enzimas inactivas y son activadas por una proteólisis directa que remueve el péptido N-terminal y corta el dominio proteolítico en un sitio de reconocimiento específico (Fig. 4). Al cortarse una molécula de caspasa se obtienen dos subunidades, una grande (p20) y una pequeña (p10), estas dos subunidades se acoplan para formar un heterodímero, es por esto que la caspasa activa es un tetrámero compuesto por dos heterodímeros con dos sitios activos (Woltering et al. 2002). La muerte celular por apoptosis involucra una serie de eventos en los cuales las caspasas iniciadoras activan río abajo a las caspasas ejecutoras que van a ser las encargadas de cortar a una variedad de proteínas desencadenando finalmente en la muerte celular. Las caspasas iniciadoras pueden ser activadas por autoprosesamiento cuando ocurre una asociación de éstas (Woltering et al. 2002).

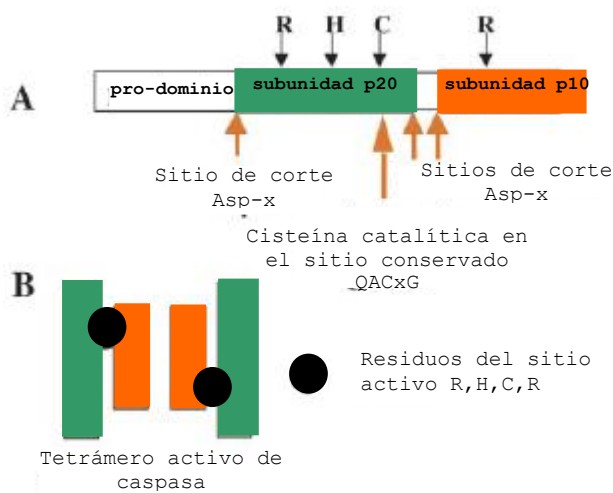


Fig. 4. Representación esquemática de las características estructurales de las caspasas en mamíferos. A, Estructura general de una caspasa con su pro-dominio N-terminal y las subunidades p20 y p10, así como sus sitios de corte B, La activación proteolítica produce un tetrámero de caspasa activa con dos sitios activos, arginina (R), histidina (H), cisteína (C) (Modificado de Woltering et al. 2002).

LAS METACASPASAS

Existen tres grupos de proteasas propuestos con actividad tipo-caspasa en plantas: las enzimas de procesamiento vacuolar (VPE's), las metacaspasas y las saspasas (Woltering et al. 2002; Coffeen and Wolpert 2004). Tanto las VPE's como las metacaspasas son estructuralmente similares a las caspasas, ya que presentan la díada catalítica universalmente conservada de cisteína e histidina (Uren et al. 2000). Algunos resultados muestran que tanto las VPE's como las metacaspasas y saspasas tienen actividad de tipo-caspasa. Las saspasas tienen en su sitio activo un residuo de serina y cortan después de un residuo de ácido aspártico. Recientemente se han publicado trabajos que involucran dos nuevas proteínas con actividad tipo caspasa: La subunidad PBA1 del proteasoma de *Arabidopsis* que presenta actividad tipo caspasa 3 cuando existe una infección bacteriana en la planta (Hatsugai et al. 2009) y la fitaspasa encontrada en tabaco y arroz que es una proteasa tipo subtilisina que presenta actividad tipo caspasa distinta a otras reportadas (Chichkova et al. 2010).

A diferencia de las caspasas y las VPE's, las metacaspasas cortan su sustrato después de una arginina. Las metacaspasas se han clasificado en dos tipos, con base a su secuencia y estructura, las tipo I poseen extensiones en el N-terminal de entre 80

a 120 amino ácidos; esta extensión es rica en prolina y glutamina y contiene un motivo de dedo de zinc que es similar al que presenta la proteína LSD1 involucrada en HR. Este prodominio pudiera ser responsable de las interacciones proteína-proteína entre metacaspasas y/o otros componentes de distintos complejos señalizadores que conducen a la activación de la metacaspasa. Las metacaspasas de tipo II carecen del prodominio, aunque presentan una inserción de aproximadamente 180 aminoácidos separando la subunidad p20 de la p10 (Fig. 5). *Arabidopsis* contiene 3 metacaspasas del tipo I (AtMCP1a–1c) y 6 del tipo II (AtMCP2a–2f) (Vercammen et al. 2004).

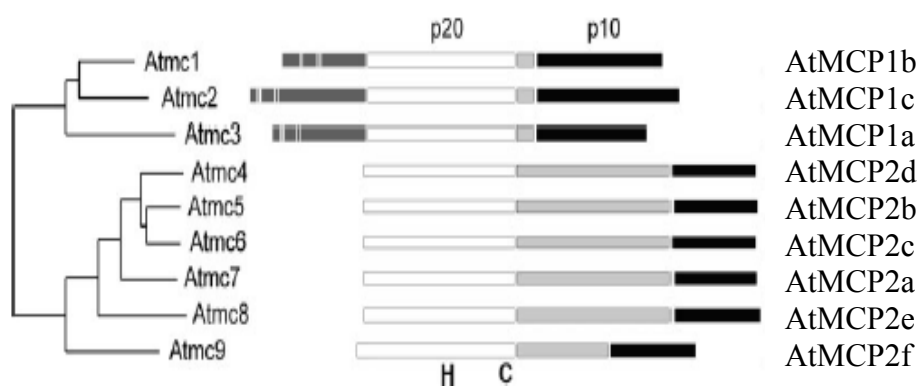


Fig. 5. Árbol sin raíz filogenética de la familia de las metacaspasas en *Arabidopsis*. Las metacaspasas de tipo I se caracterizan por tener un prodominio en la región N-terminal que puede ser responsable de interacciones proteína-proteína. Las del tipo II carecen de este prodominio. La H y la C corresponden la diada catalítica de Cys-His presente en las cisteín-proteasas.

Se ha visto que estos grupos de proteasas tienen la función de regular la MCP en plantas, sugiriendo que éstas pueden tener una función similar al de las caspasas en animales (Coffeen and Wolpert 2004; Hatsugai et al. 2004; Rojo et al. 2004) (Fig.6).

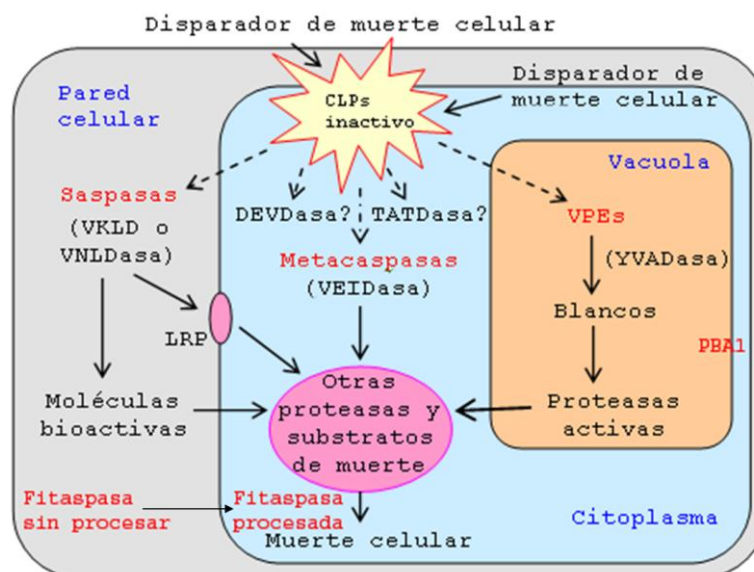


Fig. 6. Localización y posible interacción de las proteasas con actividad tipo caspasa en plantas. La muerte celular inducida por factores exógenos o endógenos dispara la actividad de las diferentes proteasas con actividad tipo-caspasa actuando presumiblemente en diferentes compartimentos de la célula. CLP's, proteasas tipo-caspasa. LRP's, proteínas tipo-receptoras con repeticiones ricas en leucina (Modificado de Woltering, E.J. 2004)

La identificación de los genes de las metacaspasas en *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans*, *P. falciparum*, *A.thaliana* y *H. brasiliensis* ha hecho posible evaluar su participación en eventos de muerte celular en hongos, protozoarios y plantas (Uren et al. 2000). La primera evidencia provino de estudios realizados en *S. cerevisiae* donde se detectó una proteína que presentaba estructura homóloga a las caspasas de mamífero a la que llamaron YCA1 (Yeast caspase-1). Se observó que la sobreexpresión de YCA1 dio como resultado el procesamiento autocatalítico e hizo a las células más sensibles a la muerte por estrés oxidativo o por envejecimiento (Madeo et al. 2002). Sin embargo, como es de esperarse que la sobreexpresión de una proteasa activa cause un estrés endógeno que puede resultar en una mayor sensibilidad a un estrés exógeno, se usó una línea de levadura que tenía interrumpido el gen *YCA1* demostrando ser 3 veces más sensible al H_2O_2 y aproximadamente 10% de las células escaparon a la muerte celular por envejecimiento sugiriendo que YCA1 codificaba para una metacaspasa que activaba la MCP en la levadura (Madeo et al. 2002).

En 2003 se publicó un artículo sobre el aislamiento de una metacaspasa tipo II de jitomate (LeMCA1), muy similar al grupo de las metacaspasas tipo II de *Arabidopsis*

AtMCP2a-d. El ARNm de *LeMCA1* se inducía durante la infección con *Botrytis cinerea* en jitomate (*Solanum lycopersicon Mill*), sugiriendo que el gen de ésta participaba en la MCP inducida por este patógeno. Sin embargo, cuando los experimentos se hacían en cultivos de células, los niveles de ARNm de esta metacaspasa no presentaban una variación significativa al hacer tratamientos químicos que inducen MCP como la camptotecina, fumonisina B1 o con Sa, JA y ET (Hoeberichts et al. 2003).

En el abeto noruego (*Picea abies*) se estudió una metacaspasa del tipo II y se observó que esta metacaspasa se requiere para el iniciar la actividad tipo-caspasa que es inducida durante la embriogénesis somática en células en transición a MCP. Se observó que el transcrito de *mclI-Pa* se expresaba en tejido embrionario comprometido a sufrir MCP y, que el silenciamiento por ARNi impedía la inducción de la actividad tipo-caspasa, inhibiendo así la MCP y la embriogénesis somática. Estos resultados sugieren que *mclI-Pa* muestra una actividad tipo caspasa y activa la MCP, la cual es esencial para el desarrollo del embrión en *P. abies*. (Suarez et al. 2004)

Estos resultados son consistentes con la idea de que las metacaspasas participan de manera importante en la MCP, ya sea durante el desarrollo, o por algún tipo de estrés.

ANTECEDENTES

Uno de los temas de estudio en el laboratorio del Dr. Mario Rocha son los mecanismos de defensa de las plantas a diferentes tipos de estrés. Como se mencionó anteriormente en la introducción, una de las respuestas de defensa de la planta es activar mecanismos que involucran a la MCP, y se cree que las proteasas de cisteína participan en la activación de estos mecanismos. Por lo tanto, es importante estudiar la participación de las metacaspasas en los distintos eventos en donde ocurre la MCP.

Se utilizó a la planta modelo *A. thaliana* para identificar y analizar alguna de las metacaspasas que pudiera participar en eventos de MCP. Para ello se diseñaron oligonucleótidos degenerados sobre la región más conservada que comprende a la histidina y cisteína del sitio activo de los 9 genes reportados que codifican para metacaspasas en *Arabidopsis* (Uren et al. 2000; Vercammen et al. 2004). Para lograr

el objetivo planteado, se extrajo ARNm de plantas de *Arabidopsis* infectadas con la bacteria *pvstavr* para amplificar por medio de RT-PCR los productos de ADNc que tuvieran los rangos de tamaño predichos para las metacaspasas. Los productos obtenidos fueron clonados y para distinguir diferentes clonas, los productos se digirieron con la enzima *Ddel* y se secuenciaron. Así, se identificaron dos metacaspasas de tipo I: AtMCP1c (At4g25110) y AtMCP1b (At1g02170).

Para analizar su expresión por RT-PCR, se sintetizaron oligonucleótidos específicos para AtMCP1b y AtMCP1c y se llevó a cabo una cinética de inducción con *pvstavr*. Los resultados mostraron que la acumulación del mRNA de AtMCP1c se mantiene estable, mientras que el nivel de mRNA de AtMCP1b se induce. Por lo tanto se decidió seguir trabajando con AtMCP1b (Castillo-Olamendi et al. 2007).

En el laboratorio se observó que en los cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis* tratados con estaurosporina 2 μ M (un inhibidor de cinasas de proteína que induce MCP) por 24 hrs, la viabilidad de las células va de un 95% inicial a un 40% final aproximadamente. Al medir la acumulación del ARNm de *AtMCP1b* en células tratadas con estaurosporina, éste comenzaba a acumularse 2 horas después del tratamiento y alcanzaba su nivel máximo 24 hrs después, indicando una correlación positiva entre la acumulación del ARNm de *AtMCP1b* y la muerte celular (Castillo-Olamendi et al. 2007) (Fig.7).

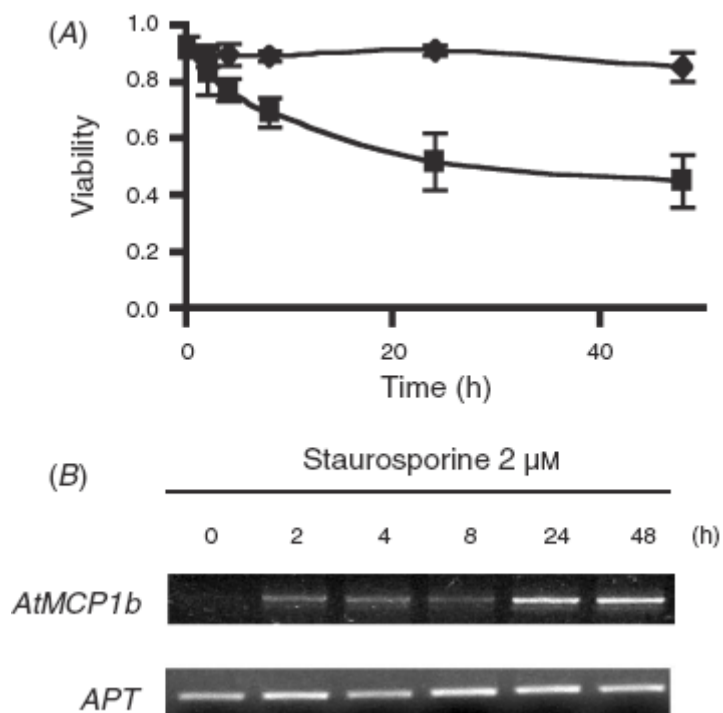


Fig. 7. Efecto de la estaurosporina en cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*. Las células en suspensión fueron tratadas con estaurosporina 2 μ M. (A) La viabilidad del cultivo fue monitoreada con azul de tripano y por tinción con FDA. Las barras representan el error estándar de la media ($n=3$), contando de tres a cuatro campos del microscopio cada vez. Estaurosporina ■, control ♦. (B) La acumulación de ARNm de *AtMCP1b* fue analizada por RT-PCR. El ARN total fue aislado de tejidos control y tratados con estaurosporina a distintos intervalos de tiempo. Alícuotas de 5 μ L del producto de PCR fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa y observadas por tinción con bromuro de etidio. La acumulación del ARNm de *APT* (*Adenosinephosphoribosyl transferase-1*) se usó como control de expresión constitutivo (Castillo-Olamendi et al. 2007).

En otros experimentos se observó que la acumulación del ARNm de *AtMCP1b* se inducía por herida en plantas tipo silvestre de *Arabidopsis* alcanzando su nivel máximo a las 4 hrs y bajando después de 24 hrs; cuando las plantas fueron infectadas con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (avr y vir), se observa un aumento claro en la acumulación del ARNm de *AtMCP1b* 6 horas después de la inoculación, en comparación con los niveles basales (Castillo-Olamendi et al. 2007) (Fig. 8).

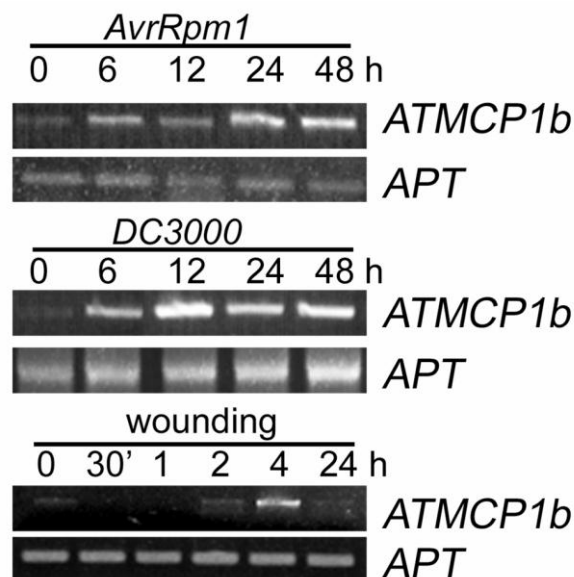


Fig. 8. Los patógenos y la herida inducen la expresión del ARNm de *AtMCP1b* en *Arabidopsis thaliana*. La acumulación del ARNm de *AtMCP1b* fue analizada después de la infección con *Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrRpm1*) o DC3000 o por herida. El ARN total fue aislado de tejidos control y tratados con estaurosporina a distintos intervalos de tiempo. Alícuotas de 5 μ L del producto de PCR fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa y observadas por tinción con bromuro de etidio. La acumulación del ARNm de *APT* (*Adenosinephosphoribosyl transferase-1*) se usó como control de expresión constitutivo (Castillo-Olamendi et al. 2007).

Al infectar plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contenían una construcción con la región promotora del gen de *AtMCP1b* fusionado al gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS) (*P1b::GUS*), se observó que la región promotora de *AtMCP1b* es capaz de dirigir la expresión de GUS al infectarlas con *pst* (*avr* y *vir*) y que la expresión de *AtMCP1b* se induce en las interacciones compatibles e incompatibles (Castillo-Olamendi et al. 2007) (Figs.9 y 10).



Fig. 9. Localización histoquímica de *AtMCP1b-GUS* en hojas de cotiledón de *Arabidopsis thaliana* después de la infección con *Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrRpm1*) y DC3000. (A) Control inoculado con $MgCl_2$, (B) DC3000 (*avrRpm1*) y (C) DC3000 (Castillo-Olamendi et al. 2007).

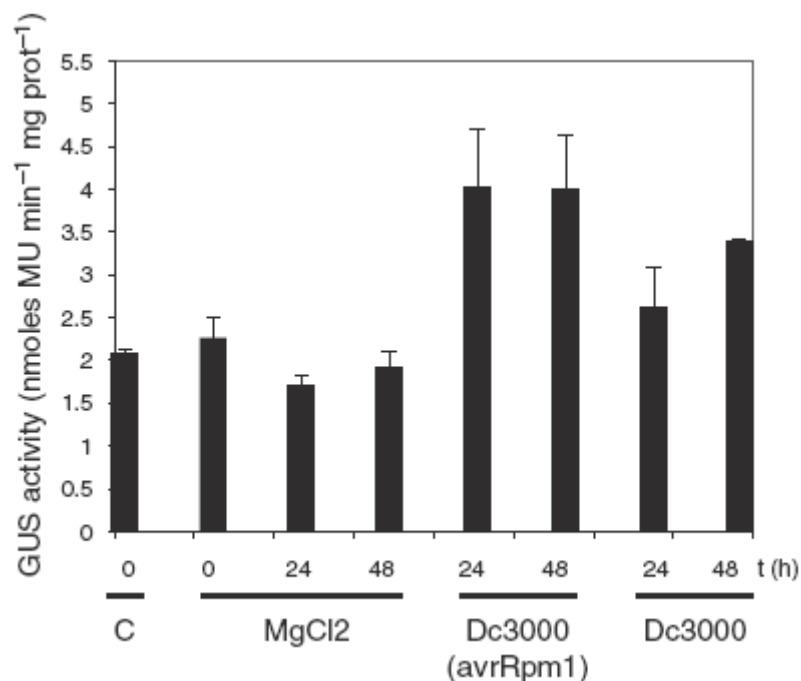


Fig. 10. Inducción de *AtMCP1b-GUS* en hojas de cotiledón de *Arabidopsis thaliana* infectadas con *Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrRpm1*) o DC3000. La actividad de GUS se determinó por fluorimetría y se expresó como nmoles de 4-methylumbelliferona (MU) por min y mg de proteína total. Las barras representan el error estándar de la media ($n=3$) (Castillo-Olamendi et al. 2007).

Debido a que el Sa está involucrado en la respuesta a los patógenos, se analizó si el Sa podría estar involucrado en la regulación de la expresión de *AtMCP1b*. Para ello, se hicieron tratamientos con Sa en plantas de *Arabidopsis* del tipo silvestre a diferentes tiempos para analizar si había acumulación del ARNm de *AtMCP1b*. Como se observa en la Fig. 11, a las 4 hrs post-tratamiento se observa una mayor acumulación del ARNm de *AtMCP1b*. Este tratamiento se repitió en las plantas transgénicas P1b::GUS midiendo la actividad de GUS a las 4 hrs post-tratamiento, observando un incremento de la actividad de GUS en las plantas tratadas con Sa en comparación con el control que sólo fue tratado con agua (Fig.12).

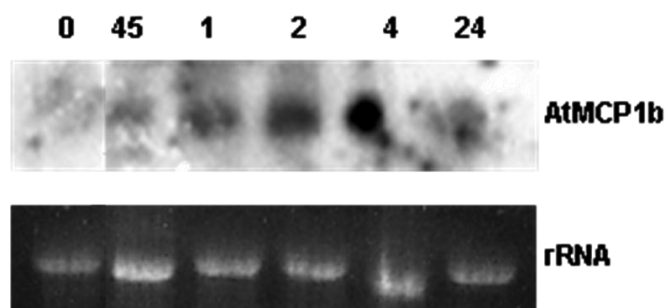


Fig. 11. Ensayo por northern blot para observar la acumulación del ARNm de *AtMCP1b* al inducir plantas wt con Sa. Las plantas fueron tratadas con Sa 4mM y recolectadas a intervalos de tiempo.

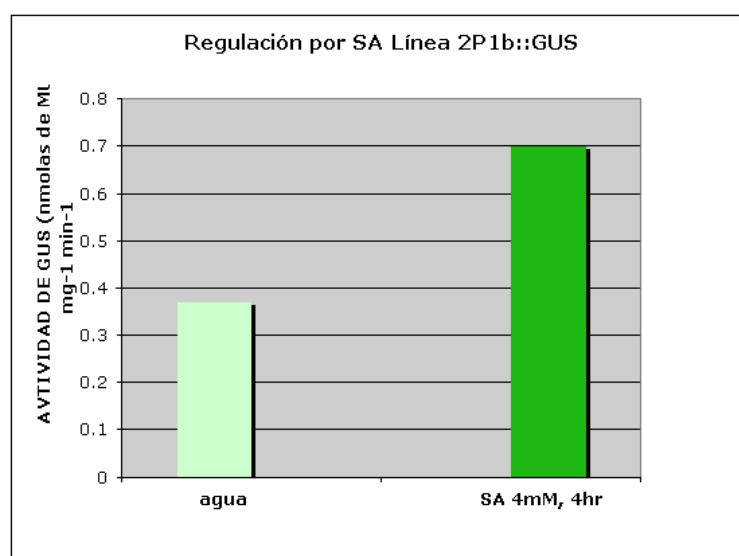


Fig. 12. Actividad de GUS en la línea transgénica P1b::GUS al ser tratada con Sa 4mM.

En base a estos resultados nos hemos planteado la hipótesis de que el Sa participa en la regulación tanto de la expresión del gen como en la actividad de la proteína *AtMCP1b* durante la activación de la MCP, debida a la infección con *pstavr* en plantas de *A. thaliana*.

HIPÓTESIS

El Sa funciona como mediador de la expresión del gen de la metacaspasa AtMCP1b y la activación de su proteína durante la infección con *Pseudomonas syringae pv tomato avrRpm1 (pstavr)*.

OBJETIVO GENERAL

- ☞ Analizar la regulación de la acumulación del ARNm de AtMCP1b por el Sa y el procesamiento del zimógeno de AtMCP1b, en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae pv tomato avrRpm1 (pstavr)* en plantas de *A. thaliana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ☞ Corroborar si *pstavr* induce la acumulación del ARNm de AtMCP1b en la plantas tipo silvestre.
- ☞ Determinar si la deficiencia en la biosíntesis de Sa en la línea mutante *eds-16* afecta la acumulación del ARNm de AtMCP1b en respuesta a la infección por *pstavr*.
- ☞ Analizar la acumulación y el procesamiento de la proteína AtMCP1b en respuesta a la infección por *pstavr*. Para esto se generarán plantas transgénicas que lleven la fusión traduccional de la región codificante del gen de la metacaspasa AtMCP1b y la región codificante del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del gen AtMCP1b en plantas de tipo silvestre.
- ☞ Determinar si el Sa regula la acumulación y el procesamiento de la proteína AtMCP1b. Para lo anterior se generarán plantas transgénicas que lleven la fusión traduccional de la región codificante del gen de la metacaspasa AtMCP1b y la región codificante del gen de (GFP) bajo el control del promotor del gen AtMCP1b en el fondo mutante *eds16*.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. GENERACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

PROGRA::1b::GFP

Diseño de los oligonucleótidos

Con el fin de hacer una fusión traduccional se diseñaron oligonucleótidos de la región promotora (progra) del gen AtMCP1b, de la región codificante del gen AtMCP1b y de la región codificante del gen GFP, flanqueados por los sitios *attB* usando el sistema Gateway® que está basado en el sistema de recombinación sitio-específica del fago λ. El diseño de los oligonucleótidos con la secuencia incorporada de los sitios *attb* se realizó conforme lo señala el manual para el MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit de Invitrogen. Esta técnica permite una construcción rápida y eficiente de un vector de expresión conteniendo tres fragmentos de interés en un orden y orientación definidos.

Los oligonucleótidos que se usaron fueron los siguientes:

PROGRAGW5: GGG GAC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG TGA GTC ATG CTC CTG ATC TC
attB4

PROGRAGW3: GGG GAC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGT TAT TAT TCT CGG AAG GGA GGG A
attB1

GW570F: GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GTA CCC GCC ACC TCC CTC A
attB1

GW570R: GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GAAGT GAA AGG CTT TGC ATA
attB2

F-attB2-EGFP: GGG GAC AGC TTT CTT GTA CAA AGT GGC TATGGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT G
attB2

R-attB3-EGFP: GGG GAC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGA TCACTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G
attB3

Los oligonucleótidos se sintetizaron en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

PCR para la obtención de la región promotora (progra) flanqueada por los sitios *attB*

Se realizaron 3 reacciones de PCR a diferentes concentraciones de ADN genómico.

Para cada reacción de 50 μ l se mezcló lo siguiente: 5 μ l de Buffer Accuprime 10X de Invitrogen, 3 μ l, 6 μ l ó 9 μ l de ADN genómico como templado, 1.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos PROGRAGW5 y PROGRAGW3 [10 pmol/ μ l], 1 μ l Accuprime Pfx ADN Pol de Invitrogen, la mezcla se llevó a un volumen final de 50 μ l con agua MQ estéril.

Se programó el termociclador de la siguiente manera:

- Desnaturalización del templado 2 min 95°C.

3 pasos que se repitieron en 35 ciclos:

- Desnaturalización a 95°C, 15 seg.
- Alineamiento a 58°C, 30 seg.
- Extensión a 68°C, 1 min.

El último paso fue de 3 min a 72°C para que se completen las cadenas. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 0.5 X (Tris Base 0.02 M, Ac. acético glacial 0.01 M, EDTA pH 8 0.5 M) con bromuro de etidio.

Reacción de recombinación BP

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR con los extremos *attB4* y *attB1*, se realizó la reacción de recombinación BP, como lo indica el MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit de Invitrogen, de la región promotora de la AtMCP1b flanqueada con los extremos *attB4* y *attB1* en el vector de clonación pDONR P4-P1R. Para ésto se siguió el siguiente protocolo:

En un tubo de 1.5 ml se mezclaron:

Producto <i>attB</i> -PCR	7 μ l
Vector pDNOR P4-P1R	1 μ l
Total	8 μ l

Al tubo se le agregaron 2 μ l de BP clonasa™ II (mezcla de las proteínas λ Integrasa (Int) y el factor de recombinación del hospedero (IHF) de *E.coli* que promueven la recombinación de attB x attP en la reacción); esto se mezcló y se incubó a 25°C por 1 hr. Después se agregó 1 μ l de proteinasa K para terminar la reacción y se incubó a 37°C por 10 min.

Transformación con células competentes One Shot[®] TOP10

Para la transformación se siguió el protocolo que se indica en el MultiSite Gateway[®] Three-Fragment Vector Construction Kit de Invitrogen.

En un tubo que contiene células competentes One shot[®] TOP 10 se agregó 1 μ l de la reacción BP.

- Se incubó en hielo 30 min.
- Se pasaron las células a 42°C 30 seg.
- Se agregaron 250 μ l de medio LB líquido (Peptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, Cloruro de sodio 1%).
- Se incubó a 37°C 1 hr.

Se plaquearon 20 μ l ó 100 μ l de la transformación en medio LB sólido (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%, agar 1.5%) con kanamicina 25 μ g/ml. Las células se dejaron toda la noche creciendo. Cuando ocurre la reacción de recombinación entre el vector “destino” y el fragmento de entrada, el inserto de interés reemplaza al gen *ccdB*. Las células en las que no hubo reacción de recombinación y que se quedaron con el gen *ccdB* no crecen ya que el gen *ccdB* interfiere con la ADN girasa de *E.coli* haciendo que la replicación de ADN se inhiba.

PCR en colonia

De las dos cajas con medio LB sólido con 25 μ g/ml de kanamicina en las que se plaquearon las células transformadas 20 μ l ó 100 μ l, se tomaron 5 colonias de cada caja para hacerles PCR en colonia para buscar clonas positivas que tengan la región promotora de AtMCP1b. Con una punta de micropipeta se tomó una colonia y se “parchó” ésta en una caja de medio LB sólido con 25 μ g/ml de kanamicina, el resto de

la colonia que se quedó en la punta se metió a un tubo de PCR. Se hizo lo mismo con otras 9 colonias. La mezcla final quedó de la siguiente manera:

En un tubo para PCR se mezclaron: colonia como templado, buffer 10X smg 2.5 µl, dNTP's 10 mM 0.5 µl, Mg 25 mM 1.5 µl, oligonucleótidos PROGRAGW3 y PROGRAGW5 10 pm/µl 0.5 µl cada uno, Taq pol 2 µl, agua MQ 17.5 µl.

El programa que se utilizó en el termociclador fue el siguiente:

- 2 min a 95°C para que las células de *E.coli* se rompan y se libere el ADN.

3 pasos que se repitieron en 35 ciclos

- 15 seg. a 95°C.
- 30 seg. a 58°C.
- 1 min a 68°C.

Un último paso de 3 min a 72°C para que se completen las cadenas. El producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio.

Extracción del ADN de bacterias

De las 10 colonias parchadas se escogieron 2 para hacer extracción de ADN plasmídico. Se utilizó el high pure plasmid isolation kit de Roche[®], de acuerdo al protocolo descrito. Las colonias se crecieron en 3 ml de medio LB líquido con 25 µg/ml de kanamicina durante toda la noche. Las células se centrifugaron 30 segundos a 9,000 rpm y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 250 µl del buffer de suspensión/ARNsa. Se agregaron 250 µl del buffer de lisis, se mezcló suavemente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 350 µl del buffer de unión (binding buffer) previamente enfriado en hielo. Se mezcló suavemente y se incubó 5 minutos en hielo, se centrifugó 10 min a velocidad máxima, se recuperó el sobrenadante y se descartó la pastilla. El sobrenadante se transfirió a un "high pure filter tube" y se centrifugó a velocidad máxima por 1 min. Se descartó el líquido filtrado. Al "high pure filter tube" se le agregaron 500 µl del buffer de lavado I, se centrifugó a 15,200 g por 1 min y se volvió a descartar el líquido que se filtró. Al "high pure filter tube" se le adicionaron 700 µl del buffer de lavado II, se centrifugó a 15200 g por 1 min, se volvió a descartar el líquido que se filtró y se volvió a centrifugar 1 min más a

15200 g. Para despegar el ADN plasmídico se agregaron 100 µl de agua MQ al tubo y se centrifugó a 15200 g por 1 min; el líquido filtrado se guardó.

Reacción de recombinación LR MultiSite Gateway[®]

La reacción de recombinación LR se realizó siguiendo lo indicado en el manual del MultiSite Gateway[®] Three-Fragment Vector Construction Kit de Invitrogen. El ADN plasmídico de las clonas de entrada para los genes de AtMCP1b y GFP ya se tenía purificado en el laboratorio. Se utilizó el vector binario pB7m34GW (Fig.13) que puede ser replicado tanto en *E.coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*, ésto con el fin de poder transformar el vector con el inserto deseado en *Agrobacterium* más adelante y una vez en dicha bacteria, ésta pueda infectar a la planta y meter en ella la construcción de interés. La reacción de recombinación LR se realizó de la siguiente manera:

En un tubo de 1.5µl se mezclaron:

- | | |
|--|---------|
| • Fragmento de entrada attL4 y attR1 (25fmoles progra) | 0.63 µl |
| • Fragmento de entrada attL1 y attL2 (25fmoles 1b) | 1.59 µl |
| • Fragmento de entrada attR2 y attL3 (25fmoles GFP) | 0.63 µl |
| • Vector pB7m39GW (60 ng/reacción) | 0.6 µl |
| • 5x Buffer LR clonasa | 4.0 µl |
| • TE Buffer | 8.55 µl |
| • LR clonasa II Plus | 2.0 µl |

Se mezcló y se incubó toda la noche a 25° C.

- Proteinasa K 2 µl

Se incubó 10 min a 37° C.

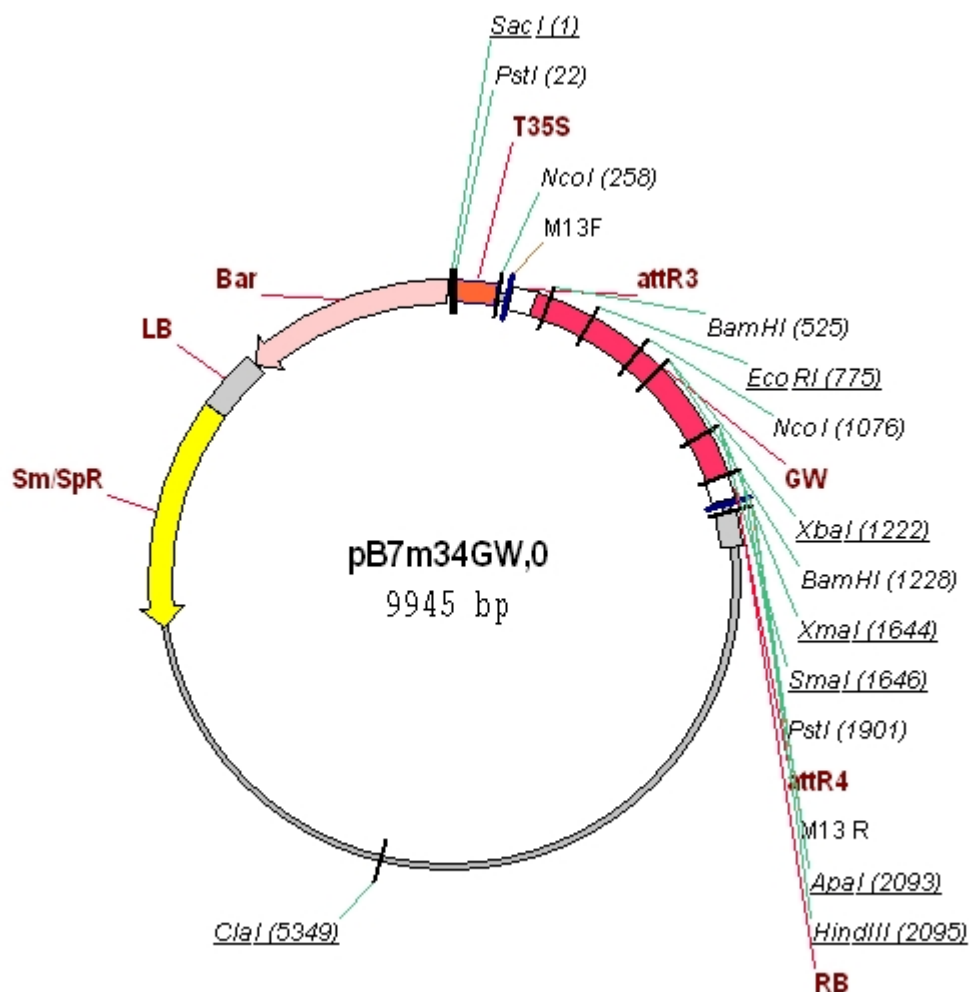


Fig. 13. Descripción del vector binario pB7m34GW.

La LR clonasa II Plus (mezcla de las proteínas Exisionasa (Xis) y la Integrasa (Int) de λ y el factor de recombinación del hospedero (IHF) de *E.coli* promueven la recombinación de attL x attR en la reacción).

La transformación con células competentes One Shot[®] TOP10 se realizó como se indicó anteriormente. Se plaquearon 50 μ l y 50 μ l-concentrados (después de tomar los primeros 50 μ l se centrifugó el resto de las células y se eliminó el medio para que éstas quedaran concentradas en 50 μ l) de la transformación en cajas con medio LB sólido con espectinomicina (25 μ g/ml).

Transformación en *Agrobacterium*

De las cajas en las que se sembraron las células transformadas se tomaron 5 colonias de cada una (50 μ l y 50 μ l-concentrado) para hacer una PCR de las colonias y comprobar si contenían el segmento de ADN de interés. Se escogió una clona positiva y se puso a crecer en 3 ml de medio LB líquido con espectinomicina 25 μ g/ml para extraer ADN plasmídico utilizando el kit de Roche® high pure plasmid isolation. El plásmido aislado se usó para transformar la cepa C58C1-pGV2260 de *A. tumefaciens*, la cual contiene el gen de resistencia a rifampicina.

La metodología para la transformación fue la siguiente:

A dos tubos con 60 μ l de células electrocompetentes de la cepa C58C1-pGV2260 de *A. tumefaciens* se les agregó (A)1 μ l ó (B)2 μ l de ADN plasmídico. El contenido se pasó a dos celdas para electroporar; se electroporó y se agregaron 500 μ l de medio LB líquido a cada celda. El contenido de las celdas se pasó a dos tubos de 1.5 ml y se pusieron a 28°C 1 hr en rotación. Se plaquearon 50 μ l ó 50 μ l concentrado en cajas con medio LB sólido y espectinomicina 100 μ g/ml y rifampicina 100 μ g/ml. Se dejaron en incubación de 1 a 2 días a 28°C.

De las cajas en las que se plaquearon las células de *Agrobacterium* se tomaron 14 colonias de la caja (B) y 5 colonias de la caja (A) para analizar por “PCR en colonia” si contenía el plásmido de interés, usando los oligonucleótidos PROGRAGW5 y PROGRAGW3. Se escogieron 4 colonias para realizar otras “PCR en colonia” usando combinaciones de los 6 oligonucleótidos (PROGRAGW5, PROGRAGW3, GW570F, GW570R, F-attB2-EGFP, R-attB3-EGFP) para asegurar que los insertos se encontraran en la posición y el sentido deseados.

Transformación de *Arabidopsis*

La transformación se realizó siguiendo el método de (Clough and Bent 1998) mediante la técnica de inmersión floral.

Material vegetal

Se usaron semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y de las mutantes *eds-16* (obtenidas de F.M. Ausubel, Universidad de Harvard). Las semillas se sembraron en macetas con Metro-Mix 200[®]. Para prevenir que al momento de realizar la inmersión floral el sustrato se saliera, se colocó una malla de tul en la parte superior de la maceta y se sujetó con una liga. Las macetas se cubrieron con un domo transparente y se dejaron toda la noche a 4°C, al día siguiente se pasaron a un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad, a una temperatura de 25°C ± 1°C. El domo se retiró aproximadamente 5 días después, una vez que las plántulas habían emergido. Para obtener una mayor cantidad de botones de forma sincronizada por planta, las inflorescencias fueron cortadas después de que la mayoría de las plantas habían formado los botones primarios.

Inoculación de las plantas

Se inoculó una colonia de *Agrobacterium* con la construcción de interés en un tubo con 5 ml de medio LB líquido con los antibióticos rifampicina 100 µg/ml y espectinomicina 100 µg/ml y se incubó a 28°C en agitación por 1-2 días. Con los 5 ml se inoculó un matraz con 1 L de medio LB líquido con los antibióticos rifampicina 100 µg/ml y espectinomicina 100 µg/ml y se incubó a 28°C en agitación por 1-2 días. La densidad óptica se midió y se hicieron los cálculos para tener una solución con una DO₆₀₀ final de 0.8. Las células se recuperaron por centrifugación a 5500 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1 L de una solución de sacarosa al 5% y Tween 0.005%. El inóculo se colocó en una cámara de acrílico donde se sumergieron las plantas por 10 seg. Una vez que las plantas fueron sumergidas se colocaron horizontalmente en una charola, se cubrieron con un domo transparente y se colocaron en el cuarto de crecimiento. Después de 48 hr se retiró la cubierta de plástico, las plantas se siguieron cuidando hasta que las silicuas estaban

secas (2-3 semanas). Una vez que las plantas se secaron, las semillas fueron recolectadas presionando las silicuas suavemente con los dedos sobre un papel y tamizándolas con una malla. Las semillas se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a 4°C.

Selección de las posibles plantas transgénicas

Las semillas se esterilizaron de la siguiente forma:

- 1 ml H₂O estéril 15 min.
- 1 ml etanol 70% 1 min.
- 1 ml NaClO comercial 50% 8 min.

Las semillas se lavaron de 4 a 5 veces con 1 ml de H₂O para eliminar trazas de NaClO y se resuspendieron en 1ml de agua estéril. Después se colocaron con la ayuda de una micropipeta en cajas con medio GM (sales Murashige & Skoog 0.431% vitamina B-5 0.1%, MES 2.34 mM, sacarosa 1%, phytagar 0.8%, pH 5.7) complementado con 15 µg/ml de Finale[®] (Glufosinato de amonio, inhibe la actividad de la enzima glutamino sintetasa) tratando que las semillas quedaran bien separadas entre ellas. Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron a 4°C toda la noche, al otro día se sacaron y colocaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a 25°C ± 1° C. Las posibles plantas transgénicas fueron identificadas como aquéllas en que después de 10 días tenían hojas verdes y raíces en el medio de selección. Las plántulas que habían crecido se recolectaron después de 10 días y se colocaron en una caja nueva con medio GM sin Finale[®], se dejaron creciendo de 5 a 7 días más y pasado el tiempo se transplantaron a macetas con Metro-Mix 200[®]. Las macetas se taparon con película plástica y se colocaron en el cuarto de crecimiento a 25°C ± 1°C. Conforme pasaron los días se fueron haciendo hoyos en la película para que la planta se fuera adaptando a una humedad relativa más baja. Después de aproximadamente 7 días se retiró por completo la película plástica.

Verificación de la inserción en las plantas transgénicas

Se extrajo ADN genómico de las posibles plantas transgénicas con la siguiente metodología:

- Se molieron las hojas congeladas en nitrógeno líquido con un pistilo en un tubo de 1.5 ml.
- Se adicionaron 300 µl de buffer 2X CTAB (Tris/HCl pH 8.0 100 mM, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, bromuro de cetiltrimetil amonio 2% (w/v), β-Mercaptoetanol 0.2% (w/v)) y se incubó a 65°C por 10 min.
- Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se agregaron 300 µl de cloroformo y se mezcló en el vortex.
- Para separar las fases se centrifugó 5 min a máxima velocidad.
- La fase superior se colectó en un nuevo tubo, se agregaron 300 µl de alcohol isoamílico, se mezcló bien y se dejó 1-2 hr a -20°C.
- Para separar el ADN precipitado se centrifugó 5 min a máxima velocidad.
- El sobrenadante se retiró y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó 5 min a máxima velocidad.
- El sobrenadante se retiró, se dejó secando la pastilla y posteriormente se resuspendió en H₂O MQ.

Con el ADN se realizaron reacciones de PCR usando los oligonucleótidos de los fragmentos que se insertaron en el vector para verificar si se tenía la construcción con los tres fragmentos.

II. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm Y DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA AtMCP1b EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS PROGRA::1b::GFP

Extracción del ARN

La extracción se realizó siguiendo el método de TRIzol[®] de Invitrogen.

- Se molió el tejido congelado con un homogeneizador evitando que la muestra se descongelara.
- Se agregó 1 ml de TRIzol[®] y se homogeneizó en el vortex.
- Se incubaron las muestras 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos nucleoprotéicos.
- A cada una de las muestras se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por 1ml de TRIzol[®] y se agitaron.
- Las muestras se incubaron por 3 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se centrifugaron a velocidad máxima durante 15 min.
- Se tomó el sobrenadante cuidando de no extraer la fase orgánica.
- Se adicionaron 0.5 ml de alcohol isopropílico y se incubó mínimo 10 min.
- Pasado el tiempo, las muestras se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 min.
- Se quitó el sobrenadante y la pastilla formada se lavó con 1 ml de etanol al 75%.
- Se centrifugó a 5,200 g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante.
- La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y, finalmente, se resuspendió en 20 µl de agua MQ.

El ARN se cuantificó midiendo la densidad óptica a 260 nm (se considera 1U de D.O. = a 40 µg de ARN).

RT-PCR

En una reacción de PCR se mezcló:

- 2 µg de la muestra de ARN.
- 500 µg/ml de Oligo-dT.
- La reacción se completó a un volumen final de 12 µl con agua.

Esta mezcla se calentó en el termociclador a 70°C durante 10 min, al término de los cuales se sacó la reacción del termociclador y se añadieron:

- 1 µl de dNTP's (10 mM).
- 2 µl de DTT (0.1 M).
- 4 µl de buffer de reacción 5X para RT-PCR (First strand), para dar 19 µl totales.

La reacción se calentó en el termociclador a 42°C durante 2 min para después agregarle 1 µl de la enzima Transcriptasa Reversa del virus murino (Invitrogen) y finalmente, se calentaron a 37°C durante 50 min, con un paso final de 15 min a 70°C. El producto final fue el ADNc.

PCR

Para reacciones de 50 µl totales, se mezclaron:

- 5 µl buffer para PCR 10X.
- 1 µl dNTP's 10 µM.
- 3 µl de magnesio 25 mM
- 1 µl de oligonucleótidos 3' y 5' del gen de la metacaspasa AtMCP1b (10 picoM).
- 4 µl Taq polimerasa
- 2 µl de ADNc.

El termociclador se programó de la siguiente manera:

1 ciclo de 2 min a 95°C para separar las cadenas

De 25 a 35 ciclos en 3 pasos:

- 15 seg. a 95°C.
- 30 seg. a la temperatura de apareamiento 58°C.
- 1 min a 68°C.

1 ciclo de 3 min a 72°C.

El producto se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, utilizando luz U.V.

Extracción de la proteína total y experimentos tipo western blot

El tejido congelado en nitrógeno líquido se molió en un tubo de 1.5 ml, aproximadamente hasta la marca de 500 µl; el tejido molido se homogeneizó con 250 µl de buffer de carga de proteínas (SDS 4%, glicerol 20%, Tris-HCl pH 6.8 100 mM, DTT 200 mM, azul de bromofenol 0.1%), las muestras se calentaron a 90-95°C por 5-10 min, se centrifugó a velocidad máxima por 10 min y se recolectó el sobrenadante.

La cuantificación de la proteína total se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad®) utilizando como referencia un estándar de albúmina de suero bovino.

Para hacer la separación de las proteínas se usaron geles de poliacrilamida al 15% (acrilamida/bisacrilamida (36.5:1, 30%), Tris 1.5 M pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio al 0.1%, TEMED 0.04%) en presencia de buffer para electroforesis (Tris 0.1 M, glicina 0.1 M, SDS 0.1%). Se cargaron alícuotas de 20 µg de proteína total y se separaron por electroforesis a 130 V. Se hizo una transferencia húmeda (buffer Tris 25 mM, glicina 0.2 M, metanol 20% v/v) a membranas de nitrocelulosa (Hybond C®, Amersham®) durante 2 hr a 400 mA (4°C). La transferencia se verificó tiñendo la membrana con rojo de Ponceau, el colorante se lavó con PBS-T 1X (NaCl 0.27 M, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, KH₂PO₄ 3.5 mM, Tween 20 al 0.05%). La membrana se incubó 2 hr a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en 10 ml de solución PBS-T 1X con 3% de leche en polvo baja en grasa (Svelty® de Nestlé®). Se lavaron las membranas 3 veces con PBS-T 1X y se dejaron incubando 3 hr con el primer anticuerpo. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS-T 1X y se incubaron 1 hr con el segundo anticuerpo. Finalmente, se lavaron 3 veces más con PBS-T 1X y se incubó con el sustrato de fosfatasa alcalina siguiendo las instrucciones del proveedor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. GENERACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

PROGRA::1b::GFP

Para poder observar el comportamiento de la metacaspasa AtMCP1b bajo los tratamientos con *pstavr* en plantas silvestres (wt) y la mutante *eds-16* se generaron plantas transgénicas con la fusión traduccional de la región promotora y de la región codificante del gen de la metacaspasa AtMCP1b y la región codificante del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y de esta forma poder observar la acumulación y procesamiento de la proteína AtMCP1b.

Usando el sistema Gateway[®] multisitio se hizo la construcción PROGRA::1b::GFP. En la Fig. 14 se observa como quedó finalmente la construcción usada para transformar plantas de *A. thaliana* con fondo wt y *eds-16*.

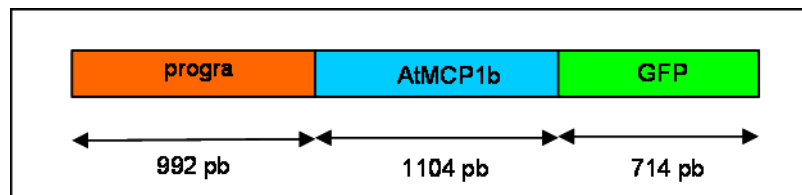


Fig. 14. Fusión traduccional de la región promotora y codificante de AtMCP1b y la región codificante del gen de GFP usando el sistema Gateway[®].

Se obtuvieron 17 líneas de *A. thaliana* en fondo wt y 22 en fondo *eds-16* de la generación T3, conteniendo la construcción PROGRA::1b::GFP como resultado de la transformación y la selección con Finale[®] (Fig. 15).

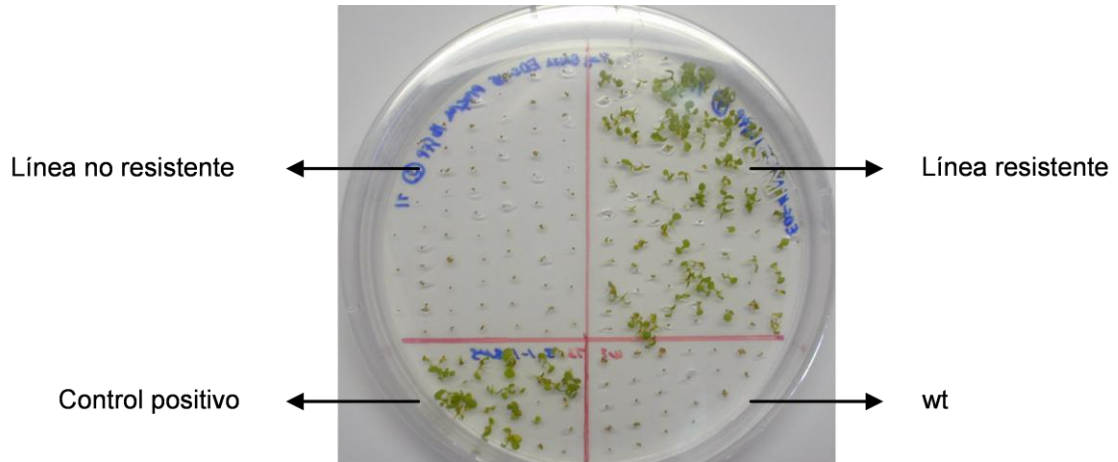


Fig. 15. Selección en caja de plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP. Se seleccionaron las líneas que crecieron en medio GM suplementado con Finale® 15µg/ml.

Con el objetivo de verificar que en cada generación de plantas transgénicas se encontraran los fragmentos de interés y que éstos estuvieran colocados en la orientación correcta, se extrajo ADN de las hojas en cada generación de plantas para hacer PCR usando los oligonucleótidos de cada una de las secuencias insertadas en el vector Gateway® multisitio. También se usó la combinación del oligonucleótido 5' de la secuencia de la metacaspasa 1b y como 3' se usaron 2 oligonucleótidos ubicados en diferente posición dentro de la secuencia de GFP (Fig. 16).

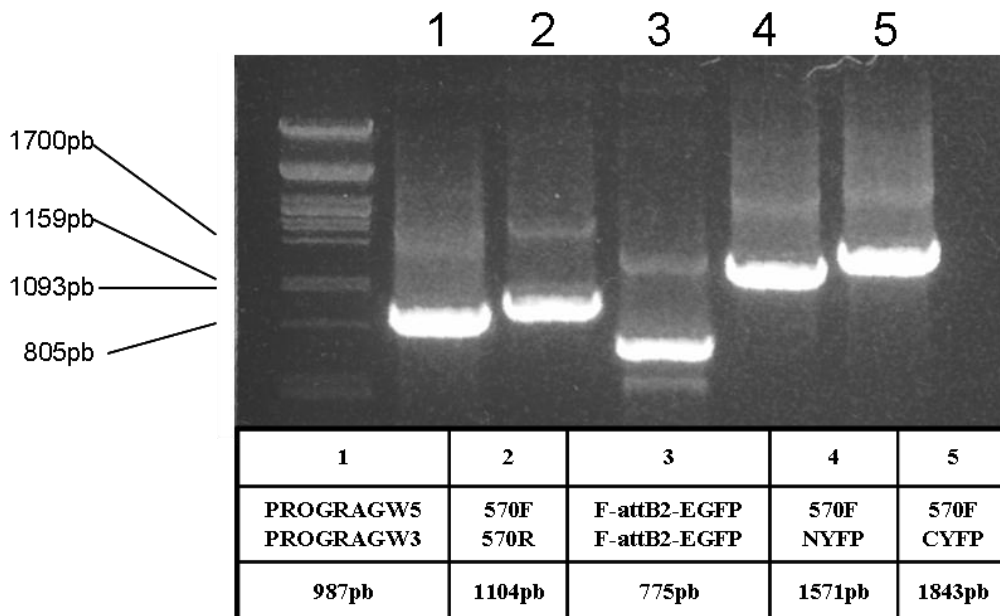


Fig. 16. Análisis de plantas transgénicas progra::1b::GFP por PCR a partir de ADN genómico usando diferentes combinaciones de oligonucleótidos. Un volumen de 5 µl del producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y observado por tinción con bromuro de etidio.

Para confirmar que la construcción se encontrara en fase, se secuenció un fragmento de la misma construcción que comprende una parte del extremo carboxilo de la región codificante de la metacaspasa 1b y una parte del extremo amino de la región codificante de la GFP (Fig. 17); las líneas rojas en la figura indican la región que incluye al fragmento de la metacaspasa 1b mientras que la parte azul incluye el fragmento amino de la GFP; la región de la secuencia que se encuentra sin marcar comprende el sitio attb2 producto de la recombinación entre los vectores donadores en el sistema Gateway® Multisitio.

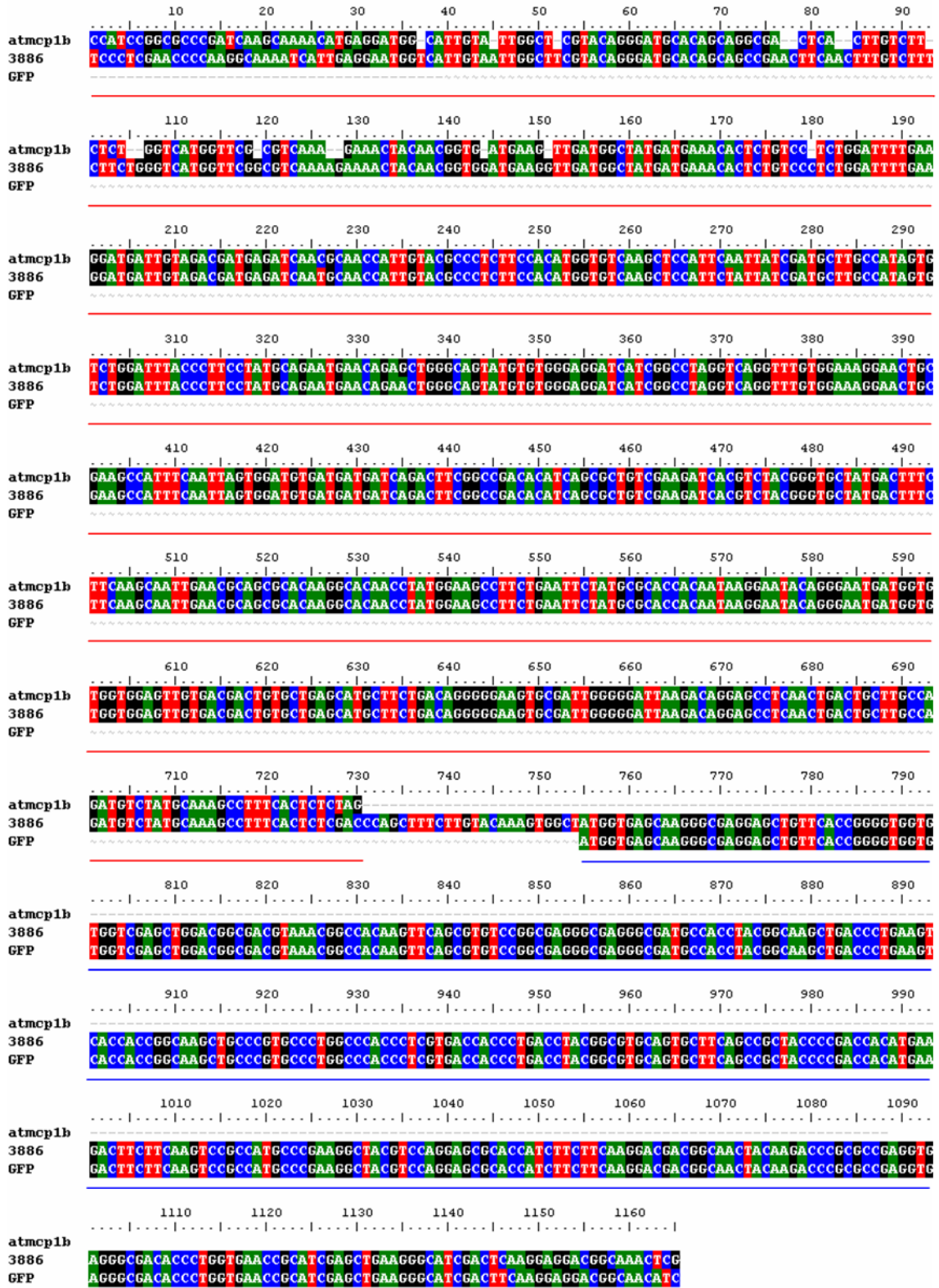


Fig. 17. Análisis de la secuencia que comprende la región donde se localiza la unión entre la metacaspasa y GFP. Las líneas rojas representan la región del extremo carboxilo de la metacaspasa 1b, las líneas azules, la región del extremo amino de la GFP; la región sin marcar comprende el sitio attb2 producto del evento de recombinación.

De las 17 líneas obtenidas que portan la construcción *progra::1b::GFP* en fondo *wt*, se escogieron las líneas 3.6.1 y 2.18.1 ya que, cuando se hicieron ensayos de western blot en extractos de proteína de varias líneas transgénicas portando la construcción *PROGRA::570::GFP* inducidas con *pstavr*, en estas dos se observó una banda de mayor intensidad con respecto a las otras líneas y que correspondía al peso esperado de la fusión AtMCP1b-GFP.

Las semillas de estas líneas se germinaron y a las 3 semanas de germinación se hirieron las hojas de la roseta con unas pinzas; cuatro horas después éstas se recolectaron, se congelaron en nitrógeno líquido y la proteína total se extrajo para verificar la presencia de la fusión AtMCP1b-GFP por medio de ensayos tipo western blot usando anticuerpos anti GFP (Fig. 18); también se hizo éste mismo ensayo para evaluar un anticuerpo para AtMCP1b sin embargo, de acuerdo a los resultados da señal inespecífica (Fig. 18).

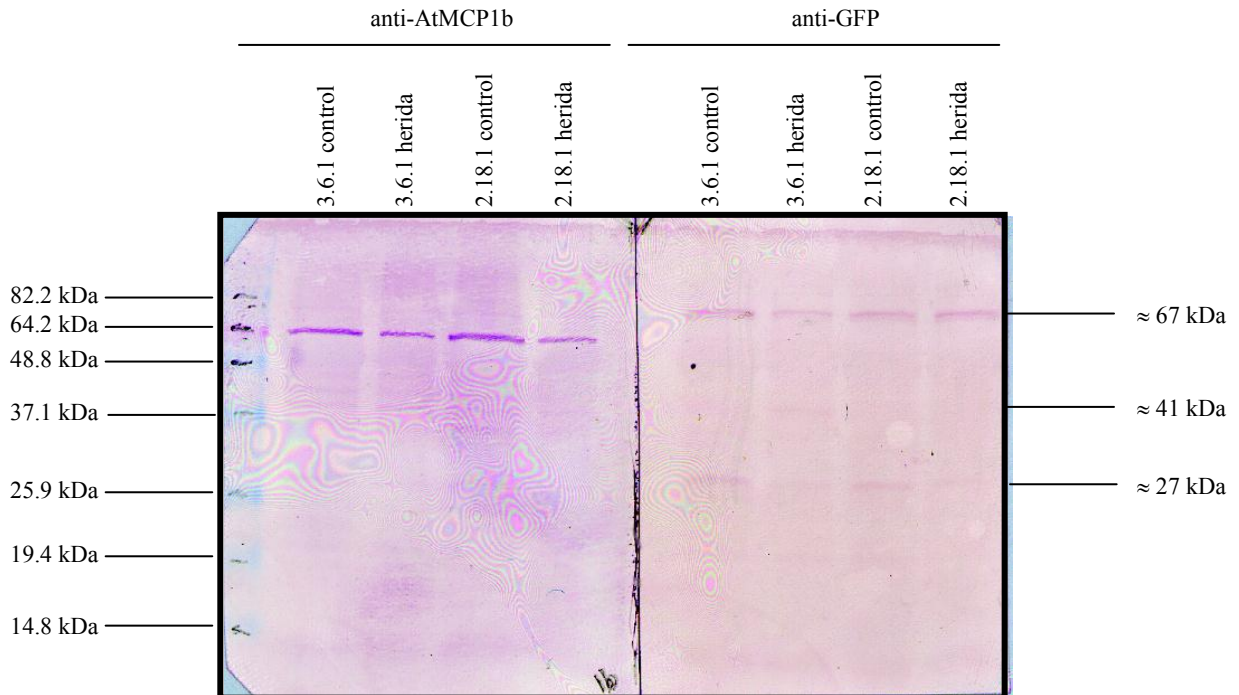


Fig. 18. western blot de extracto total de proteínas de las líneas transgénicas progra::1b::GFP 3.6.1 y 2.18.1; las plantas se recolectaron a los tiempos 0 y 4 horas después de haber sido heridas. La inmunodetección se realizó con los anticuerpos anti-AtMCP1b y anti-GFP.

Cuando se usan los anticuerpos anti-GFP, principalmente se observan dos bandas, una aparentemente de 27 KDa (Fig. 18), que podría indicarnos la presencia de la proteína verde fluorescente sin estar unida a la proteína AtMCP1b, ya que se ha visto que en el procedimiento de clonación en el sistema Gateway[®] se introduce un sitio de corte artificial entre la secuencia de AtMCP1b y la de GFP (Vercammen et al. 2004), que probablemente sea cortado por una metacaspasa. La otra banda con un peso molecular aproximado de 67 kDa concuerda con el peso esperado de la fusión AtMCP1b-GFP completa (Fig. 18). Para el caso del extracto de proteína 3.6.1 herida también es posible observar una tercera banda que no se encuentra en los controles ni en la línea 2.18.1 herida, ésta con un peso aproximado de 41 kDa (Fig. 18); este peso molecular es cercano al predicho en la fusión p10-GFP de AtMCP1b (Fig. 19). Esto indicaría que la línea transgénica 3.6.1 muestra el procesamiento de AtMCP1b a las 4 horas de haber sido herida.

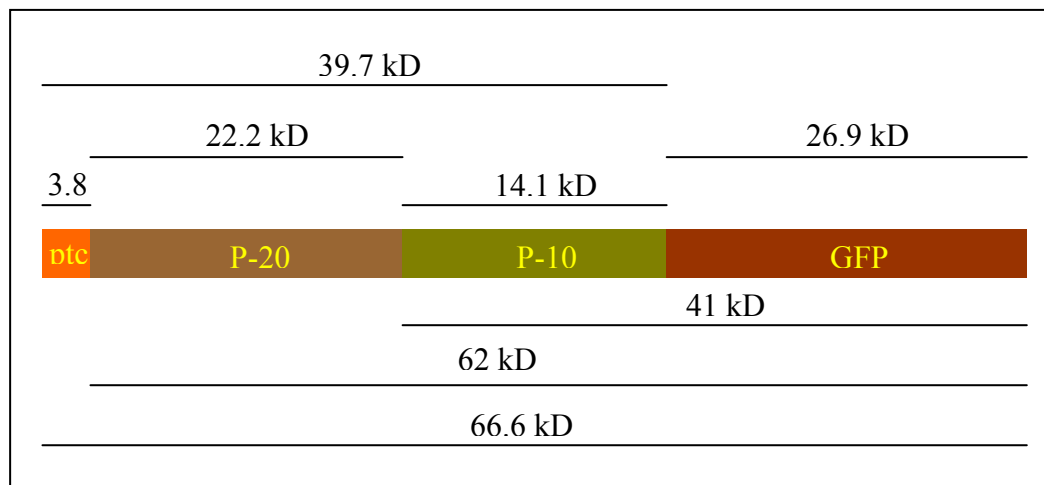


Fig. 19. Esquema de pesos moleculares esperados para la fusión de la proteína AtMCP1b con la GFP.

II. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm Y DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA AtMCP1b EN PLANTAS TRANSGÉNICAS PROGRA::1b::GFP EN LOS FONDOS wt Y *eds-16* INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *pstavr*

Para analizar por RT-PCR la acumulación del mRNA de AtMCP1b a diferentes tiempos y poder determinar si la deficiencia en la biosíntesis de Sa en la línea mutante *eds-16* afecta la acumulación del mRNA de AtMCP1b inducida por *pstavr* en las plantas transgénicas PROGRA::1b::GFP, se hicieron inducciones con *pstavr* en plantas de *A. thaliana* en los fondos wt y *eds-16* y como control se usaron hojas infiltradas con MgCl₂ 10 mM al tiempo 0 y 48 horas post inducción. Como control positivo de la infección por *pstavr* se analizó el ARNm de *PR-1* y el de *APT* (fosforibosil transferasa de adenosina-1) como control de cantidad de ARNm (Fig. 20).

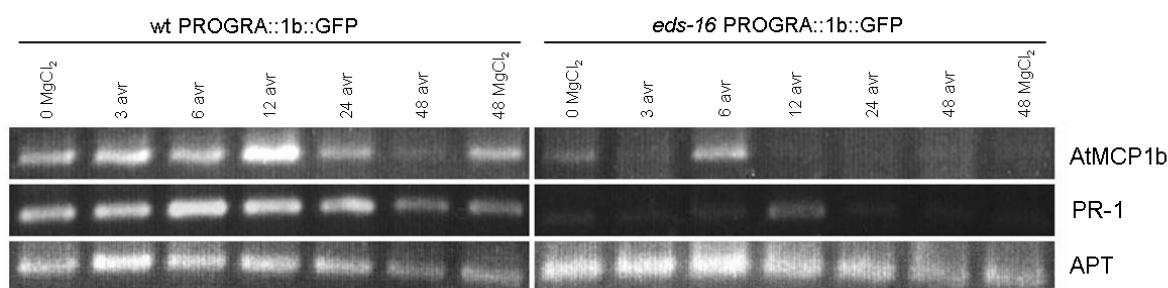


Fig. 20. La infección con *pstavr* induce la expresión del ARNm de *AtMCP1b* en *Arabidopsis thaliana*. La acumulación del ARNm de *AtMCP1b* y *PR-1* fue analizada por RT-PCR después de la infección. El ARN total fue aislado de tejidos control y tratados con *pstavr* a distintos intervalos de tiempo. Un volumen de 5 µl del producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y observado por tinción con bromuro de etidio. La acumulación del ARNm de *PR-1* se usó como control positivo de la infección por *pstavr* y la de *APT* se usó como control de expresión constitutivo.

Al hacer el análisis densitométrico de las imágenes de los geles de agarosa (Figs. 21 y 22) se observó que en las plantas transgénicas en el fondo mutante *eds-16* hay una menor acumulación del mRNA de *AtMCP1b* con respecto a las plantas transgénicas en fondo silvestre, cuando ambas son infectadas con *pstavr*. También se observó que la acumulación del ARNm de *PR-1* es mucho menor en las plantas con el fondo mutante *eds-16* que en las del tipo silvestre; este resultado era esperado ya que se ha observado por otros grupos que la deficiencia de Sa en la planta afecta la expresión de algunos genes PR (ejemplo *PR-1*) y que el Sa producido por la vía de la isocorismato

sintasa es requerido para montar las respuestas de defensa locales y sistémicas en la planta (Wildermuth et al. 2001).

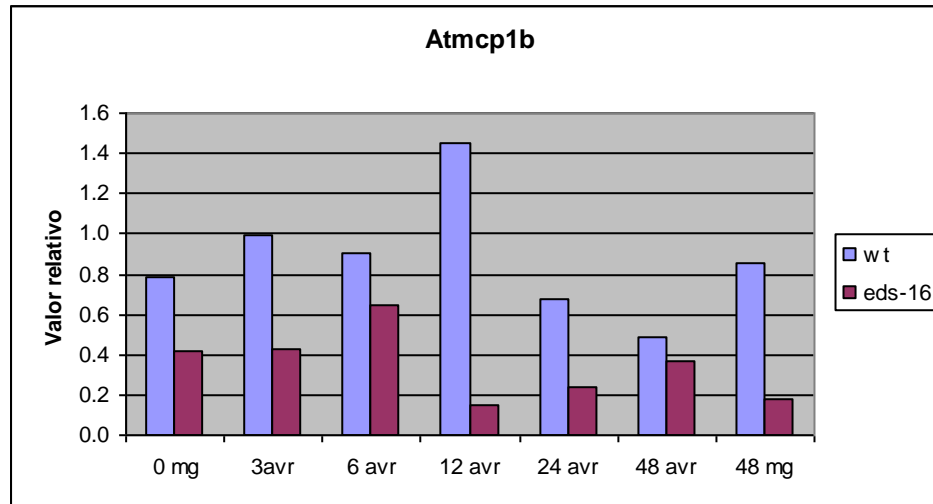


Fig. 21. Análisis densitométrico de la acumulación del ARNm de *AtMCP1b* en plantas PRGRA::1b::GFP con fondo wt y *eds-16* tratadas con *pstavr* a diferentes intervalos de tiempo. Los niveles de expresión fueron normalizados con el control de expresión constitutivo *APT*.

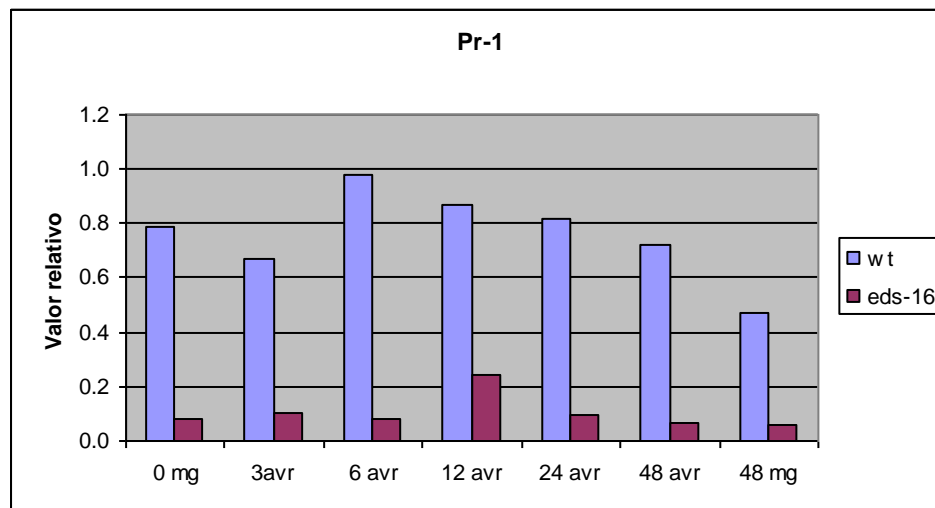


Fig. 22. Análisis densitométrico de la acumulación del ARNm de *PR-1* en plantas PRGRA::1b::GFP con fondo wt y *eds-16* tratadas con *pstavr* a diferentes intervalos de tiempo. Los niveles de expresión fueron normalizados con el control de expresión constitutivo *APT*.

Este resultado podría indicar que en ausencia de Sa en una planta infectada con *pstavr* la acumulación del mRNA de *AtMCP1b* se ve afectada, sugiriendo que la expresión de

AtMCP1b depende de la vía de Sa para su posible participación en los eventos de MCP, que son usados por la planta para poder contender contra el ataque del patógeno *pstavr* evitando así la infección de toda la planta.

Las inducciones con *pstavr* en las plantas transgénicas PROGA::1b::GFP en los fondos wt y *eds-16* se repitieron varias veces obteniendo niveles de expresión semejantes, a pesar de que los niveles de ARNm de *AtMCP1b* y *PR-1* en los controles con MgCl₂ al tiempo 0 y a las 48 horas post-inducción se encontraron elevados.

Para extraer proteína total y hacer inmuno ensayos, se tomaron 2 líneas de las plantas transgénicas PROGA::1b::GFP en los fondos wt y *eds-16* y se infectaron con *pstavr* a diferentes intervalos de tiempo. La fusión de la proteína con GFP se detectó usando un anticuerpo comercial anti-GFP; también se repitieron los experimentos usando como anticuerpo primario un anti-PAT que reconoce a la proteína fosfinotricina acetil transferasa que le confiere la resistencia a la planta al herbicida glufosinato de amonio y que se encuentra en el vector en el que se insertó la construcción. Esto sirve como control de expresión (Fig. 23).

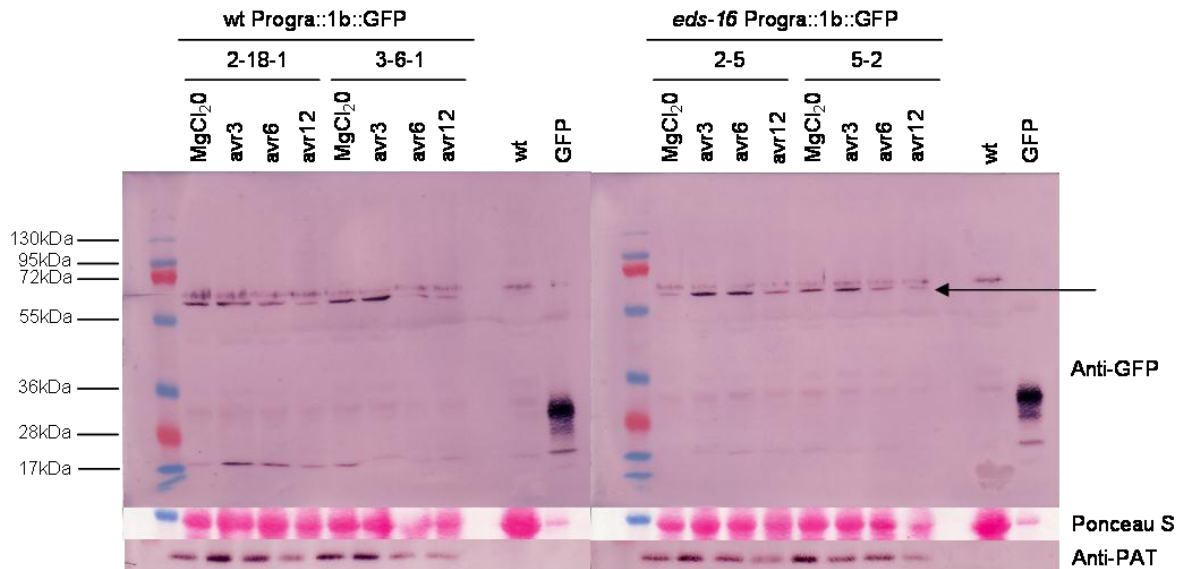


Fig. 23. Expresión de la proteína AtMCP1b fusionada a GFP en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Se cargaron 20 µg de extracto total de proteína aislado de 2 líneas diferentes para cada fondo; para la detección se usaron como anticuerpos primarios anti-GFP y anti-PAT y como anticuerpo secundario un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. La flecha muestra la posición de la fusión AtMCP1b-GFP (≈ 67 kDa). Las membranas fueron teñidas con Ponceau S para mostrar la carga de proteína para cada pozo. Los pesos moleculares en kDa están marcados a la izquierda.

Como se muestra en la Fig. 23, existe presencia de la fusión AtMCP1b-GFP en las 4 líneas, pero al hacer el análisis densitométrico no se observa aumento o disminución significativos en los niveles de AtMCP1b, con respecto al tiempo de inducción de las plantas con *psavr*; de igual manera no se observa procesamiento de AtMCP1b-GFP. La ausencia del aumento o disminución de AtMCP1b-GFP con respecto al tiempo al inducir las plantas con *psavr* puede deberse a que el procesamiento de AtMCP1b corresponde a un evento más tardío dentro del proceso de MCP en la planta y por eso los niveles del zimógeno permanecen sin cambio aparente durante los períodos de tiempo en los que se tomaron las muestras para el experimento.

Una de las causas principales a lo que podría deberse el que no se observe un procesamiento de la metacaspasa AtMCP1b es el prodominio que presentan las metacaspasas tipo I en *Arabidopsis* y que podría presentar una función regulatoria del procesamiento de la proteína ya que en éste, AtMCP1b presenta un motivo de dedo de zinc similar al que se encuentra en LSD1 y que le podría conferir la facultad de interaccionar con otras proteínas o con otras metacaspasas y que esta interacción tenga algo que ver con su procesamiento. Otra característica que presenta la metacaspasa AtMCP1b, es que en su prodominio presenta un péptido de tránsito al cloroplasto a donde se cree que la proteína se transporta como zimógeno y ahí es donde se procesa como metacaspasa activa y podría ser que si el blanco de AtMCP1b se encuentra en el cloroplasto sólo se active como último recurso de la planta en el proceso de MCP.

Otras de las causas por las que no se observa procesamiento de la metacaspasa AtMCP1b puede deberse a que el tiempo de vida media de AtMCP1b sea muy corto y no se alcance a notar en los lapsos de tiempo en los que se tomaron las muestras al hacer la inducción de las plantas con *psavr*. Otra opción podría ser que la cantidad de

proteína procesada sea muy baja y no alcance a detectarse en el ensayo de western blot.

III. GENERACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS 35s::1b::GFP

Al no poder observar un procesamiento claro del zimógeno de AtMCP1b en plantas PROGRA::1b::GFP al tratarlas con *psavrt*, se propuso hacer plantas sobre-expresoras de la fusión AtMCP1b-GFP en los fondos wt y *eds-16* puesto que es posible que el prodominio de AtMCP1b al tener un dedo de zinc pudiera participar en interacciones con otros zimogénos de ella misma, llevando esto a su activación vía incrementos locales en sus concentraciones como resultado de oligomerización o agregación.

Esta hipótesis es consistente con el hecho de que la sobre-expresión bacteriana de AtMCP1b puede resultar en un procesamiento autocatalítico con una activación concomitante (Watanabe and Lam 2005; Vercammen et al. 2006).

Al tener una planta sobre-expresora de la metacaspasa AtMCP1b en el fondo mutante *eds-16* se podría investigar la participación del Sa en la activación de la proteína AtMCP1b y con esto dilucidar si ésta podría participar de manera importante en las vías de señalización activadas durante la respuesta hipersensible en *Arabidopsis* al ser infectada con *psavrt*.

Previamente en el laboratorio ya se había generado la línea transgénica sobre-expresora 35s::1b::GFP, pero solamente se tenía en fondo silvestre por lo que se usó el vector destino pEarleyGate 103 (Fig. 24) que ya tenía la fusión de AtMCP1b-GFP insertada en el vector para transformar la línea mutante *eds-16* y de ésta forma producir una planta conteniendo una fusión C-terminal de AtMCP1b-GFP y 6xHis, esto bajo el promotor CaMV 35s.

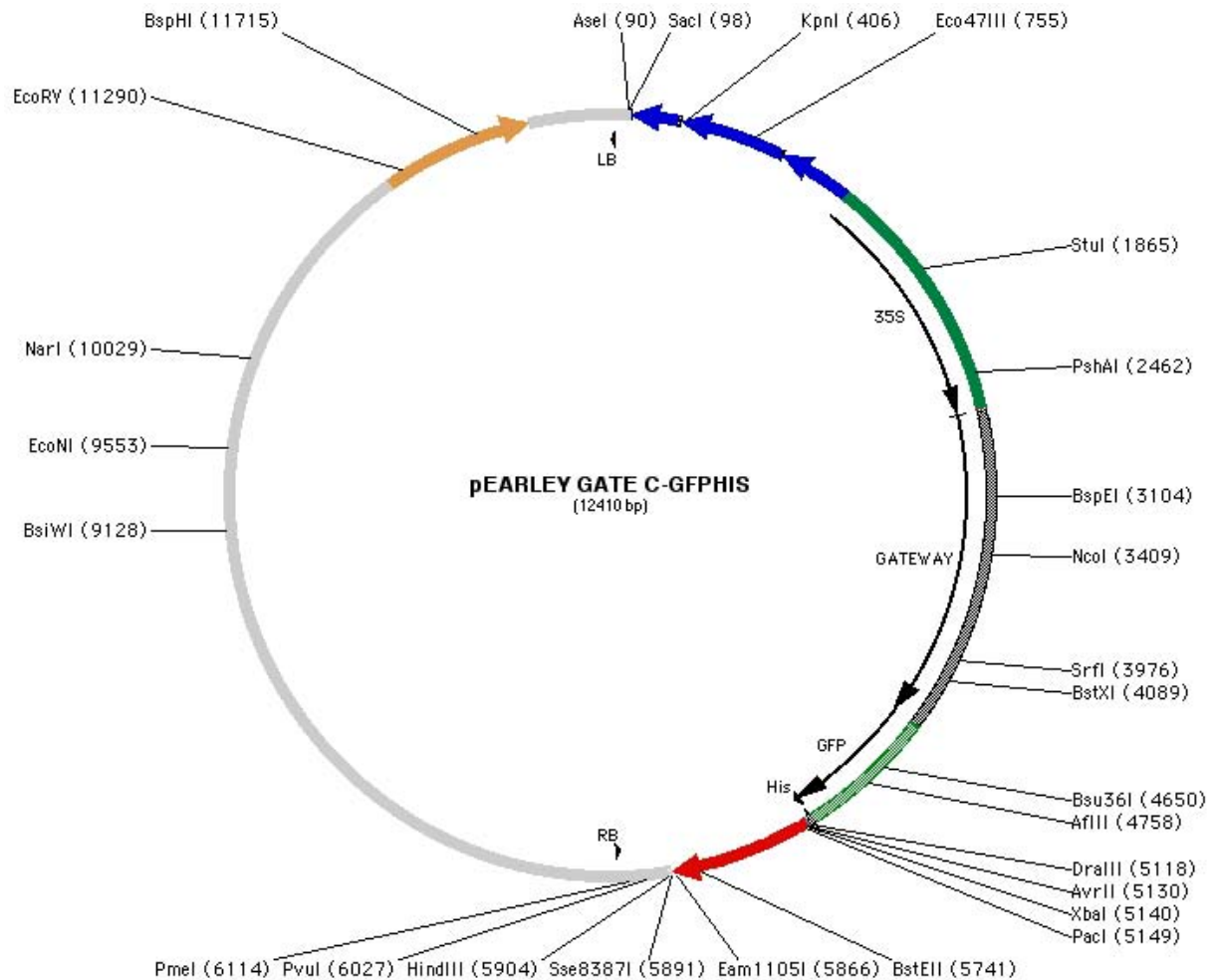


Fig. 24. Vector pEarley Gate 103 usado para la generación de las plantas sobre expresoras 35s::1b::GFP en los fondos wt y *eds-16*.

Se observó que las plantas 35s::1b::GFP generadas en los fondos wt y *eds-16* no presentaban ningún fenotipo como la disminución en el crecimiento o un tiempo de vida más corto a consecuencia de sobre-expresar una proteína que pudiera participar en eventos de muerte celular. Una de las causas podría ser que a pesar de las grandes cantidades de metacaspasa, ésta se encuentra como zimógeno y sólo se activa como consecuencia de una señal de respuesta de la planta al ataque por patógeno.

Para verificar que la construcción se encontrara de acuerdo a como fue diseñada originalmente, se hicieron ensayos de PCR usando una serie de oligonucleótidos para amplificar distintas regiones de la construcción 35s::1b::GFP a partir de ADN genómico extraído de plantas T3 35s::1b::GFP en fondos wt y *eds-16* (Fig. 25).

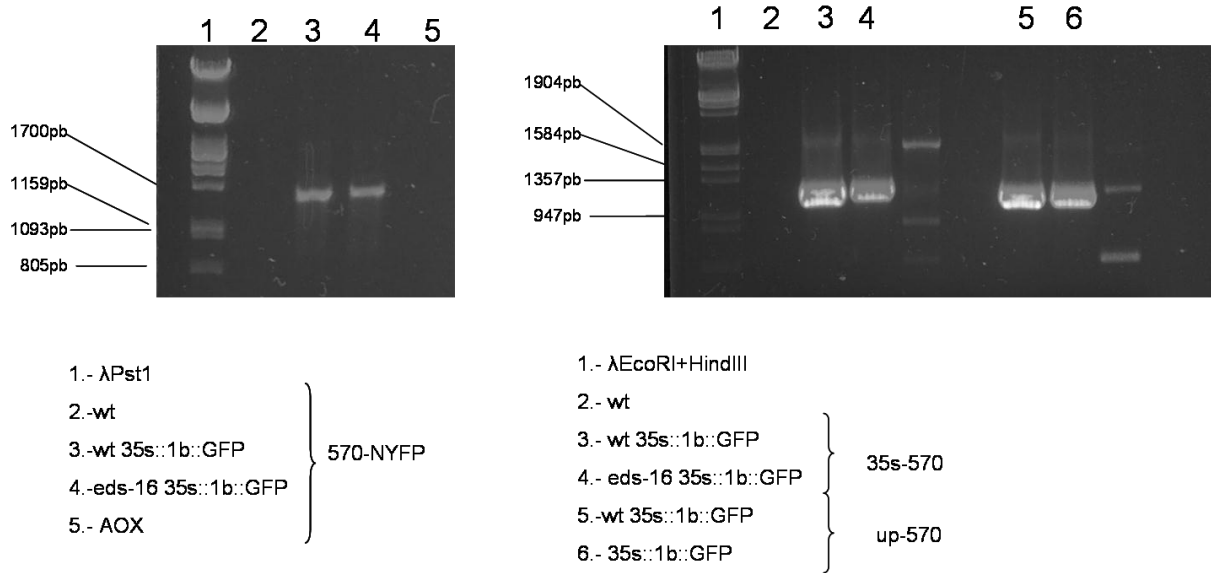


Fig. 25. PCR a partir de ADN genómico de plantas transgénicas 35s::1b::GFP. Se usaron combinaciones de diferentes oligonucleótidos para amplificar secciones de la construcción 35s::1b::GFP y verificar que ésta se encontrara arreglada como se diseñó. El ADN total fue aislado de plantas transgénicas 35s::1b::GFP en fondos wt y eds-16 y como control se usó ADN aislado de plantas wt y de la construcción 35s::1b::GFP en *A. tumefaciens*. Un volumen de 5 μ l del producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y observado por tinción con bromuro de etidio.

Para extraer proteína total y hacer ensayos de western blot se tomaron varias líneas transgénicas 35s::1b::GFP en fondo eds-16, se indujeron con *pstavr* y se recolectaron muestras a las 6 horas post inducción con el fin de seleccionar las líneas transgénicas con las que se va a trabajar (Fig. 26).

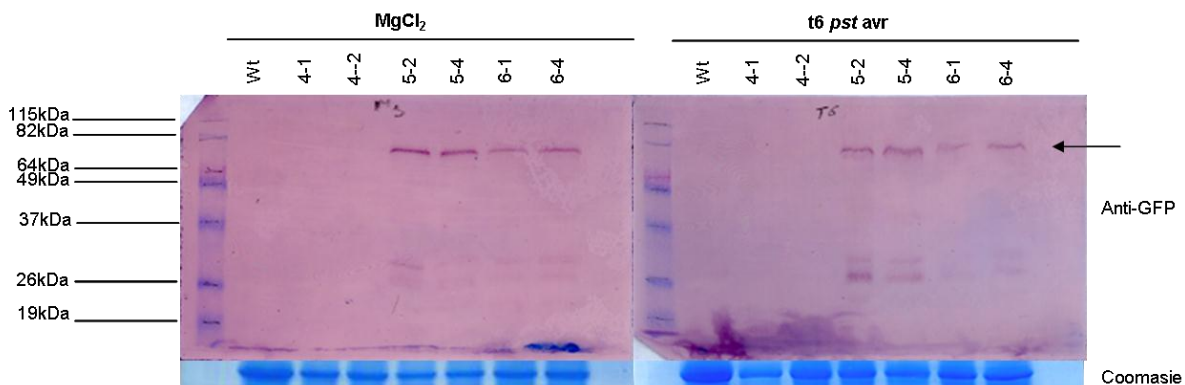


Fig. 26. Expresión de la proteína AtMCP1b fusionada a GFP en plantas transgénicas de *Arabidopsis* infectadas con *pstavr*. Se cargaron 20 μ g de extracto total de proteína aislado de varias líneas; para la detección se usó como anticuerpo primario anti-GFP y como anticuerpo secundario un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. La flecha

muestra la posición de la fusión AtMCP1b-GFP (≈ 70 kDa). Se tiñeron geles con Coomassie para mostrar la carga de proteína para cada pozo. Los pesos moleculares en kDa están marcados a la izquierda.

Como se muestra en la Figura 26, hubo líneas que a pesar de ser resistentes al marcador de selección Finale[®] no eran sobre-expresoras de la fusión AtMCP1b-GFP. Al igual que en las plantas PROGRA::1b::GFP en las líneas 35s que mostraron presencia de la fusión AtMCP1b-GFP se observan bandas entre los 27 kDa que indican la posible presencia de GFP sin estar unida a AtMCP1b sugiriendo un sitio de corte en la secuencia de GFP y que es reconocido por AtMCP1b. De las líneas probadas se decidió utilizar la línea sobre-expresora 5-2 ya que fue una de las que tuvo una mejor señal en los ensayos de western blot.

II. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm Y DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA AtMCP1b EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS 35s::1b::GFP EN LOS FONDOS wt Y *eds-16* INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *pstavr*

Para analizar la expresión del ARNm en las plantas sobre-expresoras, se hicieron inducciones con *pstavr* en plantas con los fondos wt y *eds-16* y se analizaron por RT-PCR a tiempos diferentes, se usó como control plantas inoculadas con MgCl₂ 10 mM a las 0 horas post inducción. Se usaron oligonucleótidos para la metacaspasa AtMCP1b para analizar la expresión del mensajero, para verificar la línea mutante *eds-16* se usaron oligonucleótidos de la *ICS1* y oligonucleótidos para APT como control de cantidad de ARNm (Fig. 27).

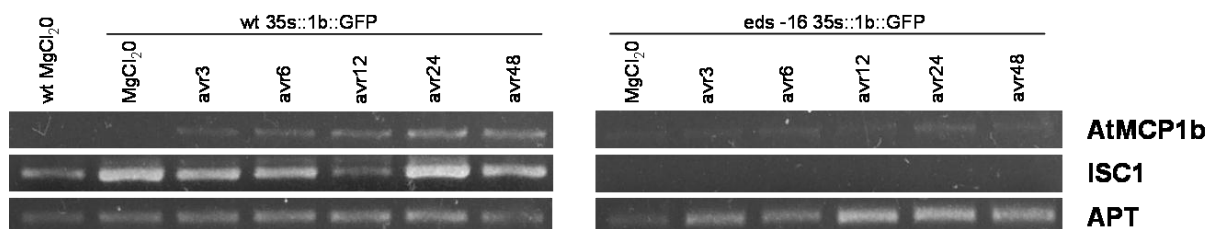


Fig. 27. Expresión del ARNm de *AtMCP1b* en plantas 35s::1b::GFP en fondo wt y *eds-16* de *A. thaliana*. La acumulación del ARNm de *AtMCP1b* e *ICS-1* fue analizada por RT-PCR después de la infección con *pstavr*. El ARNm total fue aislado de tejidos control y tratados con *pstavr* a diferentes intervalos de tiempo. Un volumen de 5 μ l del producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y observado por tinción con bromuro de etidio. La acumulación del ARNm de *ICS-1* se usó como control para verificar la mutante y la de *APT* se como control de expresión constitutivo.

A fin de comprobar si la sobre-expresión de la metacaspasa AtMCP1b inducía el autoprocésamiento y para el caso de la sobre-expresora en fondo mutante la ausencia de *Sa* pudiera afectar la producción o el procesamiento de la proteína AtMCP1b se utilizó material de las plantas *35s::1b::GFP* inducidas con *pstavr* para extraer proteína total y hacer ensayos de western blot (Fig. 28).

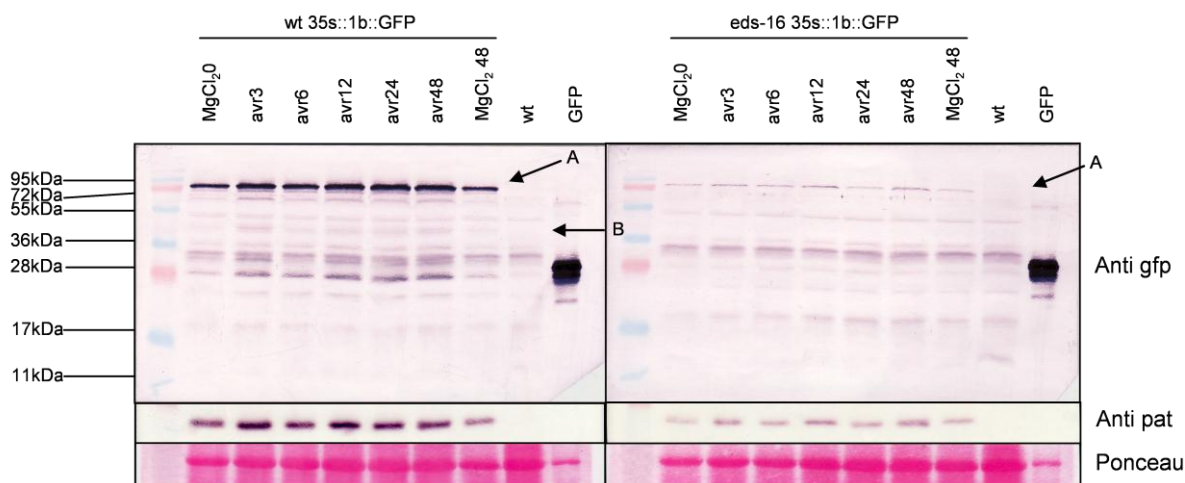


Fig. 28. Expresión de la proteína AtMCP1b-GFP en plantas sobre expresoras de *Arabidopsis*. Se cargaron 20 μ g de extracto total de proteína; para la detección se usaron como anticuerpos primarios anti-GFP y anti-PAT y como anticuerpo secundario un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. La flecha A muestra la posición de la fusión AtMCP1b-GFP (\approx 70 kDa) y la flecha B muestra la posición de la sub unidad p10 de la metacaspasa AtMCP1b fusionada a GFP (\approx 41 kDa). Las membranas fueron teñidas con Ponceau S para mostrar la carga de proteína para cada pozo. Los pesos moleculares en kDa están marcados a la izquierda.

Como se observa en las Figs. 27 y 28, los niveles de expresión del ARNm y de la proteína de AtMCP1b en el fondo *eds-16* fueron mucho más bajos que los niveles en el fondo wt. Al principio se pensó que ésta diferencia podría deberse a la mutación en la *ICS1* pero al hacer el ensayo de western blot usando los anticuerpos anti-PAT, se observó que ésta disminución también está presente en la proteína fosfinotricina acetil transferasa, que es independiente de la fusión AtMCP1b-GFP pero que se encuentra dentro del vector de expresión pEarley Gate 103. Por tanto, se concluyó que la diferencia entre los niveles de AtMCP1b-GFP en las plantas con fondo mutante se debía básicamente a que la construcción no sobre-expresa al mismo nivel al que lo hace la planta transgénica *35s::1b::GFP* en fondo silvestre y que es debido al efecto posicional de la inserción en el genoma de *Arabidopsis*.

En la Fig. 28, en las plantas 35s::1b::GFP en fondo wt, se puede observar una banda (flecha B) de aproximadamente 41 kDa que no se observa en el control silvestre y que correspondería a la banda esperada de la fusión de la subunidad p10; ésta banda no se alcanza a distinguir en las plantas transgénicas en fondo mutante, sin embargo esto no significa necesariamente que no esté y podría deberse a la diferencia de la cantidad de AtMCP1b-GFP. Un punto muy importante que nos ayudaría mucho a poder entender la participación de Sa en el procesamiento y posible activación de AtMCP1b, sería encontrar una planta que sobre-exprese a los mismos niveles a los que lo hace la wt 35s::1b::GFP, entre las transgénicas en fondo mutante generadas, para que de ésta forma pueda existir un punto de comparación entre ambos fondos.

Hay que recordar que la AtMCP1b tiene un péptido de tránsito en su prodominio y que se ha visto que efectivamente ésta se transporta al cloroplasto (Castillo-Olamendi et al. 2007); aún falta saber si los niveles de AtMCP1b procesada que se observan en las plantas 35s::1b::GFP en fondo wt han sido transportadas al cloroplasto o si su procesamiento es debido a la sobreproducción. Este punto podría ser aclarado mediante el aislamiento de cloroplastos de plantas sobre-expresoras tratadas con *pstavr* para ver si las cantidades de metacaspasa procesada se encuentran ahí.

Otro punto que es necesario aclarar para entender la participación de AtMCP1b en su papel en la MCP, es saber si es necesario llegar a un nivel crítico de metacaspasas activas para disparar la MCP o simplemente la AtMCP1b puede estar relacionada en la señalización hacia la MCP en lugar de su ejecución.

CONCLUSIONES

La infección por *pstavr* en plantas de *Arabidopsis* induce la acumulación del ARNm de AtMCP1b y los niveles de éste se encuentran disminuidos en la mutante deficiente de Sa con respecto a la línea silvestre.

Se observó la acumulación del zimógeno de AtMCP1b en plantas transgénicas con la fusión traduccional de la región codificante del gen de la metacaspasa AtMCP1b y la región codificante del gen de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el promotor de AtMCP1b en fondo silvestre y en el fondo mutante *eds-16* al tratar las plantas con *pstavr*. No se observó el procesamiento de la misma debido tal vez a que no se alcanzó a detectar metodológicamente o a que se requiere de la activación de alguna vía de señalización que induzca el procesamiento. Otra posibilidad es que los tiempos a los que se tomaron las muestras no sean los adecuados para observar un procesamiento del zimógeno de AtMCP1b.

Se puede especular que la metacaspasa AtMCP1b pueda tener funciones diferentes durante los procesos que desencadenan los eventos de HR en plantas y eso haga que se presenten distintos niveles de expresión de la proteína durante el proceso de HR, por ello los niveles del ARNm de AtMCP1b siempre están presentes en cantidades detectables, no así la proteína.

Las plantas transgénicas sobre-expresoras 35s::1b::GFP muestran procesamiento del zimógeno de la metacaspasa AtMCP1b; esto puede deberse a un autoprocésamiento sin que signifique que la metacaspasa se encuentre en ese momento participando en un evento de muerte celular ya que no se observó un fenotipo de muerte aun al tratarlas con *pstavr*. No se observó procesamiento del zimógeno en las sobre-expresoras en el fondo mutante *eds-16* debido a la baja eficiencia de sobre-expresión en las plantas.

PERSPECTIVAS

- Hacer un screening de todas las semillas 35s::1b::GFP en fondo *eds-16* y buscar una planta que sobre-exprese niveles similares a las plantas 35s::570::GFP, en fondo wt para poder ver diferencias en cuanto al procesamiento; otro enfoque sería hacer una cruce de la sobre-expresora en fondo wt con la mutante *eds-16* para tener una planta 35s::1b::GFP en fondo *eds-16* con la misma expresión de AtMCP1b que la sobre-expresora en fondo wt.
- La identificación de substratos endógenos de AtMCP1b son cruciales para desentrañar las vías de señalización en las que participa ésta metacaspasa y su función *in vivo*.
- Comprobar si la metacaspasa AtMCP1b necesita de un pH óptimo para su procesamiento y activación en el cloroplasto, o si estos cambios en el pH hacen que la metacaspasa tenga diferentes afinidades por substratos.
- Puesto que AtMCP1b tiene un péptido de tránsito al cloroplasto se podrían hacer tratamientos con *pstavr* y aislar cloroplastos de plantas en fondo wt, *eds-16* y *atmcp1b* y observar posibles sustratos de AtMCP1b empleando geles de doble dimensión y espectrometría de masas.

Bibliografía

Alvarez, M. E. (2000). "Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance." Plant Mol Biol **44**(3): 429-42.

Asai, T., J. M. Stone, et al. (2000). "Fumonisin B1-Induced Cell Death in Arabidopsis Protoplasts Requires Jasmonate-, Ethylene-, and Salicylate-Dependent Signaling Pathways." Plant Cell **12**(10): 1823-1836.

Baker, B., P. Zambryski, et al. (1997). "Signaling in plant-microbe interactions." Science **276**(5313): 726-33.

Baehrecke, E. H. (2002). "How death shapes life during development." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 779-87.

Buchanan, B. B., W. Gruissem, et al. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville, Md., American Society of Plant Physiologists.

Castillo-Olamendi, L., A. Bravo-Garcia, et al. (2007). "AtMCP1b, a chloroplast-localised metacaspase, is induced in vascular tissue after wounding or pathogen infection." Functional Plant Biology **34**(12): 1061-1071.

Chichkova, N. V., J. Shaw, et al. (2010). "Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity." The EMBO Journal.

Clough, S. J. and A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." Plant J **16**(6): 735-43.

Coffeen, W. C. and T. J. Wolpert (2004). "Purification and Characterization of Serine Proteases That Exhibit Caspase-Like Activity and Are Associated with Programmed Cell Death in Avena sativa." Plant Cell **16**(4): 857-873.

Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.

Dangl, J. L. and J. D. G. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411**(6839): 826-833.

Danon, A., V. Delorme, et al. (2000). "Plant programmed cell death: A common way to die." Plant Physiology and Biochemistry **38**(9): 647-655.

Delaney, T.P., Uknes, S., et al. (1994). "A central role of salicylic acid in plant disease resistance" Science **266** 1247-1250.

Hatsugai, N., M. Kuroyanagi, et al. (2004). "A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death." Science **305**(5685): 855-8.

- Hatsugai, N., S. Iwasaki, et al. (2009). "A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens." Genes & development **23**(21): 2496.
- Heath, M. C. (2000). "Hypersensitive response-related death." Plant Mol Biol **44**(3): 321-334.
- Hoeberichts, F. A., A. ten Have, et al. (2003). "A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves." Planta **217**(3): 517-22.
- Klessig, D. F., J. Durner, et al. (2000). "Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(16): 8849-8855.
- Koch, M., S. Vorwerk, et al. (2006). "A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*." Plant Journal **47**(4): 629-639.
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. (2002) "Cross talk between signaling pathways in pathogen defense". Curr. Opin. Plant Biol. **5**, 325–331.
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. (2001) "Wound signalling in plants". Journal of Experimental Botany **52** (354): 1-9.
- Lawen, A. (2003). "Apoptosis-an introduction." Bioessays **25**(9): 888-96.
- Madeo, F., E. Herker, et al. (2002). "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast". Mol Cell **9**(4): 911-7.
- Mayda, E., B. Mauch-Mani, et al. (2000). "Arabidopsis *dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses." Plant Cell **12**(11): 2119.
- Navarro, L., P. Dunoyer, et al. (2006). "A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling." Science **312**(5772): 436.
- Novacky, A. (1972). "Suppression of the bacterially induced hypersensitive reaction by cytokinins." Physiol Plant Pathol **2**(2): 101-104.
- Overmyer, K., M. Brosche, et al. (2003). "Reactive oxygen species and hormonal control of cell death." Trends Plant Sci **8**(7): 335-42.
- Quirino, B. F. and A. F. Bent (2003). "Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model." Mol Plant Pathol **4**(6): 517-530.
- Park, S.-W., E. Kaimoyo, et al. (2007). "Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance." Science **318**(5847): 113-116.
- Rausher, M.D. (2001). "Co-evolution and plant resistance to natural enemies" Nature **411** (857-864)

Rojo, E., R. Martin, et al. (2004). "VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens." Curr Biol **14**(21): 1897-906.

Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P. (2000). "Regulators of cell death in disease resistance" Plant Mol Biol **44** 371-385.

Staskawicz, B. J., M. B. Mudgett, et al. (2001). "Common and Contrasting Themes of Plant and Animal Diseases." Science **292**(5525): 2285-2289.

Suarez, M. F., L. H. Filonova, et al. (2004). "Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis." Curr Biol **14**(9): R339-40.

Torres, M. A., J. D. Jones, et al. (2005). "Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in Arabidopsis thaliana." Nat Genet **37**(10): 1130-4.

Uren, A. G., K. O'Rourke, et al. (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." Mol Cell **6**(4): 961-7.

Vaitkunas, K. E. (2003). The genetics of TCV resistance, WORCESTER POLYTECHNIC INSTITUTE.

van Doorn, W. G. and E. J. Woltering (2005). "Many ways to exit? Cell death categories in plants." Trends Plant Sci **10**(3): 117-22.

van Wees, S. C. M. and J. Glazebrook (2003). "Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to Pseudomonas syringae pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid." Plant J **33**(4): 733-742.

Vercammen, D., B. van de Cotte, et al. (2004). "Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine." J Biol Chem **279**(44): 45329-36.

Vercammen, D., B. Belenghi, et al. (2006). "Serpin1 of Arabidopsis thaliana is a Suicide Inhibitor for Metacaspase 9." J Mol Biol **364**(4): 625-636.

Watanabe, N. and E. Lam (2005). "Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast." J Biol Chem **280**(15): 14691.

Wildermuth, M. C., J. Dewdney, et al. (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." Nature **414**(6863): 562-565.

Woltering, E. J., A. van der Bent, et al. (2002). "Do Plant Caspases Exist?" Plant Physiol. **130**(4): 1764-1769.

Woltering, E. J. (2004). "Death proteases come alive." Trends Plant Sci **9**(10): 469-72.

Zhang, Z., Q. Li, et al. (2007). "Dual regulation role of GH3. 5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae interaction." Plant Physiol. **145**(2): 450.