



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE PLANTAS MUTANTES EN
MPK4 ACLIMATADAS AL FRÍO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.A. CARLA DANIELA GONZÁLEZ CÓRDOVA

DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. OSCAR FLORES HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2019



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dimitrova Dinkova Tzvetanka

VOCAL: Vera Estrella Rosario

VOCAL: González Segura Lilian

VOCAL: Guevara García Ángel Arturo

SECRETARIO: Funes Argüello María Soledad

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, UNAM

Asesor:

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante:

Q.A. Carla Daniela González Córdova

Reconocimientos

A la Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), a la Dra. Mariana Saucedo García (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo) y al Dr. Oscar Flores (Facultad de Medicina, UNAM) por su contribución a mi trabajo como parte del comité tutorial.

Al Dr. Ángel Arturo Guevara García (Instituto de Biotecnología, UNAM) por proporcionar las semillas de *Arabidopsis thaliana* de la línea mutante *mpk4* para este trabajo.

A la Dra. Laura Carmona Salazar (Facultad de Química, UNAM) por la obtención de las vesículas membranales, de la réplica en Western y por su asesoramiento técnico.

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

Al especialista Rodolfo Paredes, por su ayuda en el trabajo de microscopía electrónica de transmisión realizada en la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular.

- La Q.A. Carla Daniela González Córdova realizó la presente tesis de maestría con el apoyo de una beca CONACYT (Registro No. 855537).
- La Q.A. Carla Daniela González Córdova agradece al Programa de Apoyo para estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a un congreso internacional.
- Esta tesis se realizó gracias al financiamiento de los proyectos PAPIIT IN220618 (DGAPA, UNAM), PAIP 5000 9115 (Facultad de Química, UNAM) y 238368 (CONACYT, México).

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, en Cd. Universitaria, Ciudad de México.

Contenido

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
1. Efecto de las bajas temperaturas en las plantas	4
2. Aclimatación como proceso de inducción de tolerancia a la congelación.....	5
3. Mecanismos moleculares que se presentan durante la aclimatación.....	5
4. Mecanismos de activación y transducción	6
5. Respuestas moleculares de contención a los efectos del frío	7
6. Genes de respuesta a frío.....	8
7. Las MAP cinasas como parte de los mecanismos de transducción de señales	11
a) La cascada de MPK4	12
b) MPK4 en respuesta a frío	14
8. La ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	14
a) Estructura.....	15
b) Función	16
c) Regulación	18
d) Papel del carboxilo terminal.....	20
e) Interacción con la proteína 14-3-3	21
ANTECEDENTES	23
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Material biológico.....	26
2. Estrategia experimental.....	27
3. Germinación y crecimiento de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
4. Condiciones de aclimatación y reto de congelación.....	28
5. Determinación de la sobrevivencia y del grado de deterioro.....	28
6. Determinación de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	29
7. Fuga de solutos.....	29
8. Análisis de la ultraestructura	30

9. Aislamiento de vesículas membranales	30
10. Determinación de fosfato inorgánico	30
11. Ensayo de hidrólisis de ATP	31
12. Ensayo de hidrólisis de ATP con DMSO	32
13. Actividad de la ATPasa a diferentes concentraciones de ATP	32
14. Geles de poliacrilamida-SDS para la separación de proteínas	33
15. Inmuno-réplica para la ATPasa de H ⁺ y 14-3-3	35
RESULTADOS	37
1. Fenotipos de sobrevivencia a la congelación	37
2. Parámetros fotosintéticos	41
3. Ultraestructura del cloroplasto	45
4. Evaluación de la integridad del tejido de las hojas	48
5. Pureza de las vesículas membranales	49
6. Caracterización de la actividad de la ATPasa de H ⁺	50
7. Cinética de la hidrólisis de ATP	51
8. Determinación de los niveles de ATPasa de H ⁺ en las vesículas de membrana plasmática de las líneas wt y <i>mpk4</i>	53
9. Actividad de la ATPasa de H ⁺ en presencia de DMSO	58
DISCUSIÓN	59
1. Efecto de la aclimatación en plantas con pérdida de función de MPK4	60
Efecto en la tolerancia a la congelación y en la capacidad de recuperación	60
Efecto en el funcionamiento fotosintético	63
2. Efecto de la pérdida de función de la MPK4 en la actividad de la ATPasa de H ⁺	67
Diferencias en la actividad de la ATPasa de H ⁺ por	67
Efecto de la pérdida de función de MPK4 en la integridad membranal	68
Efecto de la aclimatación y la pérdida de función de MPK4 en la cinética de la ATPasa de H ⁺	69
3. Niveles de ATPasa de H ⁺ en plantas wt y <i>mpk4</i> NA y AC	72
4. Niveles de la proteína 14-3-3	73
5. Efecto de la rigidización membranal en la acción de MPK4 sobre la actividad de la ATPasa de H ⁺	74
CONCLUSIONES PARCIALES	76
CONCLUSIÓN GENERAL	77
PERSPECTIVAS	78
APÉNDICE	79

Apéndice 1	79
Apéndice 2	81
Apéndice 3	82
BIBLIOGRAFÍA	83

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABS	Flujo de fotones absorbido por los pigmentos antena
AC	Aclimatada
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
BTP	Bis-tris-propano
CAMTA	Factores de inscripción de unión a calmodulina
CBFs	Del inglés C-repeat/ DREB binding factors
CCP	Carbonilcianuro-m-clorofelhisrazona
COLD 1	Del inglés cold sensor chilling-tolerance divergence
COR	Proteínas reguladas por frío
DHN	Dehidrinas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
TR	Transporte de electrones
ETI	Inmunidad inducida por efectores
FB1	Fumonisina B1
GIPCS	Glicosil-inositolfosforilceramidas
HSPs	Proteínas de choque térmico
ICE1	Inductor de la expresión de CBF1
LPC	Lisofosfatidilcolina
MAP65	Proteína 65 asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógeno
MET	Microscopio electrónico de transmisión

MKS1	MAP cinasa sustrato 1
NA	No aclimatada
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAT1	Topoisomerasa II 1
PC	Fosfatidilcolina
PdF	Pérdida de función
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
PTI	Inmunidad inducida por PAMPs
PVDF	Fluoruro de polivinilo
RGA1	Del inglés: rice G- protein subunit 1
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TR	Transporte de electrones
TBS	Amortiguador de fosfatos salino
TEMED	Tetrametilendiamina
u.a.	Unidades arbitrarias
wt	Genotipo tipo silvestre

RESUMEN

La ATPasa de H⁺ es una proteína transmembranal que forma un gradiente de protones en la membrana plasmática de las células vegetales que es utilizado para el transporte de nutrientes, la elongación celular y la regulación del pH celular. Se sabe que la actividad de la enzima es sensible a diferentes tipos de estrés entre ellos el frío. Las formas de regulación de la actividad de esta proteína conocidas hasta ahora comprenden, la fosforilación y desfosforilación (Haruta *et al.* 2016), la interacción con lípidos específicos que rodean a la enzima y mecanismos transcripcionales que son modificados durante procesos como la aclimatación (Ponce-Pineda 2018).

La aclimatación, es un proceso por el cual las plantas adquieren tolerancia a temperaturas congelantes a través de una pre-exposición a temperaturas bajas moderadas durante cierto período de tiempo. Este pretratamiento de frío permite la sobrevivencia de la planta, lo cual es muy importante en términos ecológicos y económicos (Janská *et al.* 2010).

Durante la aclimatación se activan diversas vías de señalización que conllevan a diversas respuestas celulares, entre las vías de señalización que se activan se encuentran las cascadas de MAP cinasas (MAPKs). Se ha descrito que la cascada de MAPKs que contiene a MPK4 participa en la señalización de bajas temperaturas (Furuya *et al.* 2014). En este trabajo se estudió la implicación de MPK4 en la actividad de la ATPasa de H⁺ en condiciones de aclimatación. La primera parte de este proyecto comprendió la caracterización fenotípica de la mutante en MPK4 y su respuesta al frío comparada con la planta silvestre. En esta primera parte no se encontraron diferencias sustanciales entre *mpk4* y wt respecto a la fotosíntesis y a la respuesta al frío, particularmente al ser retadas a temperaturas congelantes. Sin embargo, si se registraron cambios en la ultraestructura del cloroplasto en las plantas aclimatadas y mutantes en MPK4.

Posteriormente, se realizó la caracterización de la actividad y el patrón cinético de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas tipo silvestre (wt) y de la mutante *mpk4*. Encontrándose que la actividad de la ATPasa de H⁺ en la mutante

no disminuye con la aclimatación, como ocurre en las wt, lo que sugiere una regulación negativa de la ATPasa de H⁺ por MPK4. Estos resultados son relevantes para tratar de entender los mecanismos moleculares de las respuestas de las plantas a las bajas temperaturas, especialmente la participación de MAP cinasas en estos procesos.

INTRODUCCIÓN

1. Efecto de las bajas temperaturas en las plantas

Las plantas son organismos sésiles que están expuestos continuamente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Entre los factores bióticos que pueden causar estrés y afectar el desarrollo de las plantas está la temperatura. Cada especie tiene un rango óptimo de temperatura que les permite vivir en condiciones adecuadas, sin embargo, las temperaturas fuera de este rango o extremas, como aquellas menores a 0°C (congelantes), pueden dañarlas y afectar su desarrollo (Hatfield y Prueger 2015). El estrés por congelación es causado por temperaturas bajo cero y el estrés por frío por temperaturas cercanas a los 0°C. Los síntomas del estrés por frío son generalmente la reducción de la expansión de las hojas, clorosis (amarillento), necrosis (muerte del tejido), entre otros. El grado del daño depende de la especie vegetal, y de la temperatura, a la que se haya enfrentado. La lesión por congelación mejor documentada ocurre a nivel de la membrana y se debe a la formación de la fase lipídica hexagonal II en regiones en donde la membrana plasmática y la membrana externa de los cloroplastos están estrechamente cercanas (Welti *et al.* 2002).

En general, las especies de plantas se pueden clasificar en tres grupos diferentes según su tolerancia a las bajas temperaturas. El primer grupo incluye plantas sensibles a la congelación, pueden morir en períodos cortos de exposición a temperaturas de menos 0°C. El frijol (*Phaseolus lunatus*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) son ejemplos de plantas en esta categoría. El segundo grupo, corresponde a plantas capaces de aclimatarse y

sobrevivir a bajas temperaturas, como *Arabidopsis thaliana*. Por último, se encuentran plantas como las gramíneas perennes que pueden sobrevivir a la exposición a -40°C (Rihan *et al.* 2017).

2. Aclimatación como proceso de inducción de tolerancia a la congelación

Para contender contra el estrés por frío algunas plantas han desarrollado un mecanismo llamado aclimatación, el cual ocurre cuando las plantas son expuestas durante un periodo de tiempo a temperaturas bajas, pero no congelantes en las que experimentan cambios celulares y moleculares para adquirir tolerancia a subsecuentes temperaturas congelantes. La habilidad de las plantas para llevar a cabo los cambios que les confieren tolerancia al frío difiere entre especies, ya que la capacidad de los tejidos para soportar la congelación es variable. El nivel de tolerancia al frío también depende de cómo se lleve a cabo la aclimatación, de la velocidad y del grado de disminución de la temperatura (Rihan *et al.* 2017).

La respuesta de las plantas al estrés por bajas temperaturas se puede dividir en tres fases. Primero ocurre la aclimatación al frío, que se produce a temperaturas bajas, pero superiores a cero. En la naturaleza el periodo de aclimatación correspondería al otoño septentrional o austral. La segunda etapa, que correspondería al invierno de las mismas regiones, es cuando se alcanza el grado completo de tolerancia y hay exposición a temperaturas bajo cero. La fase final es la recuperación de la planta después del invierno (Janská *et al.* 2010).

3. Mecanismos moleculares que se presentan durante la aclimatación

Múltiples sensores primarios pueden estar involucrados en la aclimatación, cada uno percibiendo un aspecto específico del estrés y cada uno involucrado en una rama distinta de la vía de señalización en frío. Debido a su papel básico en la separación de los entornos interno y externo, la membrana plasmática se ha considerado como el sitio principal para la percepción de los cambios de temperatura. Otros sensores bien podrían ser canales de Ca^{2+} y componentes del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos de actina). Una vez percibido el estímulo,

para que las plantas puedan adquirir resistencia a la congelación es necesario que realicen varios ajustes, entre ellos, cambios fisiológicos y biológicos, como la reducción en la tasa de crecimiento y la reprogramación de la expresión génica y del metabolismo (Janská *et al.* 2010; Lissarre M *et al.* 2010).

4. Mecanismos de activación y transducción

Las plantas, así como todos los organismos pluricelulares, desarrollaron sistemas tanto de reconocimiento y respuesta a señales externas, como de comunicación entre las células que componen un tejido para facilitar su desarrollo armónico y coordinado. La comunicación intercelular puede ser directa (por contacto físico entre las células) o indirecta (mediada por moléculas de señalización o ligandos). Los segundos mensajeros (producidos luego de la activación del receptor) desempeñan un papel crítico en la señalización intracelular, brindando amplificación, especificidad y diversidad a la respuesta celular (Saucedo-García y Gavilanes-Ruíz 2005).

La fosforilación y desfosforilación de proteínas es probablemente la forma de regulación y transducción de señales más común, ya que permite activar o inhibir la actividad de una enzima, cambiar la localización subcelular o la estabilidad de una proteína y mediar las interacciones con otros componentes celulares. La fosforilación de proteínas eucariotas mediada por proteínas cinasas, así como la desfosforilación controlada por fosfatasas, ocurren principalmente en los residuos de serina, treonina y tirosina. Entre el grupo de cinasas de proteínas se encuentran las llamadas cascadas de cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP cinasas o MAPKs), que entre sus funciones más importantes está la de contribuir a la transducción de los estímulos externos del ambiente al interior de la célula mediante una serie de fosforilaciones que permiten a las células responder ante la precepción de un estímulo (Mishra *et al.* 2006).

5. Respuestas moleculares de contención a los efectos del frío

Diferentes vías de señalización se activan a partir de diversos estímulos en respuesta al estrés abiótico y biótico, algunas de estas vías pueden compartir moléculas de señalización y segundos mensajeros para lograr sus objetivos. Esta interdependencia entre vías de señalización permite la comunicación entre las células, produciendo una modulación muy compleja de las respuestas ante determinados estímulos.

Las plantas capaces de aclimatarse al frío, disparan diversos mecanismos de señalización celular en respuesta a las bajas temperaturas. El proceso inicia por el reconocimiento de la señal, seguido de su amplificación por un proceso secuencial de eventos generalmente organizados en cascadas, incluyendo la liberación de segundos mensajeros que afectan la actividad de múltiples enzimas. Durante la aclimatación, el metabolismo se redirige hacia la síntesis de moléculas crioprotectoras, como los azúcares solubles (sacarosa, rafinosa, estaquiosa, trehalosa), polioles (sorbitol, ribitol, inositol) y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (prolina, glicinabetaína). Estos compuestos, junto con las proteínas dehidrinas (DHN), las proteínas reguladas por frío (COR) y las proteínas de choque térmico (HSPs), actúan para estabilizar tanto las proteínas y los fosfolípidos de la membrana, como proteínas citoplasmáticas, manteniendo las interacciones hidrofóbicas, la homeostasis de los iones y reaccionando frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen (Janská *et al.* 2010).

Para contender contra el frío, las plantas deben mantener la fluidez de la membrana celular, lo cual logran modificando la composición de ácidos grasos de las membranas durante la aclimatación, protegiendo así a las células del estrés por baja temperatura. Los cambios más notables en la composición lipídica son un aumento en la proporción de fosfolípidos, así como la disminución de glucosil ceramidas. En muchas especies de plantas, el aumento de fosfolípidos es principalmente el resultado de un aumento en la proporción de especies moleculares insaturadas de fosfatidilcolina (Uemura *et al.* 2006). Los cambios en los lípidos de la membrana también promueven la generación de moléculas de señalización de lípidos, en

especial se sabe que la fitoesfingosina-1-fosfato que se sintetiza durante la exposición a bajas temperaturas y activa a la cinasa MPK6 involucrada en la respuesta a estrés como el biótico (Ling 2015; Dutilleul *et al.* 2012).

Otro mecanismo que le permite a las plantas responder al frío, es cuando se afecta la actividad cinasas o fosfatasas, estimulando la producción de antioxidantes, hormonas como ácido abscísico (ABA) y osmolitos, entre los que se encuentran los azúcares solubles y la prolina (Janská *et al.* 2010; Ling 2015).

6. Genes de respuesta a frío

La aclimatación al frío implica una variedad de modificaciones fisiológicas y bioquímicas, mediadas por la modulación de la expresión génica. Se ha postulado que la membrana plasmática es el sensor principal de la detección del frío y el punto de partida para la transmisión de la señalización al núcleo. Se ha reportado que después de la exposición al estrés por frío, COLD1 (en inglés: cold sensor chilling-tolerance divergence) que se encuentra en la membrana plasmática y el retículo endoplásmico, interactúa con RGA1 (del inglés: rice G- protein subunit 1), activa la vía de señalización por Ca^{2+} y estimula la señal de frío corriente abajo y la expresión de factores de transcripción como los CBFs (del inglés C-repeat/ DREB binding factors), (Shi *et al.* 2018) Figura 1.

A temperaturas óptimas, la expresión de los genes CBF se mantienen en niveles bajos. Tras la exposición a bajas temperaturas, la expresión de los genes CBF se induce rápidamente, mostrando que la aclimatación al frío está regulada por mecanismos postraduccionales. Hasta ahora se conocen dos modificaciones postraduccionales que afectan las proteínas CBF, la fosforilación y la ubiquitinación. Entre los inductores de estos genes que se encontrado están, el factor de transcripción ICE1 (inductor de la expresión de CBF1) y las proteínas CAMTA (factores de transcripción de unión a calmodulina). Debido a la rápida inducción (pocos minutos) de la transcripción de los CBF después de la exposición a bajas temperaturas, es poco probable que ICE1 requiera una síntesis *de novo*, por lo que se cree que este gen siempre está ahí en ausencia de estrés por frío y sólo se activa cuando la temperatura está disminuyendo. Particularmente, se sabe que CAMTA1

y CAMTA2 son reguladores positivos de CBF1-3 en frío, mientras que CAMTA3 y CAMTA5 regulan la expresión de CBF1 en respuesta a la disminución rápida (pero no gradual) de la temperatura (Shi *et al.* 2018; Barrero-Gil y Salinas 2018).

También algunos represores transcripcionales suprimen directamente la activación de CBF inducida por frío, como es el caso de MYB15 y el factor de interacción con el fitocromo (PIF). Un estudio reciente mostró que MPK6 interactúa y fosforila a MYB15 para reducir su unión a los promotores de CBF, liberando así su efecto inhibitorio (Shi *et al.* 2018; Chinnusamy *et al.* 2003).

Factores de transcripción, como CBF se han aislado de muchas especies como arroz, tomate, trigo, cebada y maíz, sugiriendo que están muy conservados en las plantas. El papel de los CBF en la aclimatación al frío es integrar una serie de señales ambientales e iniciar la respuesta transcripcional que permita a la planta aumentar su tolerancia a la congelación. Las proteínas CBF realizan esta función a través de su unión al motivo CCGAC, presente en el promotor de muchos genes inducidos por el frío, activando su transcripción. Se ha visto que la sobreexpresión de los genes CBF inducen la expresión de los genes COR. En *A. thaliana*, los genes COR incluyen, genes inducibles por bajas temperaturas, que codifican para enzimas de la síntesis de osmolitos y proteínas crioprotectoras, que ayudan a disminuir la rigidez membranal y estabilizar el potencial osmótico en condiciones de frío (Shi *et al.* 2018 Barrero-Gil y Salinas 2018) Figura 1.

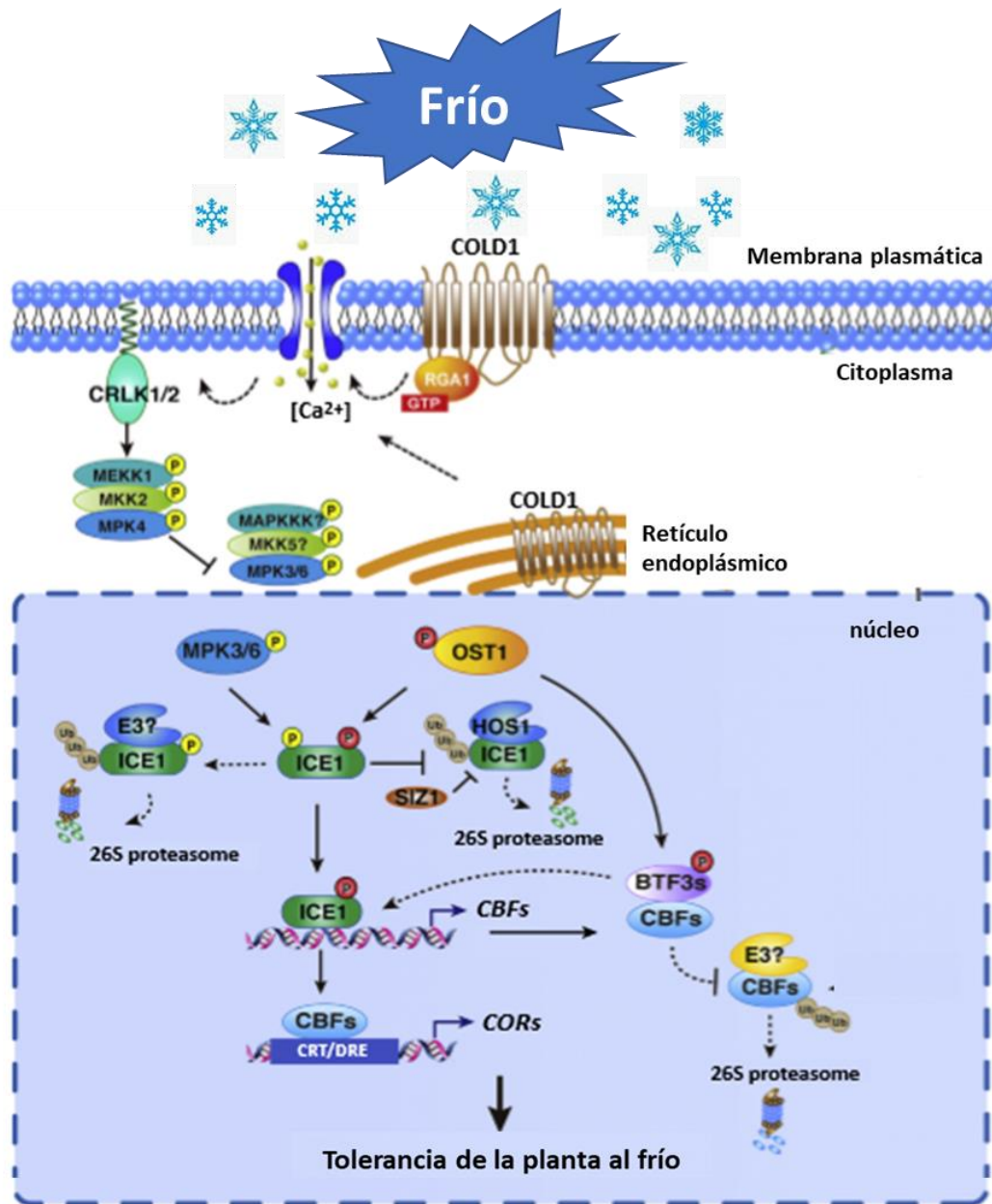


Figura 1. La señalización celular a bajas temperaturas en plantas. La membrana plasmática percibe el estímulo de las bajas temperaturas siendo el punto de partida de la transmisión de la señal al núcleo. COLD1 activa la señalización por Ca^{2+} . CRLK 1/2 regula positivamente la expresión génica activando la ruta MKK1-MKK2-MPK4. La señal de frío también activa la cascada MKK4/5-MPK3/6 para regular la tolerancia a la congelación a través de la fosforilación y la degradación de ICE1. Bajo estrés por frío la fosforilación de ICE1 por OST1 y MPK3/6 reduce su estabilidad. La sobreexpresión de HOS1 disminuye la tolerancia a la congelación al reprimir la expresión de CBF3. MPK3 y MPK6 median la fosforilación y la degradación de la ICE1 mediante el reclutamiento de las ligasas E3 (Modificado de Shi *et al.* 2018).

7. Las MAP cinasas como parte de los mecanismos de transducción de señales

Las MAPKs desempeñan un papel importante en la transducción de señales extra e intra celulares conservadas en todos los eucariotas. Son enzimas que participan en la transducción de señales derivadas de muchos estímulos ambientales y de desarrollo. En plantas, la señalización por MAPKs da como resultado la activación de genes que desencadenan respuestas de defensa apropiadas, la activación/represión de proteínas que modulan el crecimiento y desarrollo (Takáč *et al.* 2016).

La fosforilación/desfosforilación de proteínas, es un mecanismo importante para controlar muchos procesos celulares fundamentales en todos los organismos vivos, ya que se modifica la actividad, la localización subcelular, la estabilidad o las interacciones entre las proteínas, de manera rápida y reversible.

Las MAP cinasas funcionan en un diseño de cascada conformada por tres componentes que se activan de manera consecutiva, la MAP cinasa (MAPK) es fosforilada y activada por una MAPK cinasa (MPKK), que a su vez es activada por una MAPKK cinasa (MAPKKK) (Figura 2). En el genoma de *A. thaliana* se han identificado cerca de 110 genes que codifican para MAP cinasas, de estos 20 codifican para proteínas MAPK, 10 MAPKK y 80 proteínas MAPKKK (Jagodzik *et al.* 2018).

Las MAPKs de las plantas se localizan en el citosol y/o núcleo, pudiendo translocarse de un compartimento al otro. Tras la detección de cambios ambientales en la superficie celular, las MAPK participan en la transducción de señales en ocasiones causando una reprogramación transcripcional (Bigeard y Hirt 2018).

Algunos de los sustratos de las MAPKs son factores de transcripción que actúan en el núcleo regulando la expresión de genes. Esto subraya la importancia de las MAPKs como reguladoras de la programación de la transcripción, en particular permitiendo que las respuestas de adaptación al estrés ambiental sean rápidas y eficientes (Bigeard y Hirt 2018; Dóczi y Bögre 2018).

En las plantas, las MAP cinasas están representadas por familias multigénicas que constituye una red compleja para la transmisión eficiente de estímulos específicos.

La señalización a través de una cascada de la MAP cinasas puede conducir a la división y diferenciación celular, así como a la respuesta ante diversos estreses abióticos y bióticos, como el estrés osmótico, el frío, la salinidad, la sequía y las heridas (Mishra *et al.* 2016).

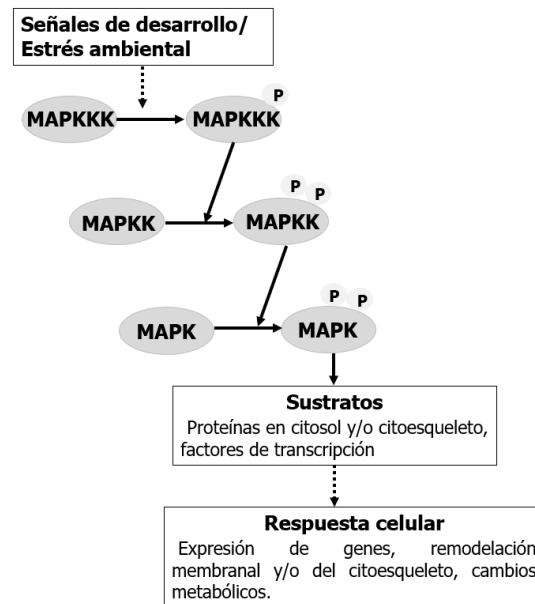


Figura 2. Representación esquemática de las cascadas de MAP cinasas. Las cascadas de MAP cinasas funcionan de la siguiente manera: una MAPK (MPK) es fosforilada/activada por una MAPK cinasa (MPKK), que a su vez es activada por una MAPKK cinasa (MAPKKK). Las MAPKs tienen como sustratos factores de transcripción y proteínas de núcleo y citosol que conllevan a una respuesta celular al estímulo percibido. (Modificado de Jagodzic *et al.* 2018).

a) La cascada de MPK4

La proteína MPK4 es una MAPK que es altamente expresada en células guarda y es activada por la fosforilación treonina/tirosina (en la secuencia TXY). MPK4 se activa ante diferentes estreses bióticos y abióticos, en algunos casos a través de la cascada MEKK1-MKK1/MKK2- MPK4. No está claro cómo diferentes tipos de estrés activan una misma cascada de MAPK, pero una posibilidad es que se genere un componente común corriente abajo de señales originales provenientes de diferentes estreses. La señal debe ser percibida por un receptor desconocido corriente arriba de MEKK1, que una vez activada desencadena la activación de los componentes subsecuentes (MKK1/MKK2 y MPK4). Como ejemplo, el H₂O₂ se produce bajo diversas condiciones de estrés y puede activar a MPK4, teniéndose la hipótesis de

que funciona como una señal intermedia de estrés en general. Río arriba de la cascada MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4, hay un circuito de retroalimentación negativa para regular la baja del nivel de H₂O₂. Los mecanismos por los cuales el H₂O₂ activa la cascada de MPK4 aún no se han determinado. Pero se sabe que MPK4 fue reconocida como un regulador negativo de la resistencia sistémica adquirida (SAR), ya que los niveles de ácido salicílico (SA) y especies reactivas de oxígeno (ERO), son mayores en mutantes de *Arabidopsis* en MPK4 (Gao *et al.* 2008; Lin y Chen 2018).

La interacción entre MEKK1 y MKK1 o MEKK1 y MKK2 se produce principalmente en el citoplasma, mientras que la interacción entre MPK4 y MKK1 o MPK4 y MKK2 ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo, lo que sugiere que la percepción de la señal en sentido ascendente se produce inicialmente en el citoplasma por MEKK1 de donde se transduce al núcleo, por las cinasas en sentido descendente MKK1/MKK2 y MPK4 (Gao *et al.* 2008).

Se sabe también que MPK4 tiene importantes funciones en la inmunidad PTI (inmunidad inducida por PAMPs) activada por las moléculas PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) y la inmunidad ETI (inmunidad inducida por efectores). Aunque MPK4 parece ser un importante regulador negativo en la inmunidad de las plantas, es un regulador positivo en la citocinesis, la reproducción y la fotosíntesis (Lin y Chen 2018).

En una mutante en MPK4 se encontró que 538 genes están inducidos y 238 reprimidos en comparación con los de la planta tipo silvestre. La expresión de estos genes cambió diferencialmente en varios procesos biológicos, incluyendo la respuesta al estrés, la señalización por SA (ácido salicílico) y el metabolismo de ERO (Lin y Chen 2018).

Varias proteínas han sido identificadas como sustratos de MPK4. incluyendo: la MAP cinasa sustrato 1 (MKS1), la topoisomerasa II 1 (PAT1) y la proteína 65 asociada a microtúbulos (MAP65) entre otras (Lyn y Chen 2018).

b) MPK4 en respuesta a frío

De la literatura se sabe que MPK4 se activa por MKK1 y MKK2. Además, se ha encontrado que MKK2 activa a MPK4 en respuesta a frío y MKK1 muestra mayor activación en presencia de H₂O₂, bacterias y hongos (Takáč *et al.* 2016; Teige *et al.* 2004).

Se ha sugerido específicamente que la cascada que activa a MPK4 durante la respuesta a frío contiene los siguientes componentes: Ca²⁺/ CaM-CRLK1–MEKK1-MKK2-MPK4 (Teige *et al.* 2004; Furuya *et al.* 2014; Nakagami *et al.* 2005).

ICE1 se ha identificado como un objetivo de la señalización de MAPKs ante estrés por frío y se ha demostrado que MPK3 y MPK6 lo fosforilan promoviendo su degradación, lo cual reduce la transcripción de genes CBF. Por otro lado, la cascada MEKK1-MKK2-MPK4 regula positivamente la expresión ICE1 en frío, antagonizando la respuesta de MPK3 y MPK6 (Liu y Zhou 2017) (Figura 1).

8. La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática

En todos los eucariotas, el potencial electroquímico de la membrana plasmática y los sistemas de transporte secundario tienen lugar debido a la actividad de las bombas de protones. Un ejemplo de estas es la ATPasa de H⁺ (Figura 3) que pertenece al grupo de las P-ATPasas, las cuales comparten la característica de tener un intermediario con un aspartato fosforilado durante el ciclo catalítico. La ATPasa de H⁺ es una proteína transmembranal encontrada en plantas y hongos que acopla la hidrólisis de ATP con el transporte de H⁺ desde el citoplasma hacia el exterior de la célula, lo cual genera un gradiente electroquímico que tiene dos componentes: una diferencia de pH (ΔpH) y de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) (Pedersen *et al.* 2007; Morales-Cedillo *et al.* 2015).

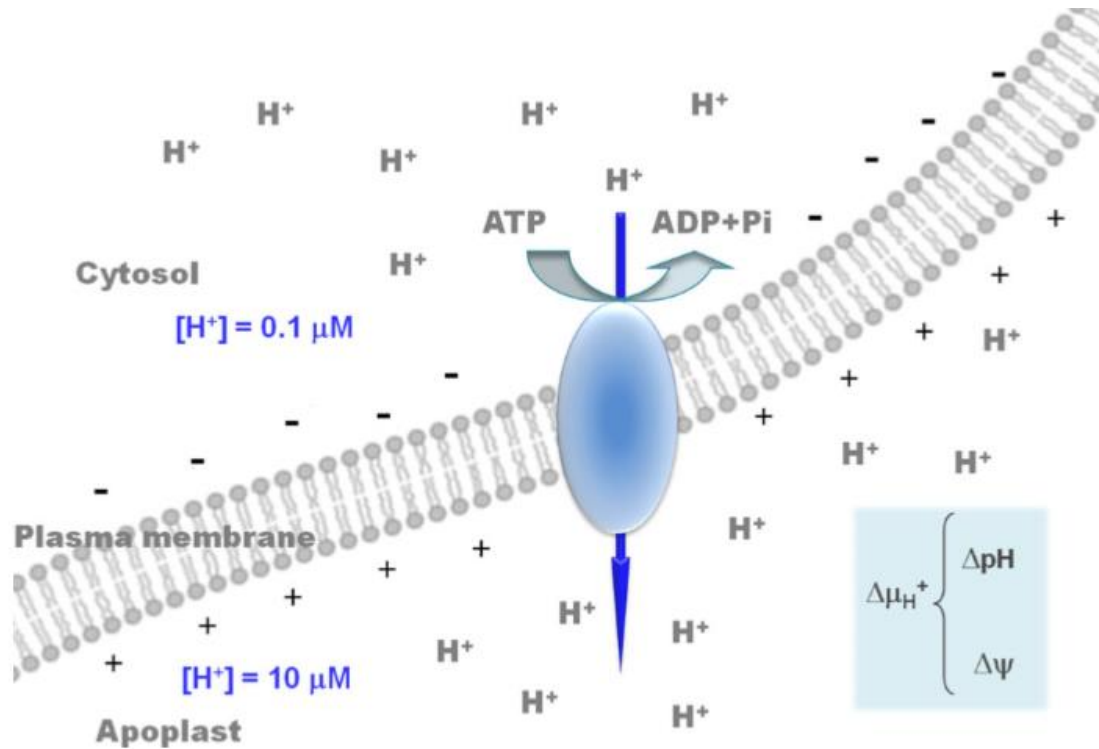


Figura 3. Representación esquemática de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Se representan las reacciones de hidrólisis de ATP y bombeo de H⁺ del citosol al apoplasto (modificado de Morales-Cedillo *et al.* 2015).

a) Estructura

Se ha descrito que la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (Figura 4) de las plantas está compuesta por una única subunidad que existe como múltiples isoformas, es un monómero funcional de ~100 kDa, puede oligomerizarse para formar complejos diméricos y hexaméricos.

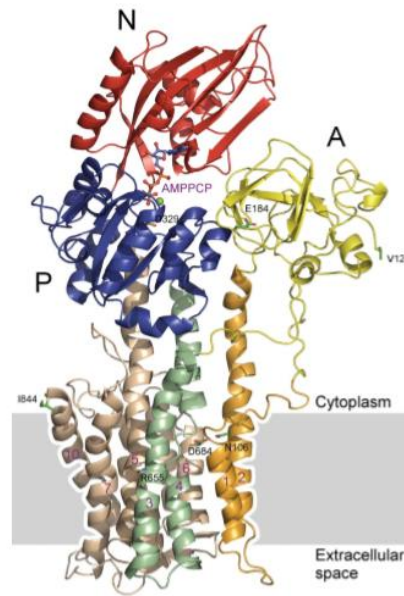


Figura 4. Estructura de la H⁺ ATPasa de la membrana plasmática. La estructura se representa en su forma activa sin su C terminal, en complejo con Mg-AMPPCP. Diez hélices transmembranales, naranja, verde y marrón. Dominio de unión a nucleótidos (N), rojo; dominio de fosforilación (P), azul; y el dominio actuador (A), amarillo. El cuadro gris representa la ubicación aproximada de la membrana plasmática (modificado de Pedersen *et al.* 2007) PDB: 5KSD.

Los segmentos N y C-terminales de la ATPasa de H⁺ sobresalen del citoplasma, mientras que diez segmentos transmembranales (TM1-TM10) que forman un bucle entre TM2 y TM3 y un gran bucle entre TM4 y TM5. Las ATPasas tipo P constan de los dominios A, M, P, N y R. El dominio A (activador) consiste del segmento N terminal y el pequeño bucle. El dominio M corresponde al segmento de membrana. El dominio P, ubicado en el bucle grande, corresponde al dominio de fosforilación. La secuencia para el dominio N, que corresponde al dominio de unión a nucleótidos, está ubicada entre las dos partes de la secuencia que forma el dominio P. Finalmente, el dominio R consiste en la parte C-terminal de la proteína y actúa como un dominio auto inhibitorio (Pedersen *et al.* 2007; DUBY y Boutry 2009).

b) Función

La actividad de la ATPasa de H⁺ tiene funciones fisiológicas importantes para el desarrollo y supervivencia de las plantas, algunas de ellas se describen a continuación:

Transporte secundario

Una de las principales funciones de la ATPasa es el activar el transporte secundario. La absorción de algunos minerales desde el subsuelo puede ocurrir contra gradiente y en este caso, se puede utilizar la energía proporcionada por el gradiente electroquímico de H^+ creado por la ATPasa, ya que muchos simportadores y antiportadores utilizan protones para transportar solutos través de la membrana. Se sabe también que la ATPasa puede proporcionar la energía necesaria para transportar moléculas orgánicas, un ejemplo bien caracterizado es el transportador de sacarosa, involucrado en el transporte de azúcar del apoplasto a los tejidos por el floema (Morsomme y Boutry 1999).

Apertura de estomas y osmorregulación

La apertura y cierre de las estomas es la función de las células guarda, donde diferentes señales tales como CO_2 , humedad, luz, las toxinas y hormonas fúngicas pueden regular la apertura. Las señales conducen a la captación de agua, el aumento de la turgencia y la hinchazón celular, que eventualmente conducen a la apertura de los estomas. El papel de la ATPasa de H^+ en este mecanismo es proporcionar la energía electroquímica requerida para conducir el movimiento de los iones y controlar la apertura de los canales (Morsomme y Boutry 1999; Inoue y Kinoshita 2017).

Expansión celular

La elongación de los órganos de las plantas, como los hipocotilos, los coleoptilos y las raíces, es inducida por auxinas, lo cual se ha explicado por la teoría del crecimiento ácido desde la década de 1970. Esta teoría afirma que las auxinas acidifican a la pared celular a través de la activación de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Este proceso reduce el pH apoplástico, promoviendo así la extensión de la pared a través de la activación de proteínas que rompen los puentes de hidrógeno de la celulosa. Además, el gradiente de protones creado por la ATPasa de H^+ forma un potencial electroquímico a través de la membrana plasmática que proporciona la fuerza motriz para la captación de K^+ a través de

canales de K^+ y la posterior captación de agua. Estos procesos permiten la expansión celular que conlleva a la elongación celular (Hager 2003).

c) Regulación

La generación del gradiente electroquímico formado por la ATPasa de H^+ es indispensable para el transporte activo secundario que sucede a través de la membrana plasmática. La actividad de la ATPasa de H^+ está regulada a niveles transcripcional, postraduccional y por los factores ambientales de la membrana, como los lípidos que la componen (Kasamo 2003).

Isoformas

En *A. thaliana* se conocen 11 genes de la familia de la ATPasa de H^+ (AHA1-11). Análisis genéticos han revelado que múltiples AHAs son expresadas en diferentes tejidos y órganos, pero la diferencia está en los niveles de expresión de cada una dependiendo el órgano o tejido. También se ha visto que en mutantes nulas que al remover una isoforma su función puede ser compensada por otra (Mitch y Coaker 2011). En *A. thaliana* las isoformas de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática están codificadas por al menos tres genes designados: *AHA1*, *AHA2* y *AHA3* (Palmgren y Christensen 1993).

Ambiente lipídico membranar

Se ha estudiado a los lípidos membranales como efectores de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, encontrándose una dependencia entre el transporte de protones y su contenido de fosfolípidos. Esta interdependencia se evaluó mediante la reconstitución de la ATPasa de H^+ en liposomas preparados con varias especies moleculares de fosfolípidos. Se observó que la actividad de la ATPasa de H^+ se ve estimulada por fosfolípidos en el siguiente orden descendente: isolectina, fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC) y fosfatidilglicerol (PG), donde la activación máxima de la ATPasa es observa con isolectina (del 0.05-0.03% (p/v) (Kasamo 2003; Morales- Cedillo *et al.* 2015).

Respecto a la parte hidrofóbica de los lípidos membranales, se han examinado las especies moleculares de PC como efectores de la actividad de la ATPasa de H^+ ,

detectándose que la actividad de la enzima depende del grado de saturación o insaturación de la cadena del ácido graso y su longitud. Se ha encontrado que la actividad disminuye con un aumento en la longitud de la cadena del ácido graso. La activación máxima se observa cuando se añade a la mezcla de reacción PC con cadenas de 1-miristoilo (14: 0) y 2-oleoilo (18: 1) o 1-oleoilo y 2-miristoil acilo. Estos resultados muestran que la activación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por PC depende de una combinación de ácidos grasos saturados e insaturados (Kasamo 2003).

En cuanto a los esteroides, se ha descrito que su alteración en la composición de la membrana plasmática modifica la actividad de la ATPasa de H⁺. Este efecto fue dependiente de la especie molecular y la concentración de esteroide. Se encontró que el estigmasterol estimula el bombeo de H⁺ y la hidrólisis de ATP, especialmente en bajas concentraciones, mientras que otros esteroides como campesterol, sitosterol y 24-metil-colesterol, se comportaron como inhibidores en cualquier concentración (Morales-Cedillo *et al.* 2015).

Se ha descrito la regulación de la actividad de las enzimas membranales por lípidos mediante dos teorías: la teoría de los lípidos en conjunto (*bulk*) y la teoría de los lípidos frontera o anular. La primera establece que los cambios en la composición de lípidos de la bicapa alteran su fluidez, lo que provoca un cambio en la conformación de las proteínas y por tanto en su actividad. Debido a que las membranas tienen una gran movilidad lateral de sus componentes, la fluidez de los lípidos en conjunto podría estar alterando la conformación de la enzima y por tanto su actividad (Kasamo y Sakakibara 1995)

La segunda, propone que ciertos lípidos membranales están estrechamente unidos alrededor de la proteína a los cuales se les llama lípidos anulares. Estos lípidos técnicamente no pueden eliminarse fácilmente, son heterogéneos en su composición y la afinidad de cada uno por la proteína puede ser diferente. Se piensa que los lípidos anulares interactúan con la proteína regulando su actividad (Kasamo 2003). Por ejemplo, experimentos de nuestro grupo de trabajo determinaron que el aumento de Glicosil-inositolfosforilceramidas (GIPCs) en la membrana plasmática, produce un cambio conformacional de la ATPasa en la cual

hay un desplazamiento del carboxilo terminal del enzima debido posiblemente a las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos de la región del carboxilo terminal y el grupo polar de los esfingolípidos aniónicos (GIPCs), proporcionando un efecto positivo en la actividad (Morales-Cedillo 2014).

d) Papel del carboxilo terminal

El dominio C terminal de la ATPasa de H⁺ consta de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos y puede inhibir la función catalítica de la enzima, es decir, actúa como un dominio auto inhibitorio que pueden ser regulado mediante su fosforilación por proteínas cinasas o por la unión de especies lipídicas específicas. Por ejemplo, se sabe que es activada por lisofosfolípidos a través de un mecanismo que involucra el dominio terminal de la ATPasa (Green *et al.* 2014)

La región C terminal de la ATPasa de H⁺ de las plantas es más larga y no está estructuralmente relacionada con la de la ATPasa de H⁺ de levadura, sin embargo, en ambos casos esta región está involucrada en su regulación. Se ha demostrado que el tratamiento de la membrana plasmática de plantas con tripsina para cortar el carboxilo terminal, da como resultado la activación de la ATPasa de H⁺. Trabajos genéticos confirmaron estos datos, con la eliminación de los últimos 92 residuos en la isoforma AHA2 de *A. thaliana* expresada en levadura. Tanto con el tratamiento con tripsina como con la eliminación genética, la actividad de ATPasa aumenta, la *Km* aparente disminuye y pH del espacio extracelular disminuye a valores más alcalinos (Morsomme y Boutry 1999).

Los sitios de fosforilación que regulan la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se agrupan principalmente en el la región del carboxilo terminal (Figura 5), el cual también se ha denominado dominio R (regulador) o autoinhibidor. Se sabe que la isoforma AHA2 está sujeta a regulación postraducciona por fosforilación en al menos ocho residuos de Ser y Thr en dicha región, se tiene conocimiento de que la fosforilación en Thr881 o Thr947 aumenta la actividad de AHA2, mientras que la fosforilación en Ser899 o Ser931 la disminuyen. Por otro lado, la fosforilación en el penúltimo residuo de Thr puede formar un complejo con la proteína 14-3-3 (Haruta *et al.* 2016).

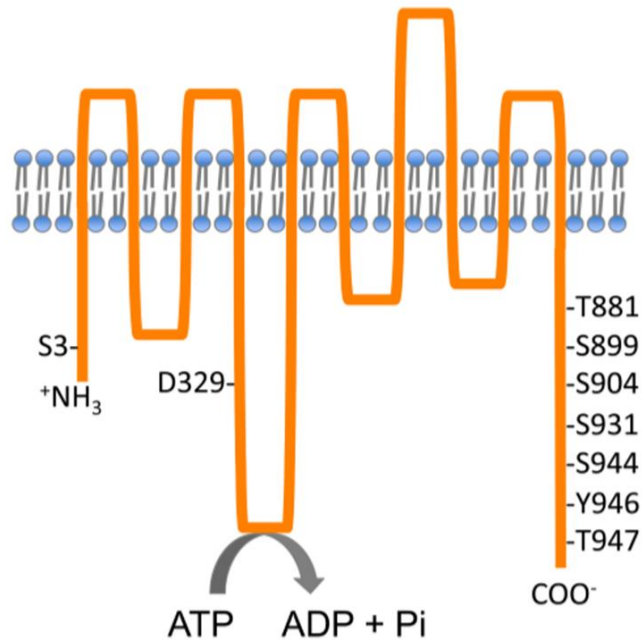


Figura 5. Sitios de fosforilación de la ATPasa de H⁺ de *Arabidopsis thaliana*. La actividad de AHA2, una isoforma de la ATPasa de H⁺, está regulada por la fosforilación postraduccional de varios residuos Ser y Thr que se presentan en el esquema. La fosforilación en los residuos de Thr881 o Thr947 aumenta la actividad de AHA2, mientras que la fosforilación en Ser899 o Ser931 disminuye la actividad (modificado de Hurata *et al.* 2016).

e) Interacción con la proteína 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 son proteínas que regulan la actividad de una amplia gama de objetivos como, cinasas, factores de transcripción, proteínas estructurales, canales iónicos y proteínas relacionadas con la defensa de patógenos y funciones fisiológicas en las plantas. La capacidad de las 14-3-3 para regular sucede a través de interacciones directas proteína-proteína que modifican la actividad de la proteína blanco ya sea en términos de su actividad absoluta, de su interacción con otras proteínas o su localización celular, por lo que tienen la capacidad para regular vías complejas de señalización. El estrés ambiental es uno de los estímulos que causa alteraciones en la expresión las proteínas 14-3-3, estas alteraciones se muestran diferentes dependiendo del tipo de estrés, afectando el nivel de expresión y transcripción de las diferentes isoformas (Denison *et al.* 2011, Roberts 2003).

Las proteínas 14-3-3 tienen forma de copa con una superficie cóncava interna muy conservada y una superficie externa variable. Una característica llamativa de los monómeros de 14-3-3 es que la que la superficie cóncava comprende un surco anfipático. Es interesante notar que los residuos que recubren la superficie cóncava del surco se conservan principalmente entre las diferentes isoformas de la familia 14-3-3 porque muchos ligandos se unen bien a todas las isoformas, específicamente motivos de aminoácidos cortos que contienen fosfoserina o fosfotreonina. La estructura externa por otro lado puede tener menos restricciones estéricas y una mayor flexibilidad conformacional. Esto les da a las proteínas 14-3-3 una gran versatilidad en el reconocimiento de una amplia gama de secuencias de ligandos. (Fu *et al.* 2000; Roberts 2003).

La familia de las proteínas 14-3-3 es abundante en el citoplasma de las células vegetales. Para que la proteína 14-3-3 se pueda unir a la proteína objetivo, esta tiene que estar fosforilada en una secuencia específica que presenta un motivo de unión a las proteínas 14-3-3. Las secuencias blanco están muy conservadas entre plantas y mamíferos, por lo que se sugiere que sus funciones biológicas son similares en ambos reinos. La ATPasa de H⁺ es un blanco de las proteínas 14-3-3 bien caracterizado. Se ha reportado que ante estrés por frío u osmótico aumenta la presencia de las proteínas 14-3-3 en la membrana plasmática, lo cual está asociado con una mayor actividad de la ATPasa de H⁺. En plantas, la fosforilación del penúltimo residuo Thr de la ATPasa de H⁺ desencadena la unión de la proteína 14-3-3, la cual desplaza a la región del carboxilo terminal de la enzima y como resultado se estabilizan conformaciones que constituyen estados activos de la ATPasa de H⁺ (Falhod *et al.* 2015; Roberts *et al.* 2002). Se sabe que la fosforilación de la ATPasa de H⁺ juega un papel importante en su regulación. Hay múltiples sitios posibles de fosforilación en la ATPasa de la membrana plasmática pero la primera en descubrirse y la más estudiada es la fosforilación del penúltimo residuo (Thr-948 en AHA1 y Thr-947 en AHA2) (Falhod *et al.* 2015).

De acuerdo con la literatura, las proteínas 14-3-3 también regulan potencialmente la expresión de genes relacionados con las respuestas a estrés, afectando su

actividad, localización o transcripción (Falhod *et al.* 2015). En *Arabidopsis* hay entre 10 y 13 genes que se expresan y codifican para las isoformas de proteínas 14-3-3. De esos genes, sólo RC11A y RC11B, codificantes de las isoformas \emptyset y \ddot{e} , respectivamente, parecen estar relacionadas en la respuesta a bajas temperaturas, indicando que diferentes isoformas están reguladas de distintas formas y regulan diferencialmente a sus blancos, activándose para funciones específicas (Roberts *et al.* 2002).

ANTECEDENTES

En el laboratorio se ha estudiado a la membrana plasmática como un probable sensor de bajas temperaturas. Durante el proceso de aclimatación, la rigidez de la membrana plasmática disminuye y se activan cascadas de MAP cinasas como parte de la vía de señalización (Barrero-Sicilia *et al.* 2017). Sobre este tema, el grupo ha estudiado el comportamiento de las plantas frente al estrés por frío y se ha estandarizado un esquema de aclimatación, en el cual las plantas se someten a 4°C durante una semana previo a un reto de congelación de -15°C (Cano-Ramírez 2014).

Específicamente, en el grupo se han hecho estudios relacionados con la aclimatación al frío en líneas transgénicas mutantes en genes que codifican para MAP cinasas. En dichas mutantes se han medido diferentes rasgos fenotípicos, como fluidez e integridad membranal, parámetros fotosintéticos y actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en condiciones de aclimatación. En plantas tipo silvestre (wt) se ha encontrado que la aclimatación disminuye alrededor del 40% la actividad de la ATPasa de H⁺, respecto a las plantas no aclimatadas (NA). En una mutante en MPK3 (*mpk3*), la actividad de la ATPasa de H⁺ resultó ser 50% mayor comparado con la planta wt NA, mientras que la aclimatación resultó en una disminución de la actividad de la ATPasa en la mutante del 15%, respecto a la wt aclimatada (Peña-Moral 2015).

También se ha estudiado el entorno lipídico de la ATPasa de H⁺ en plantas wt y *mpk3*. Preliminarmente, se ha visto que MPK3 podría modificar la actividad de la

ATPasa de H⁺ mediante un efecto que alterara la composición de esfingolípidos, ya que las GIPCs se encontraron en mayor cantidad en la mutante. Previamente en el laboratorio, las GIPCs ya se habían descrito como reguladores positivos de la actividad de la ATPasa de H⁺ (Ponce-Pineda 2018 y Morales-Cedillo *et al.* 2015).

JUSTIFICACIÓN

La detección de bajas temperaturas a nivel de la membrana plasmática y la transducción de señales mediante cascadas de MAP cinasas, son fenómenos que no se han explorado ampliamente. Este trabajo tiene como finalidad acercarse al conocimiento de la función de las MAP cinasas en el proceso de aclimatación al frío y su relación con la ATPasa de H⁺, ya que actualmente no se dispone de información. En el laboratorio se ha encontrado que en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que no expresan a las cinasas MPK3 o MPK6 cambia la actividad de la ATPasa de H⁺, comparada con la actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas de tipo silvestre, sugiriendo la regulación de la ATPasa de H⁺ por dichas MAPKs, MPK3 como regulador positivo en condiciones de no aclimatación y MPK6 como regulador negativo en condiciones de aclimatación. Estos resultados sugieren que la ATPasa de H⁺ puede estar regulada por cascadas de MAPK, lo cual no ha sido reportado hasta ahora. Debido a que no se ha estudiado la relación de MPK4 con la ATPasa de H⁺ en condiciones de aclimatación, y se ha reportado ser antagonista de MPK3 y MPK6, este trabajo tiene como finalidad estudiar la relación de MPK4 con la ATPasa de H⁺ en condiciones de aclimatación al frío. Se ha reportado por otra parte que MPK4 aumenta su actividad a tiempos cortos de exposición al frío (Ichimura *et al.* 2000). Para determinar lo anterior, empleamos mutantes de inserción de *Arabidopsis thaliana* que no expresan el gen de la cinasa MPK4.

Teniendo en cuenta que fenómenos como el calentamiento global ha incrementado las situaciones de estrés en las plantas y que las heladas son uno de los principales factores de pérdida de cultivos, resulta primordial entender los mecanismos

moleculares de tolerancia a la congelación, lo cual es fundamental para eventualmente poder aplicar este conocimiento al mejoramiento de cultivos.

HIPÓTESIS

Durante la aclimatación al frío, la actividad de la ATPasa de H⁺ se regula directa o indirectamente por una cascada de señalización en la que participa MPK4.

OBJETIVO GENERAL

Determinar cómo se afecta la actividad de la ATPasa de H⁺ en mutantes en MPK4 aclimatadas a frío.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Germinar y cultivar plantas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos tipo silvestre y de la línea mutante *mpk4*.
- 2) Caracterizar fenotípicamente a la mutante *mpk4* en cuanto a su respuesta a bajas temperaturas.
 - a) Registrar los fenotipos de exposición a la congelación, el porcentaje de sobrevivencia, el grado de deterioro y ultraestructura de los genotipos wt y *mpk4* en condiciones de no aclimatación (NA) y aclimatación (AC) antes y después de un reto de congelación.
 - b) Determinar los parámetros fotosintéticos y contenido de clorofila en plantas NA y AC de los genotipos wt y *mpk4*.
- 3) Caracterizar la actividad de la ATPasa de H⁺:
 - a) Evaluar la integridad del tejido de las hojas mediante la técnica de fuga de solutos de los genotipos wt y *mpk4* (NA y AC), después del reto de congelación.
 - b) Obtener vesículas de membrana plasmática de los genotipos wt y *mpk4* (NA y AC).

- c) Determinar la actividad específica y los parámetros cinéticos V_{max} , K_s y V_{max}/K_s de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de plantas de los genotipos wt y *mpk4*.
- d) Cuantificar los niveles de ATPasa de H^+ en hojas de plantas wt y *mpk4* en condiciones de NA y AC.
- e) Determinar la actividad de la ATPasa de H^+ en membranas incubadas con DMSO como rigidizante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos establecidos se utilizaron como material biológico plantas tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* y mutantes de pérdida de función de la cinasa MPK4 (*mpk4*) (Tabla 1). La estrategia experimental (Figura 6), presenta las técnicas experimentales planteadas y la secuencia metodológica para cumplir los objetivos del proyecto, tanto de la caracterización fenotípica de la mutante, como de la actividad de la ATPasa de H^+ .

1. Material biológico

Tabla 1. Características de las líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas experimentalmente

Línea	Características de la línea
wt	Planta tipo silvestre de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0. Sin modificaciones genéticas. Expresión normal de sus genes.
<i>mpk4</i>	Planta mutante en MPK4. Carece de la expresión de la MPK4. Tiene una inserción de T-DNA (SALK_056245) en el gen <i>MPK4</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , ecotipo Col-0.

2. Estrategia experimental

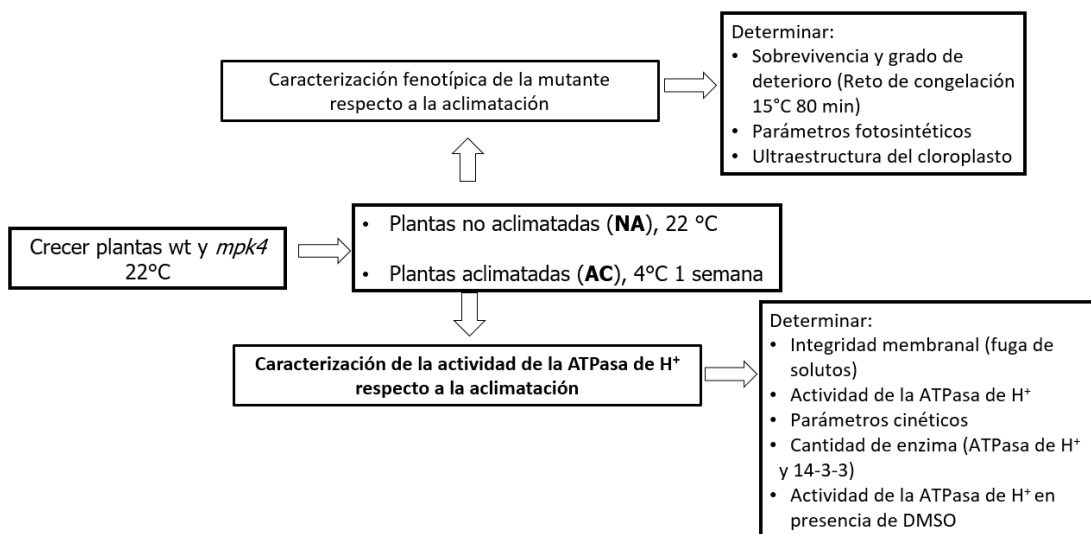


Figura 6. Diagrama de la estrategia experimental general para cumplir los objetivos de la tesis.

3. Germinación y crecimiento de las semillas de *Arabidopsis thaliana*

Para la germinación se tomó una cantidad pequeña de semillas wt o de la mutante *mpk4* con la punta de una espátula metálica para esparcirlas sobre la superficie del sustrato en una maceta. El sustrato utilizado se compone por 3 partes de Mix 3 Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 1 parte de agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo de México) y 1 parte de vermiculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canda Ltd.) que antes de colocarse en macetas claramente etiquetadas con el nombre del genotipo, fue bien mezclado y humedecido con agua. Las macetas con semillas se colocaron en una cámara a 22°C con un fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad y se regaron con 10 ml agua cada tercer día, aproximadamente.

Después de la germinación, las plántulas se dejaron crecer durante tres semanas, para ser trasplantadas individualmente. Esto se hizo con ayuda de pinzas y espátulas metálicas, teniendo cuidado de no dañar sus raíces al separarlas y sacarlas del sustrato. Con la espátula se hizo una excavación pequeña en el sustrato y se enterró la raíz de la plántula. Al final, se obtuvieron macetas con 1 o 3 plántulas. Las macetas se colocaron en charolas y se cubrieron con un domo transparente y una toalla de papel ubicándolas en el invernadero a 22°C con un

fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad la cuales se regaron periódicamente. El riego se realizó con agua durante las primeras tres semanas después del trasplante y luego con solución Hoagland (Hoagland 1920), la cual contiene micronutrientes y macronutrientes para el crecimiento de las plantas.

4. Condiciones de aclimatación y reto de congelación

Los individuos experimentales fueron plantas adultas de entre 3 a 4 meses de edad, que crecieron siempre a 22°C y se distribuyeron en dos grupos. Un lote control no se aclimatado (NA), manteniéndose siempre a 22°C, mientras un segundo lote se sometió durante una semana a un período de aclimatación (AC) a 4°C. El fotoperiodo en ambos casos fue de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Posteriormente, las plantas se sometieron a reto de congelación de -15°C durante 80 min en oscuridad. Para su recuperación, las plantas se expusieron a 4°C por 40 min y luego se transfirieron a 22°C con 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Los fenotipos de las plantas NA y AC se registraron fotográficamente al cabo de una y dos semanas después del tratamiento.

5. Determinación de la sobrevivencia y del grado de deterioro

Tanto el porcentaje de sobrevivencia, como el grado de deterioro se determinaron a una y dos semanas de recuperación. Para calcular el porcentaje de sobrevivencia al reto de congelación se consideraron como plantas sobrevivientes aquellas que tenían al menos una hoja viva (de color verde y sin marchitez evidente). El porcentaje de sobrevivencia en las diferentes réplicas se sometió al correspondiente análisis estadístico.

Para estimar el grado de deterioro de las plantas se realizó una escala para relacionar el grado de daño de las plantas con un número (Figura 7). Los fenotipos de plantas fueron seleccionados de entre los diferentes grados de daño mostrados durante el período de recuperación y se representaron con valores de 0 a 5. Con la ayuda de la escala se calificó cada planta experimental sometida al reto. Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico.

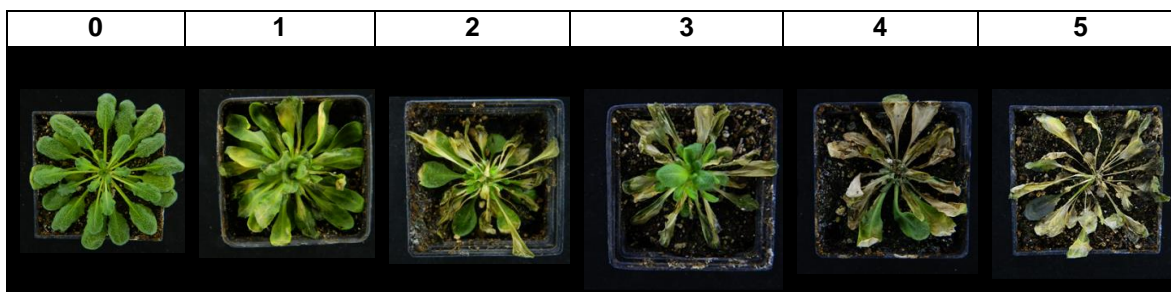


Figura 7. Escala de grado de deterioro. Representación numérica y fenotípica Del deterioro de las plantas después del reto de congelación (-15°C/80 min). La escala representa con 0 a plantas en buen estado no retadas. El aumento del deterioro se calificó con un número ascendente hasta llegar a un valor de 5, que representa plantas que no sobrevivieron.

6. Determinación de la fluorescencia de la clorofila a

Para estimar la capacidad fotosintética de las plantas, se midió la emisión de la fluorescencia de la clorofila a usando el aparato Handy Pea (Hansatech) y la clorofila total usando el CL-01 Chlorophyll content meter (Hansatech). Las mediciones se hicieron en 24 hojas provenientes de 12 plantas por línea y por condición experimental. Para el tratamiento de los datos obtenidos con el Handy PEA se utilizó el programa PEA Plus V1.10, con el que se realizaron gráficas de OJIP y de radar con parámetros de JIP (Apéndice 1). Además, se realizaron gráficas de barras comparativas de los parámetros con su respectivo tratamiento estadístico.

7. Fuga de solutos

Para determinar la pérdida de solutos se utilizaron plantas de entre 3 a 4 meses de edad sometidas al reto de congelación (-15°C, 80 min) al cabo del cual 7 hojas medianas se cortaron y se colocaron en un frasco con 80 ml de agua destilada, que se mantuvo a 4°C por 40 min. Posteriormente, con ayuda de un agitador magnético la solución se mantuvo en agitación controlada, cuidando que no se calentara. Para obtener las curvas del perfil temporal total de pérdida de solutos, se realizaron mediciones de la conductancia del agua destilada y desionizada (μS) con los solutos perdidos por las hojas a los 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 min después del reto, así como después de 10 min de ser hervidas para obtener la fuga total de solutos (conductancia del 100%). A partir de los perfiles temporales, 90 min se seleccionó

como tiempo adecuado ya que las diferencias en las lecturas fueron claras entre genotipos y tratamientos.

8. Análisis de la ultraestructura

Las hojas de las plantas de los genotipos estudiados NA y AC se cortaron en rectángulos de aproximadamente de 3 x 5 mm evitando la nervadura y se fijaron en un tampón de fosfatos 100 mM (pH 7,2) y glutaraldehído al 3% (v/v) a 4°C, se deshidrataron y se embebieron en metanol/óxido de propileno. Secciones de 80 nm se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron con un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII (Jeol Ltd., Tokio) operado a 60 kV (Saucedo-García *et al.* 2011).

9. Aislamiento de vesículas membranales

Se obtuvieron a partir fracciones microsomales de hojas que fueron cortadas, congeladas con nitrógeno (N₂) líquido y homogeneizadas. Las fracciones microsomales se sometieron a centrifugación diferencial para su fraccionamiento subcelular. Las vesículas a partir de las fracciones microsomales se obtuvieron utilizando un procedimiento de distribución de las membranas celulares en un sistema de dos polímeros acuosos (polietilenglicol y dextrán). Para determinar la concentración de proteína en las muestras se utilizó el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.* 1977) usando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL (Carmona-Salazar *et al.* 2011)

10. Determinación de fosfato inorgánico

Para realizar el ensayo se utilizaron tubos lavados con dextrán y ácido sulfúrico y los siguientes reactivos: Solución A: SDS 24%, solución B: ácido ascórbico al 12 % en ácido clorhídrico 1 N, solución C: Molibdato de amonio al 2% en ácido clorhídrico 1 N, solución E: 2% de citrato de sodio, 2% de metarsenito de sodio y 2% de ácido acético en agua bidestilada. A cada tubo se añadieron entre 1 a 100 nmoles de una solución estándar de fosfato (Pi) 1 mM K₂PO₄, ajustando volumen final a 150 µl con agua bidestilada, enseguida se agregan consecutivamente 150 µl de solución A y 300 µl de la mezcla de las soluciones B/C 1:1 V: V, se deja incubar de 3 a 7 min a

temperatura ambiente. Se agregaron 450 μL de la solución E y se deja reaccionar durante 20 min. Finalmente se mide la absorbancia a 850 nm (González Romo *et al.* 1992).

11. Ensayo de hidrólisis de ATP

Para realizar este ensayo se utilizaron dos estrategias: una a la que se le agrega una mezcla de inhibidores de las enzimas que podrían liberar P_i y que podrían encontrarse en las membranas. Las concentraciones finales de la mezcla son: 2 mM azida de sodio (NaN_3) inhibidor de la síntesis de ATP en la mitocondria, 2 mM molibdato de amonio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), inhibidor de fosfatasa, y 50 mM de nitrato de potasio (KNO_3), inhibidor de la ATPasa del tonoplasto. Para la segunda estrategia, se agregó al medio de reacción orto vanadato de sodio (Na_3VO_4), a una concentración final de 200 μM , como inhibidor de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

En ambos casos, el medio de reacción consistió en 250 mM de sacarosa ajustada a pH 6.5 con 20 mM de PIPES, 7 μM CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona), 0.015% Brij 58 (v/v), ATP 10 mM (Apéndice 2) y MgCl_2 10 mM. Al medio de reacción se le agregó la mezcla de inhibidores o Na_3VO_4 . El volumen total de los tubos fue de 1050 μL . Cada condición de hidrólisis de ATP se realizó por triplicado, las condiciones fueron: hidrólisis total (HT: con muestra y sin inhibidores), hidrólisis química (HQ: sin muestra ni inhibidores) e hidrólisis con mezcla de inhibidores o con Na_3VO_4 (HInh/ HV: muestra más inhibidores).

La reacción de hidrólisis de ATP se inició agregando 4 μg de proteína a cada tubo y colocándolo en un baño de agua a 29 $^\circ\text{C}$ por 20 min. La reacción se detuvo con 150 μL de SDS 24 % (p/v), se agitó en vórtex y se transfirió a una gradilla con hielo. Para el desarrollo de color se agregó a cada tubo 300 μL de solución B/C (1:1) y de 3 a 7 min después se añadieron 450 μL de reactivo E. Los tubos se dejaron reposar 20 min y se midió la absorbancia a 850 nm. Simultáneamente al ensayo de hidrólisis de ATP, se realizó una curva patrón de fosfato inorgánico.

12. Ensayo de hidrólisis de ATP con DMSO

Para este ensayo se preparó un medio de reacción compuesto de 250 mM de sacarosa a pH 6.5 ajustado con 20 mM de PIPES, 7 μ M CCCP, 0.015% Brij 58 (v/v), 3% DMSO y, en su caso, mezcla de inhibidores. Este medio de reacción no contiene ni ATP ni $MgCl_2$.

Aparte, se mezclaron el volumen de los stocks de ATP y de $MgCl_2$ necesarios para obtener en cada tubo una concentración final de 10 mM (Apéndice 2) de ambos reactivos en el medio de reacción, el volumen total por tubo fuera de 1050 μ L.

Cada condición de hidrólisis de ATP, con y sin DMSO, se realizó por triplicado. Las cuales fueron: hidrólisis química (HQ: sin muestra ni inhibidores) e hidrólisis con mezcla de inhibidores (HInh: muestra más inhibidores). Los tubos conteniendo la muestra (4 μ g) se incubaron 30 min a 25°C y la reacción se inició agregando el volumen necesario de la mezcla de ATP/ $MgCl_2$, se agitó el tubo con la mano y se colocó en baño de agua a 29°C. La reacción se detuvo a los 20 min con 150 μ L de SDS al 24%, los tubos se agitaron en vórtex y se transfirieron a un baño con hielo. El Pi liberado durante la hidrólisis de ATP se determinó utilizando la metodología detallada previamente.

13. Actividad de la ATPasa a diferentes concentraciones de ATP

Para este ensayo se prepararon medios de hidrólisis con y sin ATP/ Mg^{2+} . El medio con ATP/ Mg^{2+} contenía concentraciones finales de: 250 mM de sacarosa/PIPES ajustado a pH 6.5 con BTP, 7 μ M CCCP, 0.015% Brij 58 (v/v), 2 mM de NaN_3 , 2 mM $NaMoO_4 \cdot H_2O$, 50 mM KNO_3 , 10 mM $MgCl_2$ y 10 mM ATP ajustado a pH 6.5 (Apéndice 2). El segundo medio de hidrólisis contenía los mismos componentes, pero no sin $MgCl_2$ ni ATP (Sánchez-Nieto *et al.* 1997). Se utilizó la cantidad de tubos suficientes para las diferentes concentraciones de ATP, indicadas en la Tabla 2, etiquetados de la A a la M, tomando en cuenta que por cada concentración se tiene que realizar un ensayo de hidrólisis química. Las concentraciones indicadas en la Tabla 2 se obtienen al mezclar los medios de la hidrólisis con y sin ATP.

La reacción se inició agregando 4 µg de proteína a cada tubo, agitando manualmente y colocándolo en baño de agua a 29°C por 20 min. Los tubos para el ensayo de hidrólisis química solo se agitaron y se colocaron en el mismo baño de agua.

La reacción se detuvo agregando 150 µL de SDS al 24%, agitando el tubo unos segundos en un vórtex y transfiriéndolo a un baño con hielo.

Para determinar la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado durante la hidrólisis de ATP, se utilizó la metodología de determinación de Pi con su curva patrón correspondiente detallada previamente.

Tabla 2. Composición del medio de hidrólisis de ATP(MH) utilizado en la determinación del patrón cinético de la actividad de la ATPasa de H⁺.

Tubo	[ATP/Mg ⁺], (1:1) mM	Medio de hidrólisis con ATP µl	Medio de hidrólisis sin ATP µl
A	0	0	150
B	0.1	1.25	148.75
C	0.2	2.5	147.5
D	0.4	5	145
E	0.6	7.5	142.5
F	0.8	10	140
G	1	12.5	137.5
H	2	25	125
I	4	50	100
J	6	75	75
K	8	100	50
L	10	125	25
M	12	150	0
	Total	563.75	1386.25

14. Geles de poliacrilamida-SDS para la separación de proteínas

Para la separación de las proteínas contenidas en las vesículas de membrana plasmática se utilizó el método descrito por Achagger y Von Jagow 1987 el cual

requiere la realización de geles verticales de poliacrilamida-SDS para la separación electroforética de las muestras. El protocolo se describe a continuación:

1. Los vidrios de la cámara de electroforesis se limpian con alcohol, especialmente del lado que estará en contacto con el gel, se colocan separados y se montan sobre el soporte, verificando que no haya fugas vertiendo H₂O destilada dentro de los vidrios.
2. Si no hay fuga, el agua se retira volteando el soporte y los vidrios se secan con tiras de papel filtro.
3. La solución para el gel separador se prepara en un vaso de precipitado agregando los reactivos en el siguiente orden: 2315 µL de acrilamida-bis acrilamida, 2315 µL de amortiguador del gel (Tris-SDS, pH=8.9/HCl), 940 µL de glicerol, 1405 µL de H₂O desionizada, 23.5 µL de persulfato de amonio 10% y 2.4 µL de TEMED (Tetrametiletilendiamina). Esta solución se vierte inmediatamente entre los vidrios y se añade una capa de SDS al 0.3% para evitar en el gel que se forme una superficie cóncava. Se deja polimerizar a temperatura ambiente.
4. La polimerización se verifica inclinando el soporte y de ser así, se desecha el SDS eliminando el exceso con tiras de papel filtro.
5. El gel concentrador se prepara mezclando los reactivos en el siguiente orden: 330 µL de Acrilamida-bis acrilamida, 620 µL de amortiguador del gel (Tris-SDS, pH= 8.9 /HCl), 1530 µL de persulfato de amonio 10% y 2.4 µL de TEMED. Esta solución se vierte sobre el gel separador hasta el límite superior de los vidrios entre los se coloca un peine de 10 o 15 pozos según se requieran.
6. El gel concentrador se deja polimerizar 1 h a temperatura ambiente teniendo cuidado de que el gel en el fondo de los pozos no se contraiga, de ser el caso se agrega más gel concentrador.
7. Ya que ha polimerizado el gel concentrador, se remueve el peine con cuidado de no dañar los pozos.
8. Las placas de vidrio con el gel se fijan en el soporte de la cámara de electroforesis colocando el vidrio pequeño hacia adentro. El interior de la

cámara de electroforesis se llena con amortiguador del cátodo (0.1 M Trizma Base, 0.1 M tricina, 0.1 % SDS). hasta arriba de las placas de vidrio.

9. Las muestras se cargan en los pozos utilizando un mismo volumen.
10. La base de la cámara de electroforesis se llena con amortiguador del ánodo (0.2 M Trizma Base ajustado con HCl 1 M pH= 8.9) hasta que cubra los primeros tornillos de las placas del gel.

La electroforesis se realiza a 60 volts por 30 min y 90 V hasta que las muestras alcancen el frente inferior.

15. Inmunoréplica para la ATPasa de H⁺ y 14-3-3

Las proteínas de las vesículas de membrana plasmática resultas por electroforesis, se transfieren a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) (Immobilion Millipore) mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Los geles se incuban por 15 min a temperatura ambiente con agitación contante suave en amortiguador de transferencia (NaPO₄ mM, pH 6.8, SDS 0.05% y metanol absoluto 20%).
2. La membrana de PVDF de 0.4 μm, se humedece con metanol absoluto.
3. El sistema de transferencia se ensambla, colocando de abajo hacia arriba: una esponja, una hoja de papel filtro, el gel, la membran de PVDF, otra hoja de papel filtro y otra esponja. Tanto el papel filtro como la esponja son previamente saturados con amortiguador de transferencia, el cual comprende de 15 mL de una solución 1 M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 (se prepara tomando 7.5 mL de 1 M de Na₂HPO₄ y 7.5 mL de 1 M de Na₂H₂PO₄), 200 mL de metanol reactivo analítico y 5 mL de solución de SDS al 10%.
4. El sistema descrito se coloca en la cámara de transferencia orientándolo de manera que el gel se encuentre de cara al cátodo (negativo, negro) y la membrana hacia el ánodo (positivo, rojo). Hay que tener cuidado de que la cámara tenga la suficiente cantidad de amortiguador de transferencia para cubrirlo.

5. El amortiguador de la cámara se mantiene en agitación con ayuda de un agitador magnético y La transferencia se realiza a 30 V durante 1 h 20 min.
6. Terminado el tiempo de transferencia la membrana de PVDF se remueve del sistema y se somete a 5 lavados con H₂O desionizada, se añaden 4 mL del primer reactivo del sistema Western Blot Enhancer (Pierce®), se deja actuar por 2 min, se realizan 5 lavados consecutivos con H₂O desionizada, se añaden 4 mL del segundo reactivo del sistema Western Blot Signal Enhancer, se deja actuar por 10 min y se realizan 5 lavados rápidos con H₂O desionizada.
7. La membrana se incuba con solución bloqueadora (leche descremada al 2% en TTBS) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave, se hacen dos lavados con TTBS de 5 min cada uno y un lavado con TBS durante 5 min.
8. La membrana se incuba durante toda la noche con el primer anticuerpo, utilizando un anticuerpo específico para cada proteína, bien contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (dilución 1:10000), bien contra la proteína 14-3-3 (dilución 1:1000),

La dilución del anticuerpo se realiza con leche descremada al 2% en TTBS.

9. Al día siguiente la membrana se lava tres veces con TTBS (5 min por cada lavado) y una vez con TBS.
10. La membrana se incuba con el segundo anticuerpo. Se utilizaron dos diferentes anticuerpos secundarios:
 - a) Fosfatasa alcalina: 4 µL diluido en 10 mL de TTBS con leche descremada al 2%, a temperatura ambiente con agitación durante 2 h.
 - b) Peroxidasa: en una dilución 1:20000 en 10 mL de TTBS con leche descremada al 2% durante 30 min.
11. Se repite la secuencia de lavados indicados en el punto 11.
12. El revelado de las proteínas en las membranas se realizó por alguna de las dos siguientes técnicas:

a) Fosfatasa alcalina: la membrana se trata con solución reveladora (50 mL NBT, 50 ml BCIP, 10 mL amortiguador de carbonato) a temperatura ambiente en agitación constante hasta la aparición de la banda de interés.

b) Peroxidasa: de acuerdo a las instrucciones del paquete de luminiscencia Immobilon™ Wester, Cheminescent HRP Substrate, catálogo número WBKLS0050.

RESULTADOS

Se realizó la caracterización fenotípica en respuesta a bajas temperaturas mediante un reto de congelación a -15°C durante 80 min, tanto a plantas NA como AC wt y *mpk4*. Se realizó registro fotográfico previo al reto de congelación y en la primera y segunda semana de recuperación.

1. Fenotipos de sobrevivencia a la congelación

En la Figura 8 se observan los registros fotográficos de una muestra representativa de plantas adultas NA y AC tipo silvestre y mutante *mpk4* previamente a ser expuestas al reto de congelación. Las plantas wt y *mpk4* NA y AC presentaron el mismo tamaño y abundancia en hojas, pero las plantas wt AC presentaron mayor coloración morada comparado con *mpk4* AC. A una y dos semanas del reto de congelación, tanto las plantas wt como las *mpk4* NA tuvieron un porcentaje de sobrevivencia menor, de alrededor del 20%, comparada con las plantas AC de ambos genotipos, que tuvieron una sobrevivencia mayor al 90% (Figuras 8 y 9).



Figura 8. Fenotipos de las plantas wt y *mpk4* NA y AC sometidas y no sometidas a la aclimatación. Las plantas adultas fueron sometidas a los tratamientos de NA y AC como se describe en Materiales y Métodos. El número de plantas experimentales para 1 semana fue de wt NA n=24, wt AC n=20, *mpk4* NA n=44, *mpk4* AC n=28.

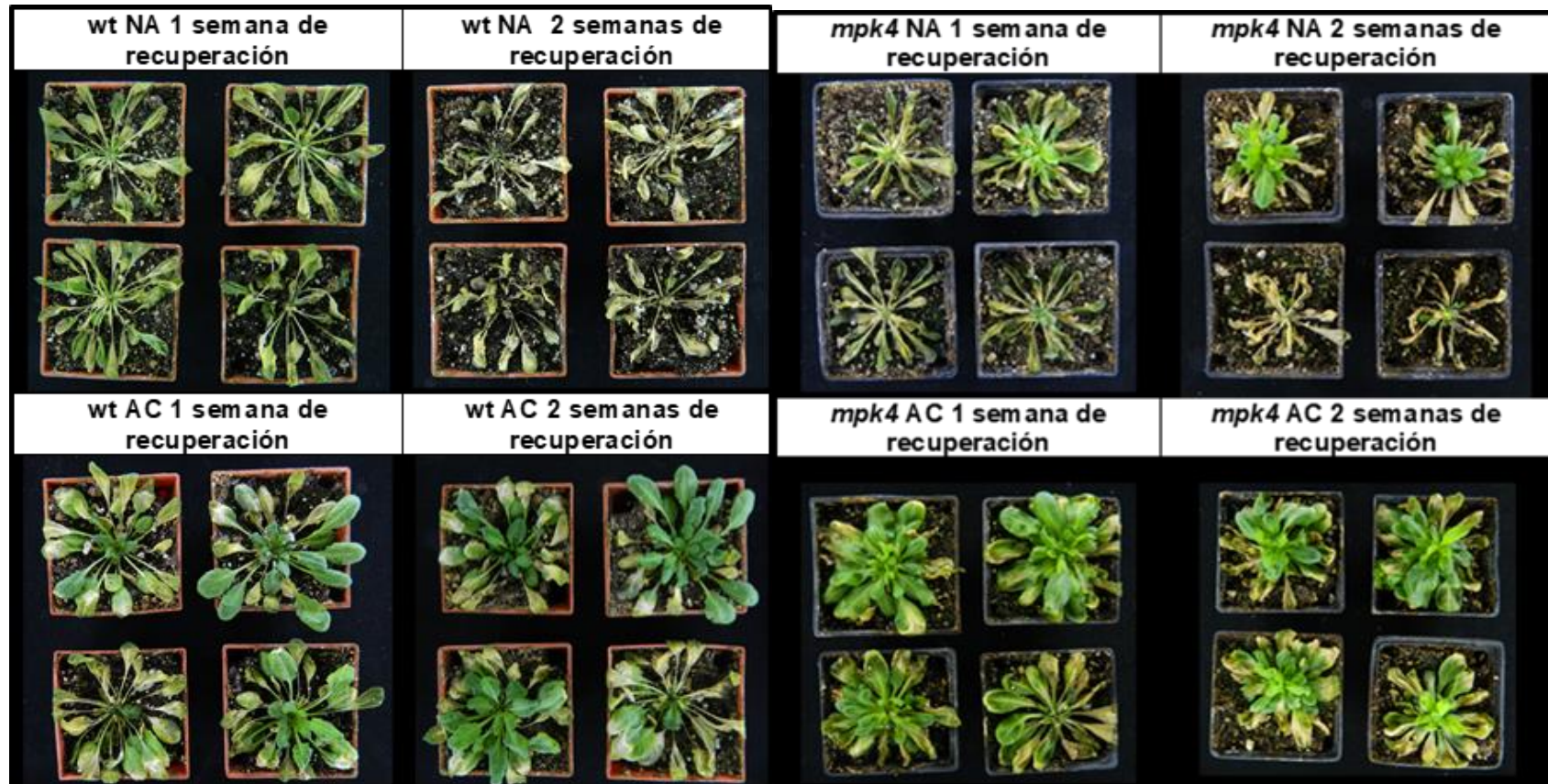


Figura 9. Fenotipos de sobrevivencia de las plantas de los genotipos wt y *mpk4* después de un reto de congelación. Las plantas NA y AC se expusieron a un reto de congelación a -15°C por 80 min y la sobrevivencia se determinó a una y dos semanas de recuperación después del reto. Para una semana wt NA n=16, wt AC n=12, *mpk4* NA n=32, *mpk4* AC n=16. Para dos semanas wt NA n=8, wt AC n=8, *mpk4* NA n=12, *mpk4* AC n=12.

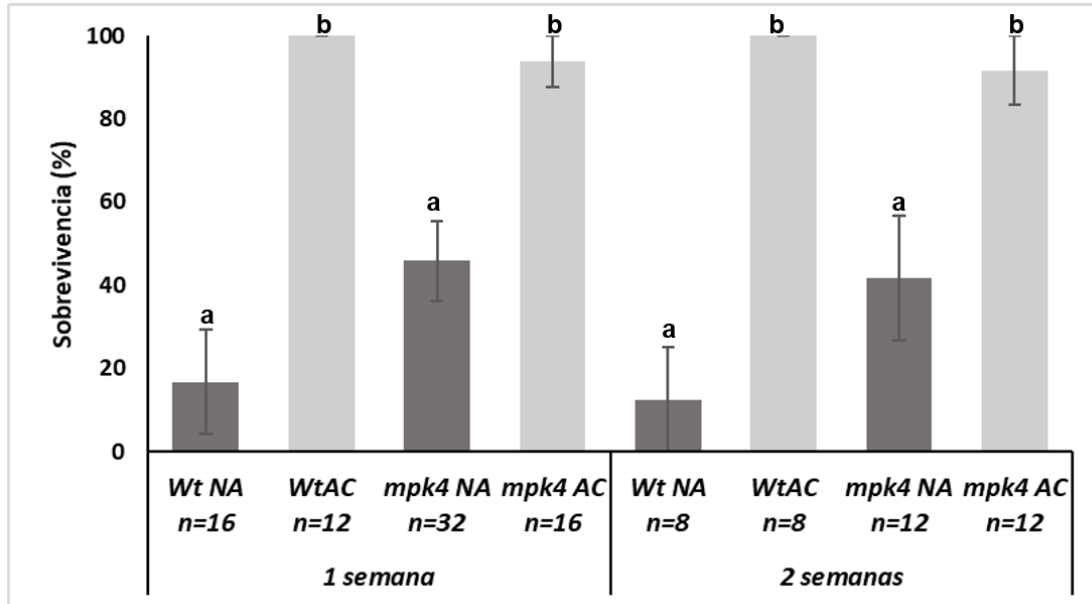


Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia de los genotipos wt y *mpk4* NA y AC después de una y dos semanas de un reto de congelación. El porcentaje de sobrevivencia se determinó a una y dos semanas después del reto. El número de plantas en cada condición experimental se indica debajo del genotipo y el tratamiento de aclimatación. Las líneas representan \pm ES. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por análisis de varianza, $\alpha=0.05$.

El grado de deterioro de las plantas sobrevivientes al reto después de una y dos semanas, se determinó para conocer la magnitud de su capacidad de recuperación. Se utilizó la escala presentada en la Figura 7 para calificar el deterioro. Las plantas wt y *mpk4* AC presentaron menor deterioro comparadas con las plantas que no fueron aclimatadas (NA) (Figura 11). El grado de deterioro en las plantas AC no fue uniforme en toda la planta, ya que las hojas más jóvenes del centro de la roseta desarrollaron mayor tolerancia a la congelación, respecto a las hojas más grandes que se colapsaron después del reto de congelación. Los resultados sugieren que para las plantas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre y mutantes *mpk4*, la aclimatación es importante para tolerar temperaturas congelantes y poder reanudar su crecimiento.

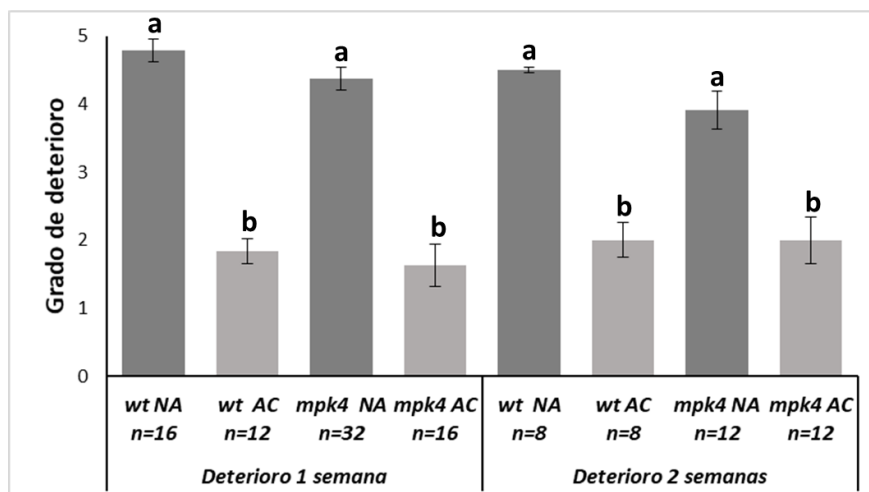


Figura 11. Grado de deterioro de los genotipos wt y *mpk4* después de un reto de congelación. El deterioro se determinó con la escala presentada en la Figura 7 a una y dos semanas de recuperación. El número de plantas en cada condición experimental se indica debajo del genotipo y el tratamiento de aclimatación. Las líneas representan \pm ES. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por análisis de varianza, $\alpha=0.05$.

2. Parámetros fotosintéticos

Se midió la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas NA y AC de los genotipos wt y *mpk4*. Para determinar las mediciones de fluorescencia las hojas se mantuvieron en la oscuridad por cinco minutos, luego se incidió un rayo de luz de alta intensidad permitiendo al aparato Handy PEA registrar la fluorescencia disipada por la hoja para generar los datos para construir las curvas denominadas OJIP (Apéndice 1), en las cuales está graficada la fluorescencia en función del tiempo de registro de su emisión. Los datos se analizaron con el programa PEA Plus V1.10, obteniéndose las curvas OJIP y las gráficas de radar con los parámetros de JIP que se analizaron estadísticamente en Excel (Figuras 12 y 13).

Como se observa en la gráfica de la Figura 12A, la fase de la fluorescencia máxima (F5) fue en donde se observó una mayor diferencia entre los tratamientos aplicados. Entre wt NA y wt AC no hubo diferencia significativa. En la mutante *mpk4*, la aclimatación disminuyó ligeramente pero significativamente en F5: de 1278 a 1197 u.a. (unidades arbitrarias). Las curvas OJIP presentan patrones de eficiencia

fotosintética en buen estado y son similares entre todos los tratamientos y genotipos.

Los parámetros que se presentan en las gráficas de radar (Figura 12B) corresponden a F1-F5 (la fluorescencia a diversos tiempos entre los 10^1 a 10^6 μ s), ABS/RC: describe la capacidad de absorción de los pigmentos antena por centro de reacción, DI0/RC: la disipación de calor a tiempo 0, TR0/RC: la captura de energía a tiempo 0 por centro de reacción, ET0/RC: indica el transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción, ψ (Eo): la eficiencia cuántica de la probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_{A-} , ϕ (Eo): probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_{A-} , δ (Ro): describe el transporte de los electrones desde el PSII hacia el PSI, PI abs: el índice de funcionamiento del fotosistema I. La mayoría de los parámetros fotosintéticos se vieron poco afectados con la aclimatación, tanto en las plantas wt como en las *mpk4*.

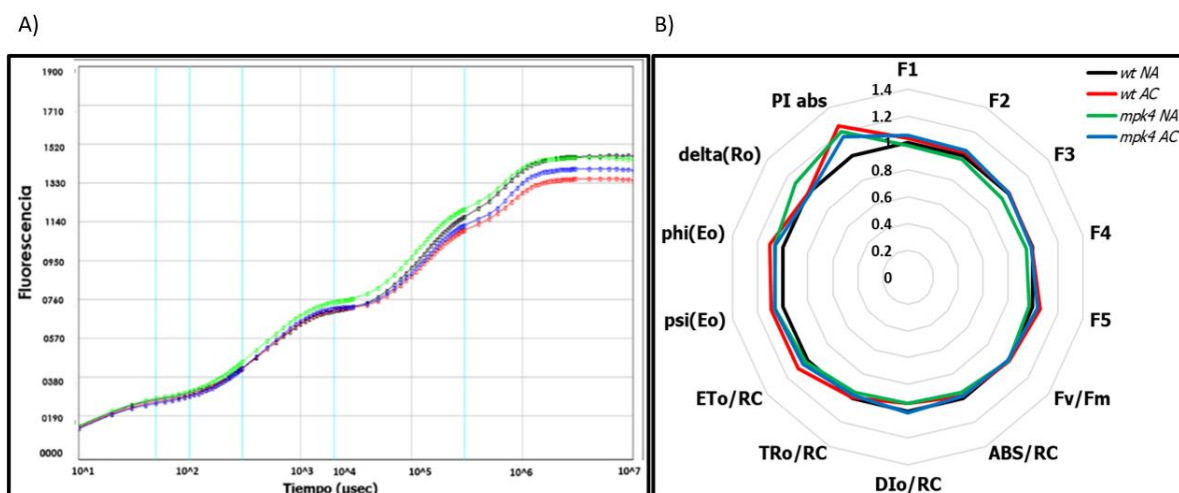


Figura 12. A) Curvas OJIP promedio. Se presentan las curvas OJIP de las plantas wt contra la mutante *mpk4* bajo los tratamientos NA y AC. B) Gráficas de radar con los valores promedio. En negro se muestran los valores de wt NA, en rojo wt AC, en verde *mpk4* NA y en azul *mpk4* AC. NA (n=24) y AC (n=24).

Particularmente, los parámetros ABS/RC, TR0 y ψ (Eo) no presentaron diferencias significativas entre genotipos y tratamientos.

Los valores de Fv/Fm para wt NA fueron cercanos a 0.822 y no hubo diferencia entre wt AC y *mpk4* NA. Sin embargo, hubo un aumento ligero pero significativo en

las plantas *mpk4* AC que alcanzaron el valor de 0.826 (Figura 13A). Los valores para los parámetros ET_0/RC fueron de alrededor de 0.80 en las plantas wt NA y las *mpk4* NA y AC. Sin embargo, las plantas wt AC tuvieron una disminución significativa con un valor de 0.76 (Figura 13 B). En el caso de D_{l_0}/RC , las plantas wt NA y AC no tuvieron diferencia significativa en un valor aproximado de 0.29; en *mpk4* la aclimatación aumentó ligeramente el valor de D_{l_0}/RC de 0.29 a 0.31 significativamente (Figura 13C). Delta (R_0) presenta valores aproximados de 0.4 sin diferencia significativa entre las plantas wt NA, wt AC y *mpk4* AC, pero sí hubo una disminución significativa en las plantas *mpk4* NA presentando un valor de 0.35 (Figura 13D). Para las plantas wt NA, los valores de P_i abs y de $\phi_i/ (E_0)$ con valores aproximados a 4.5 y 0.5, respectivamente, son significativamente mayores comparados con los de las plantas wt AC, *mpk4* NA y *mpk4* AC, en las que P_i abs presentó valores de 3.8 y $\phi_i/ (E_0)$ de 0.47 aproximadamente (Figuras 13 F y G). En la Figura 13 se muestran los resultados correspondientes al contenido total de clorofila. En las plantas wt, la aclimatación aumenta significativamente la clorofila total, mientras que en la mutante *mpk4* no hay diferencia significativa entre las plantas que no fueron aclimatadas y las que sí fueron sometidas al tratamiento.

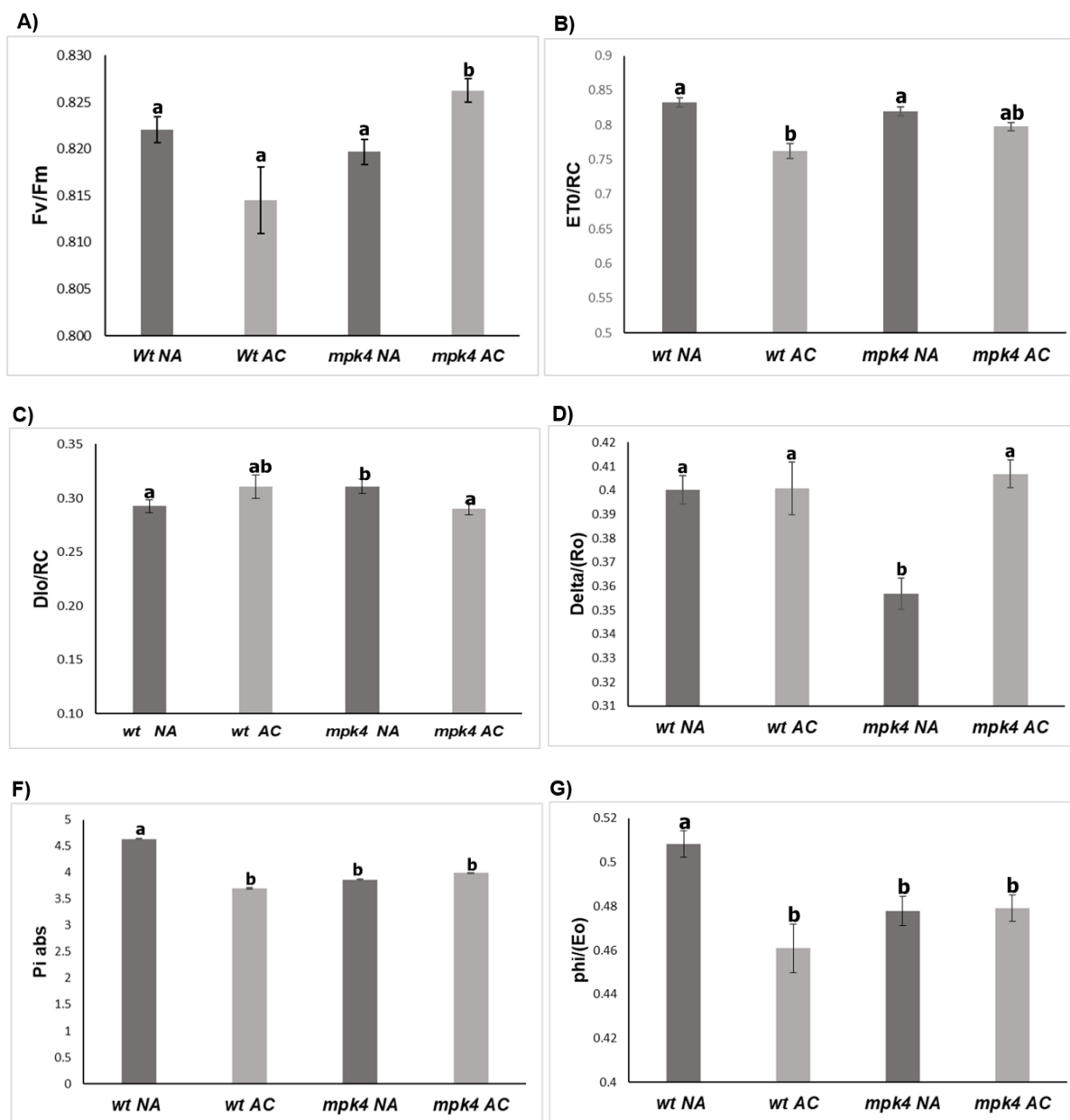


Figura 13. Parámetros de JIP determinados a partir de la fluorescencia de la clorofila a en plantas de *Arabidopsis*, wt y *mpk4*, NA y AC. A) Fv/Fm: eficiencia fotosintética B) ET0/RC: transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción, C) D10/RC: disipación de calor a tiempo 0 por centro de reacción, D) Delta/(Ro): transporte de los electrones desde el PSII hacia el PSI, E) phi/(Eo): probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A⁻. F) Pi abs: índice de funcionamiento del fotosistema. G) rendimiento fotoquímico del transporte de electrones. Se muestran promedios ±ES; las diferencias significativas, indicadas por diferentes letras entre las plantas NA y AC, se calcularon de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$, n=24.

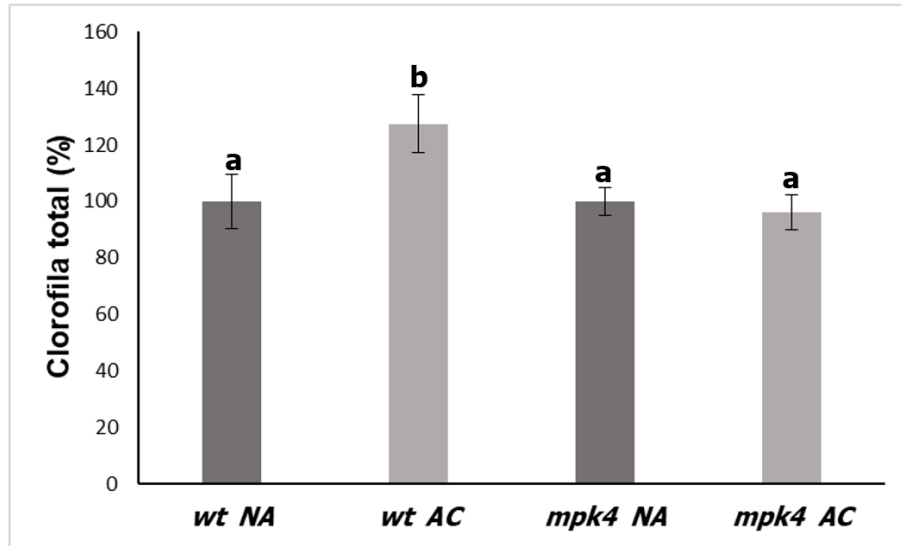


Figura 14. Contenido de clorofila de plantas de *Arabidopsis*, wt y *mpk4* NA y AC. La determinación del contenido de clorofila se realizó con el aparato Chlorophyll Content Meter (Hansatech Instruments), en hojas de plantas no aclimatadas (siempre permanecieron a 22°C) y plantas aclimatadas (1 semana a 4°C) según se refiere en Materiales y Métodos. Se muestran los valores promedio \pm ES de 3 experimentos independientes con una $n=24$; las diferencias significativas indicadas por diferentes letras entre las plantas NA y AC, se calculó de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$.

3. Ultraestructura del cloroplasto

Teniendo como antecedente que la pérdida de función de MPKs induce cambios en la ultraestructura de los cloroplastos (Liu et al. 2007; Saucedo-García et al. 2011), se evaluaron los cambios en el cloroplasto en plantas *mpk4* tras el tratamiento de aclimatación. El análisis de la ultraestructura se realizó por microscopía electrónica de transmisión (MET), obteniéndose las micrografías electrónicas de plantas wt NA y AC y *mpk4* NA y AC. En la Figura 15A las flechas amarillo claro señalan las características de los cloroplastos de plantas tipo silvestre no aclimatadas: los cloroplastos se observaron fusiformes y replegados hacia la membrana plasmática. Los tilacoides se encontraron apilados y aplanados formando los granas, así como los tilacoides lamelares con forma alargada interconectando a los diferentes granas. Se observaron gránulos grandes de almidón con variaciones en tamaño, número y ubicación a través del cloroplasto, el número aproximado de gránulos de almidón en wt NA fue de aproximadamente 2.73 ± 0.14 . También se observan algunos plastoglóbulos poco teñidos (Figura 15A y Tabla 3).

Las características de los cloroplastos de las plantas tipo silvestre que fueron aclimatadas se encuentran señaladas con flechas amarillo oscuro. Algunos cloroplastos permanecieron fusiformes, pero otros se tornaron entre irregular y circular. La mayoría de los tilacoides que forman los grana se conservaron bien organizados como se observó en las plantas wt NA. Respecto a los gránulos de almidón disminuyeron en tamaño y número respecto a las plantas wt NA, con un promedio de gránulos de almidón de 1.90 ± 0.15 . También se observó presencia de algunos plastóglóbulos poco teñidos (Figura 15B).

La mutante *mpk4* NA presentó cambios marcados en la ultraestructura del cloroplasto respecto a las plantas wt. Con flechas azules se señalan cloroplastos redondeados o de forma irregular, los cuales presentaron tilacoides acomodados en parches desorganizados. Los gránulos de almidón se encontraron en menor número y tamaño comparado con los de las plantas wt NA, con un promedio de 1.72 ± 0.20 y comparado con wt NA y AC, se presentaron plastóglóbulos en gran cantidad y bien teñidos (Figura 15C).

Por último, las características de los cloroplastos de la mutante *mpk4* AC se señalan con flechas color café. Algunos de los cloroplastos fueron fusiformes y otros redondeados. Se observan los granas bien organizados a lo largo del cloroplasto. Los gránulos de almidón fueron de menor tamaño comparados con los de las plantas wt NA, con un promedio de 1.42 ± 0.33 . También se observa presencia de plastóglóbulos, pero en menor cantidad y tamaño que en *mpk4* NA (Figura 15D). En la Tabla 3 se resume la información sobre las micrografías analizadas.

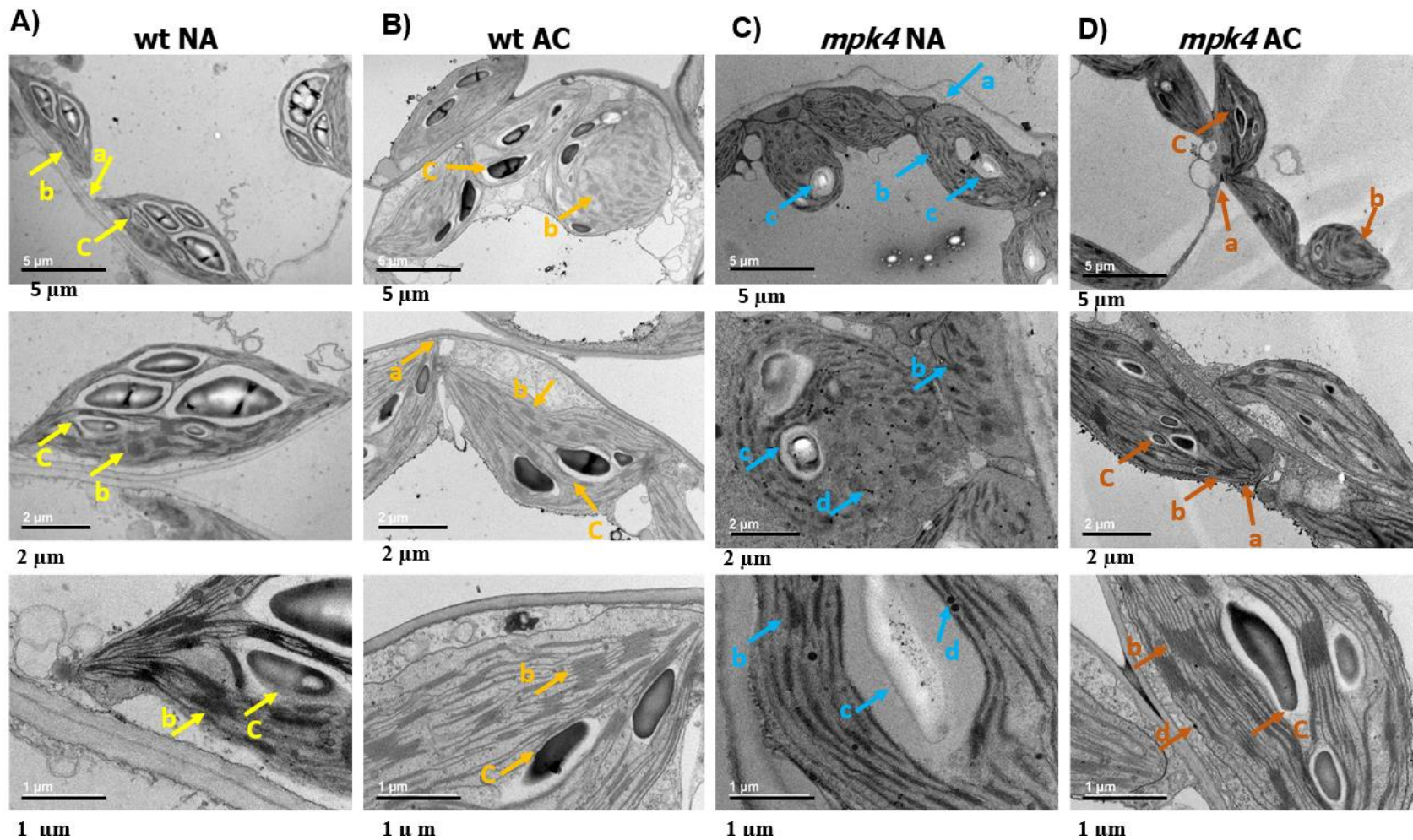


Figura 15. Ultraestructura de los cloroplastos de células de plantas wt NA y AC y *mpk4* NA y AC. Después de permanecer las plantas a 22°C (NA) o a 4°C durante una semana (AC) se tomaron muestras de las hojas para la obtención de las micrografías con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. A) wt NA B) wt AC C) *mpk4* NA d) *mpk4* AC. Para las plantas wt NA y AC se analizaron entre 2-3 réplicas biológicas cada una con 1-2 réplicas técnicas y para *mpk4* NA y AC se analizó una réplica biológica y 3 técnicas. Las flechas **a** señalan la unión a la membrana, **b** los grana, **c** gránulos de almidón y **d** plastoglobulos.

Tabla 3. Resumen del análisis de la ultraestructura de los cloroplastos de células de plantas wt NA y AC y *mpk4* NA y AC, mostrados en la Figura 15.

Genotipo	Tratamiento	Morfología fusiforme de los cloroplastos	Tilacoides bien organizados	Morfología alargada de los gránulos de almidón	Número de gránulos de almidón por cloroplasto \pm ES	Presencia de plastoglóbulos
wt	NA	✓	✓	✓	2.73 \pm 0.04	✓
wt	AC		✓	✓	1.90 \pm 0.15	✓
<i>mpk4</i>	NA				1.72 \pm 0.20	✓
<i>mpk4</i>	AC	✓	✓		1.55 \pm 0.33	✓

4. Evaluación de la integridad del tejido de las hojas

Se evaluó la integridad del tejido de las hojas mediante la técnica de pérdida de electrolitos de los genotipos wt y *mpk4* después del reto de congelación en las plantas NA y AC (Figura 16). Primero se realizó una cinética de pérdida de solutos para evaluar la integridad membranal, haciendo registro de la conductividad del medio (agua) durante 240 min, en el que sumergieron hojas de plantas de los diferentes fenotipos (wt y *mpk4*) y tratamientos. De estas cinéticas destaca que en las plantas wt NA y AC, la pérdida de solutos fue más lenta desde los primeros minutos y no llegaron a la pérdida total, mientras que en las plantas de la línea *mpk4*, la pérdida de solutos fue muy rápida y se llegó la desintegración del tejido de las hojas.

La pérdida de electrolitos después de 90 min de agitación constante, en las muestras de wt NA fue de alrededor del 70% y en las hojas de las plantas wt AC, del 60%. Para *mpk4*, tanto NA como AC hubo una pérdida del 85% (Figura 16). Estos resultados sugieren que la planta tipo silvestre tiene una mejor integridad membranal con que la de *mpk4* en ambos tratamientos y que la aclimatación mejora ligera, pero significativamente, la integridad membranal de las plantas tipo silvestre, pero no la de la mutante *mpk4*.

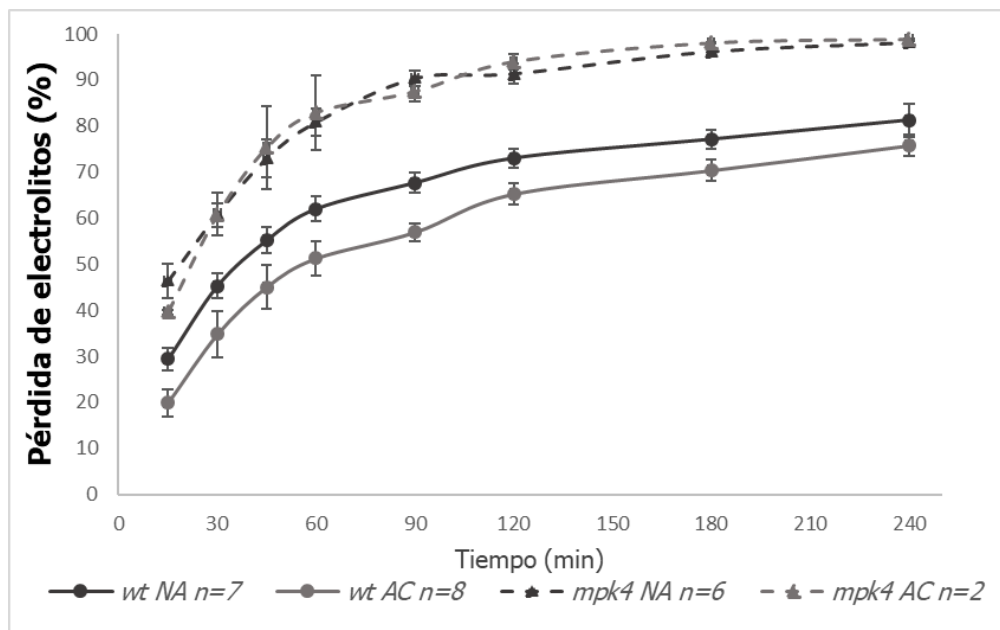


Figura 16. Curvas promedio del porcentaje de solutos liberados de plantas wt y *mpk4* NA o AC. Curvas de liberación de solutos después de 15, 30, 45, 60, 90, 180 y 240 min del reto de congelación a -15°C durante 80 min. Se muestran los promedios de conductividad \pm ES.

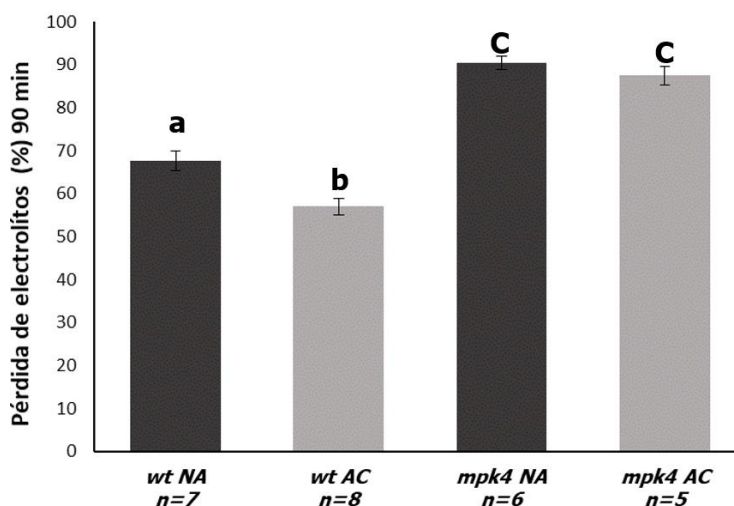


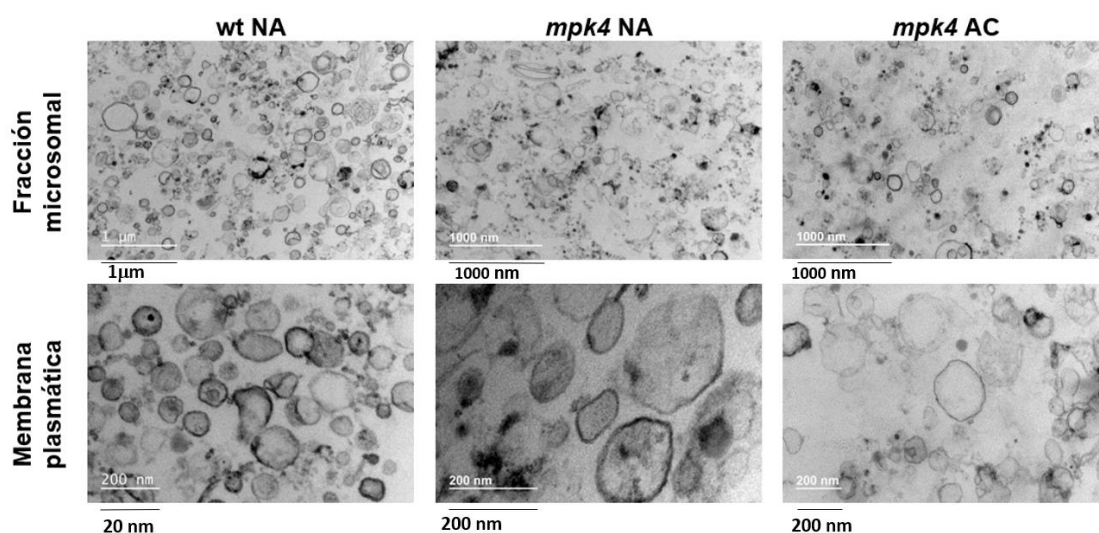
Figura 16. Pérdida de electrolitos de las hojas de las plantas de los genotipos wt y *mpk4* (NA y AC) después del reto de congelación. La conductividad se determinó al cabo de 90 min en hojas de las plantas expuestas al reto de congelación. wt NA n=7, wt AC n=8, *mpk4* NA n=4 y *mpk4* AC n=5. Se presentan los valores promedio \pm ES; las diferencias significativas indicadas por diferentes letras se calcularon de acuerdo con un valor de $\alpha=0.05$.

5. Pureza de las vesículas membranales

Para verificar el enriquecimiento de las vesículas membranales que se utilizaron para los ensayos de la actividad de la ATPasa de H^+ , se determinó su ultraestructura

mediante microscopía electrónica de transmisión. En las micrografías de las diferentes fracciones microsomales de los genotipos estudiados, se observan abundantes vesículas membranales con material electrodens y amorfo. Mientras que, en la fracción correspondiente a las vesículas de membrana plasmática, se observa menor cantidad de material electrodens, que puede corresponder a restos membranales de mitocondria, retículo endoplásmico u otros organelos (Figura 18). Los tamaños de las vesículas de wt NA y *mpk4* NA y AC son de alrededor de 100-200 nm con forma homogénea. Estos resultados indican que las vesículas de membrana plasmática utilizadas para los ensayos de hidrólisis de ATP y parámetros cinéticos tienen un enriquecimiento adecuado.

Figura 18. Imágenes obtenidas por MET de la fracción microsomal y de las vesículas de membrana plasmática de plantas wt NA y *mpk4* NA y AC. Las micrografías se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos.



6. Caracterización de la actividad de la ATPasa de H⁺

Para determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática de plantas wt y *mpk4* NA y AC, se utilizó un método en el cual se inhibieron a las enzimas que pudieran encontrarse en las membranas y liberar Pi, en donde se agregó al medio Na₃VO₄, como un inhibidor de la actividad de ATPasa de H⁺ la membrana plasmática. La Figura 19 muestra la actividad de la ATPasa de H⁺ expresada como nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹; el valor de la actividad de las muestras wt NA es de alrededor de 130 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ con ambos métodos. En las plantas wt, la aclimatación disminuyó significativamente estos valores de actividad en un 40-50%.

Para el caso de la mutante *mpk4*, las muestras NA presentaron una actividad de alrededor de 90 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, que con la aclimatación aumentó aproximadamente un 30%, alcanzando niveles similares a los de la planta wt NA (Figura 19).

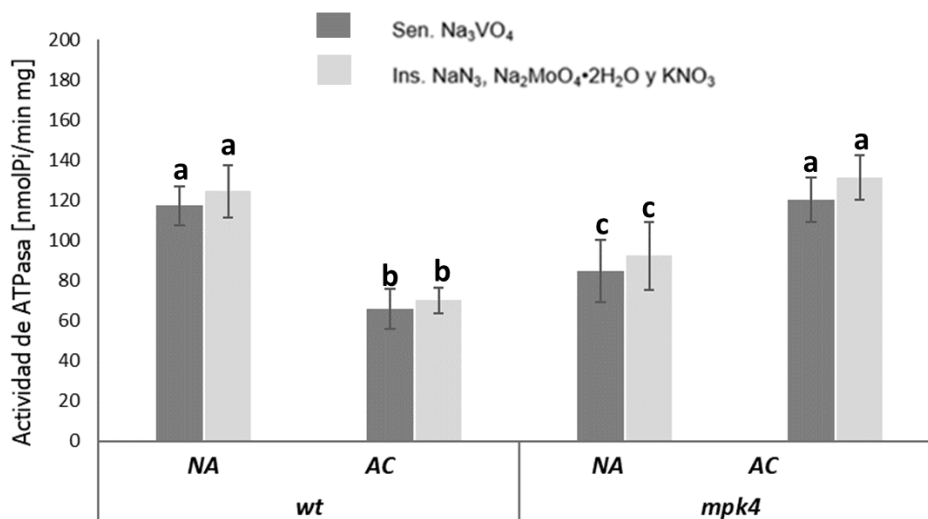


Figura 19. Actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas wt y *mpk4* NA y AC. Se midió la actividad de la ATPasa de H⁺ mediante la determinación de Pi inorgánico derivado de la hidrólisis de ATP. Se usaron dos condiciones diferentes para determinar la actividad. En la primera condición la actividad se midió como la hidrólisis de ATP sensible a vanadato (Na₃VO₄); en la segunda la actividad se midió como la hidrólisis de ATP insensible a una mezcla de inhibidores (NaN₃, Na₂MoO₄·2H₂O y KNO₃) de otras actividades liberadoras de Pi. wt NA n=10, wt AC n=8, *mpk4* NA n=6, *mpk4* AC n=10. Las n corresponden a 1 réplica técnica cada una con 3 réplicas biológicas. Se muestran los promedios ±ES. Las diferencias significativas indicadas por diferentes letras se calcularon de acuerdo con un valor de α=0.05.

7. Cinética de la hidrólisis de ATP

Con el fin de evaluar las variaciones de los parámetros cinéticos de la ATPasa de H⁺ en los diferentes genotipos y tratamientos, se determinó la actividad de la ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato. La Figura 20 muestra las curvas del comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de ATP llevada a cabo por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en los genotipos wt y *mpk4* NA y AC. Los datos obtenidos se sometieron al ajuste de la ecuación descrita por Michaelis-Menten (Michaelis y Menten, 1913). Los datos obtenidos de las plantas wt corroboraron resultados previos del laboratorio sobre el comportamiento Michaeliano de esta enzima (González-Reyes 2010 y Ponce-Pineda 2016). Para

verificar y asegurar que la enzima no presenta cooperatividad, también se realizó un ajuste con la ecuación de Hill (Hill 1910). Estos resultados concordaron con las constantes catalíticas calculadas con la ecuación de Michaelis-Menten en wt NA y AC, pues se obtuvieron números de Hill (n) con valor de 1, lo cual indica que la enzima no presenta cooperatividad. Tomando en cuenta este resultado, los datos se sometieron al ajuste de diversas ecuaciones con el programa SigmaPlot tratando de encontrar una ecuación a la que los datos cinéticos se ajustaran mejor. Los resultados fueron iguales a los calculados con la ecuación de Michaelis-Menten (Tabla 4).

Tabla 4. Constantes catalíticas de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Ajuste	Parámetro cinético	wt NA	wt AC	<i>mpk4</i> NA	<i>mpk4</i> AC
Michaelis-Menten	V _{max} (nmol Pi mg ⁻¹ min ⁻¹)	164.66± 21.13	88.± 3.69	149.95±27.43	159.88±20.45
	K _m (mM)	1.91±0.45	1.78±0.20	1.57±0.28	0.92±0.18
	V _{max} /K _s (s ⁻¹)	1.96x10 ³ ±563	0.86x10 ³ ±66.51	1.63x10 ³ ±247	3.748x10 ³ ±1061
Hill	V _{max} (nmol Pi mg ⁻¹ min ⁻¹)	176.72±25.67	115.85±19.41	183.37±47.33	188.83±17.34
	K' (mM)	1.66±0.36	2.74± 0.71	1.93±0.51	1.38±0.24
	n	1.20±0.22	0.926± 0.25	1.17±0.21	0.86±0.17
	V _{max} /K' (s ⁻¹)	2.14x10 ³ ±573	0.787x10 ³ ±87	1.70x10 ³ ±289	2.66x10 ³ ±490

Los genotipos estudiados fueron wt y *mpk4* en tratamientos de NA y AC. Las constantes se calcularon con los valores de las gráficas del comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de las plantas de los genotipos wt y *mpk4* y se ajustaron a las ecuaciones de Michaelis-Menten y Hill con el programa Origin 6.0 Data Analysis and Graphing Software®. Se presentan los promedios ± ES.

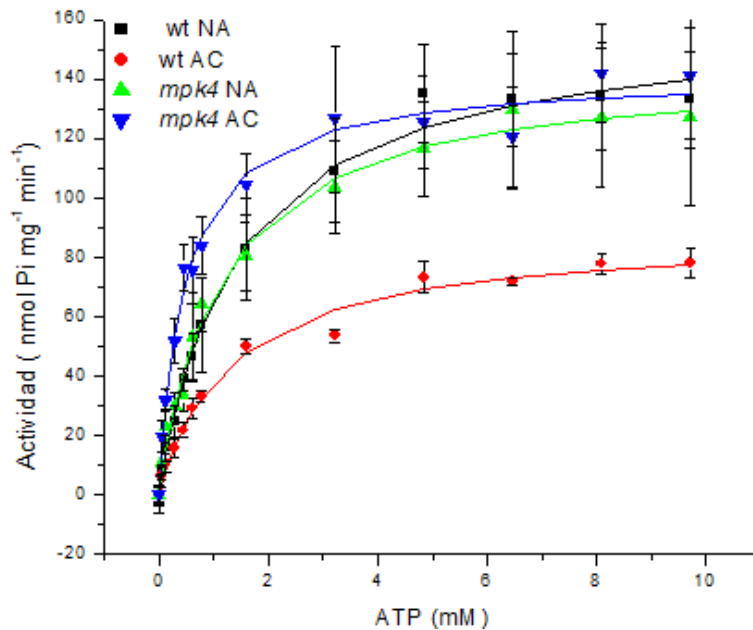


Figura 20. Comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de las plantas de los genotipos wt y *mpk4* en tratamientos de NA y AC. Las determinaciones fueron sometidas a dos tipos de ajustes: hiperbólico (modelo de Michaelis-Menten) y ajuste sigmoideal (Modelo de Hill). Se determinó la actividad de ATPasa a las concentraciones de sustrato indicadas, por un tiempo de 20 min y a una temperatura de 29°C. Los ajustes se realizaron con el programa Origin 5.0 Data Analysis and Graphing Software®. La línea negra corresponde a wt NA, roja a wt AC, azul a *mpk4* NA y roja a *mpk4* AC. wt NA n=6, wt AC n=6, *mpk4* NA n=4, *mpk4* AC n=6. Las n corresponden a las réplicas biológicas cada una con 2-3 réplicas técnicas. Se muestran los promedios ±ES.

8. Determinación de los niveles de ATPasa de H⁺ en las vesículas de membrana plasmática de las líneas wt y *mpk4*

Ya que se había determinado que la actividad de la ATPasa de H⁺ se modifica por el proceso de aclimatación, se realizó la detección de la enzima por inmunoréplica para saber si los cambios en la actividad estaban asociados a cambios en la cantidad de enzima. Para este experimento se utilizaron preparaciones de vesículas de membrana plasmática extraídas de plantas wt y *mpk4* NA y AC. Primero las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS que se sometieron a tinción con azul de Coomassie previamente a la inmunodetección de la ATPasa de H⁺ y de la proteína 14-3-3.

Con el fin de corroborar que la cantidad de proteína incluida en los geles fue homogénea (10 µg) y asegurar que las diferencias encontradas se asocian a los

diferentes tratamientos y condiciones estudiadas, se realizó la tinción de los geles con azul de Coomassie. Las Figuras 21 A y 21 B presentan los geles de referencia teñidos con azul de Coomassie de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de las plantas wt NA y AC y *mpk4* NA y AC, respectivamente. En ambos casos resultó evidente que hubo diferencias en la cantidad de proteína incluida en cada gel y carril gel. Para corregir este error, se eligió la banda marcada con un asterisco, cuya intensidad cambió proporcionalmente a la cantidad de proteína total cargada en los carriles, para hacer una corrección en el posterior análisis densitométrico.

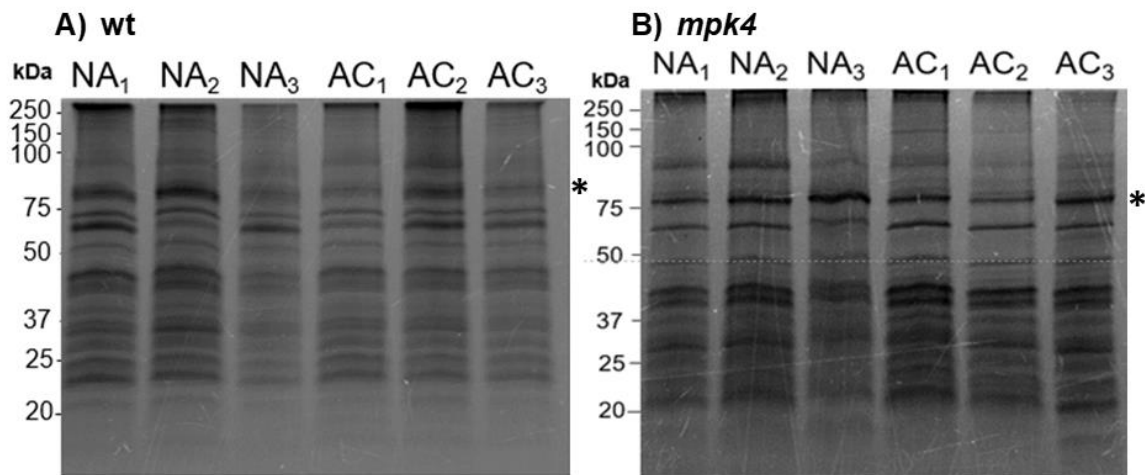


Figura 21. Control de carga de tres diferentes preparaciones de vesículas de membrana plasmática extraídas de las plantas de los genotipos y en las condiciones indicadas. Se cargaron 10 μg de proteína en cada uno de los carriles y se realizó una separación electroforética en un gel de poliacrilamida SDS. A) Muestra las preparaciones de plantas wt NA (1-3) y AC (1-3). B) Muestra preparaciones de las plantas *mpk4* NA (1-3) y AC (1-3). Los números corresponden a preparaciones membranales independientes. De lado izquierdo se muestran las masas moleculares de las bandas y con un (*) se señala la banda elegida para hacer la corrección para el análisis densitométrico de las bandas en la inmunoréplica.

La Figura 22 presenta dos inmunoréplicas de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática, 22A para plantas del genotipo wt NA y AC y 22B para plantas de la línea *mpk4* NA y AC. Se cortaron las dos membranas para exponerlas a los anticuerpos contra la ATPasa de H^+ y 14-3-3, el corte se señala en la Figura 22 con una línea negra. En ambas membranas se detectó una banda de 100 kDa que corresponde al peso molecular reportado de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Además, se revelaron dos bandas, de entre 30 y 37 kDa, que

corresponden al valor aproximado del peso molecular distintas isoformas de proteínas 14-3-3.

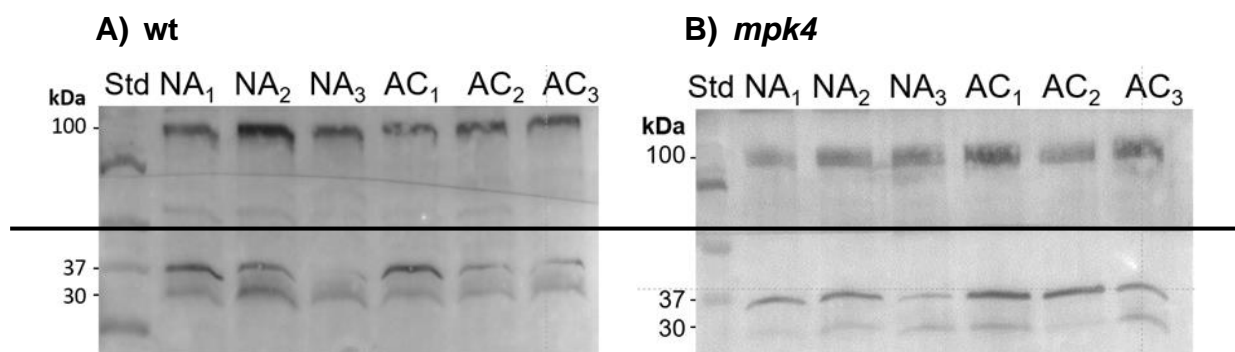
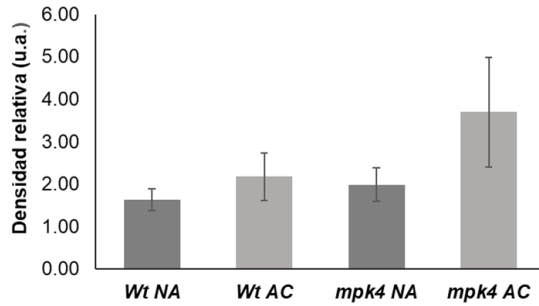


Figura 22. Estimación de los niveles de ATPasa de H⁺ y de la proteína 14-3-3 en preparaciones de vesículas de membrana plasmática extraídas de los genotipos y condiciones indicadas. A) Preparaciones de plantas wt NA (1-3) y AC (1-3). B) Preparaciones de plantas *mpk4* NA (1-3) y AC (1-3). Los números indican preparaciones membranales independientes. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida SDS y transferidas a membranas de PVDF. La inmunodetección de la ATPasa de H⁺ y de la 14-3-3 se cortó la membrana y se realizó usando anticuerpos policlonales de *Agrisera*®. La banda de 100 KDa corresponde a la ATPasa de H⁺ y las de 30 y 37 KDa a dos isoformas de la proteína 14-3-3. Este experimento es representativo de 8 inmunoréplicas realizadas con 4 preparaciones de muestras biológicas independientes de cada condición.

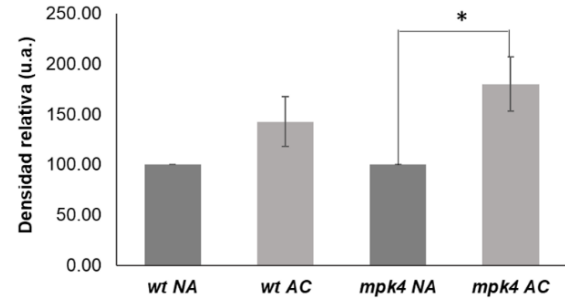
Para cuantificar las diferencias en la intensidad de las bandas y así establecer la cantidad de enzima en las distintas condiciones, se realizó un análisis densitométrico sobre 8 inmunoréplicas realizadas con 4 muestras biológicas, apéndice 3, (Figura 23). En la gráfica de la Figura 23A se observa que no hubo diferencias significativas en la cantidad de ATPasa de H⁺ en valores absolutos entre los genotipos wt y *mpk4* y los tratamientos NA y AC. Sin embargo, en la gráfica de la Figura 23 B, donde se normalizaron los valores AC respecto a su control NA, se observa que mientras wt no presentó diferencias en la cantidad de enzima entre estas condiciones, la línea mutante *mpk4* sí presentó un aumento significativo de la cantidad de enzima en la aclimatación. Este resultado podría explicar el aumento de actividad de la ATPasa de H⁺ *mpk4* en condiciones de AC.

Debido a que las proteínas 14-3-3 regulan positivamente la actividad de la ATPasa de H⁺ (Deninson *et al.* 2011), su nivel de acumulación es otro factor que podría estar

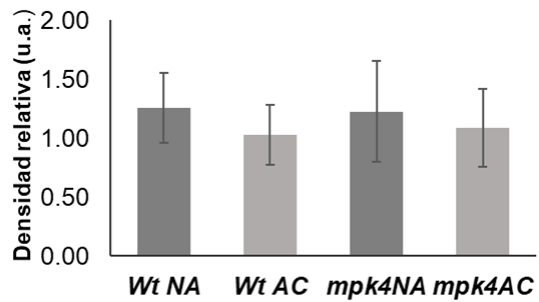
afectando la actividad de la ATPasa de H⁺ en las condiciones estudiadas. Por esta razón, se determinaron los niveles de la proteína 14-3-3 mediante un análisis densitométrico (Figura 23). En las gráficas de las Figuras 23 C y 23 D se observa que la banda de 30 kDa no presentó diferencias significativas entre genotipos y tratamientos, tanto en valores normalizados respecto a coomasie como en normalizados contra el control NA. Por su parte, la banda de 37 kDa correspondiente a valores normalizados respecto a coomasie, no presentó diferencias significativas entre genotipos, ni entre tratamientos (Figura 23E), mientras que en valores normalizados respecto al control NA los niveles de la proteína 14-3-3 de 37 kDa fue significativamente mayor en *mpk4* AC (Figura 23F). Este último resultado, indica que los niveles de esta proteína también podrían estar contribuyendo al aumento de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la mutante *mpk4* a consecuencia de la aclimatación.



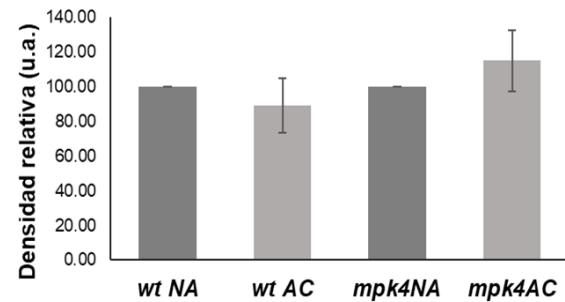
A) ATPasa de H⁺, valores normalizados respecto a Coomassie



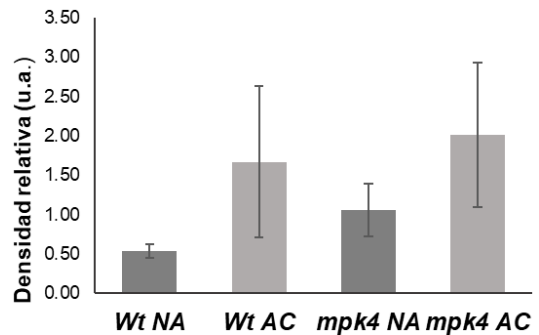
B) ATPasa de H⁺, valores normalizados respecto al tratamiento de NA



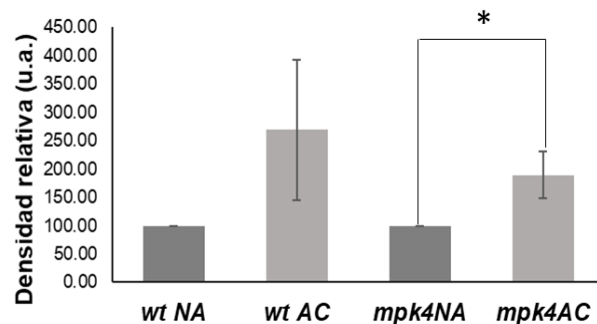
C) 14-3-3, banda de 30 kDa valores normalizados respecto a Coomassie



D) 14-3-3, banda de 30 kDa valores normalizados respecto al tratamiento de NA



E) 14-3-3, banda de 37 kDa valores normalizados respecto a Coomassie



F) 14-3-3, banda de 37 kDa valores normalizados respecto al tratamiento de NA

Figura 23. Niveles comparativos de la ATPasa de H⁺ y de la proteína 14-3-3 en preparaciones de membrana plasmática de las líneas y tratamientos indicados. Las membranas de las inmunoréplicas como las que se muestra en la Figura 22 se escanearon y las bandas de 100, 30 y 37 kDa se sometieron a un análisis densitométrico mediante el programa ImageJ (imagej.nih.gov). A) Niveles comparativos de la ATPasa de H⁺ en valores no normalizados. B) Niveles comparativos de la ATPasa de H⁺ normalizados contra las de las condiciones de NA C) Niveles comparativos de 14-3-3 de 30 kDa en valores no normalizados. D) Niveles comparativos de 14-3-3 de 30 kDa normalizados contra las de las condiciones NA. E) Niveles comparativos de 14-3-3 de 37 kDa en valores no normalizados. F) Niveles comparativos de 14-3-3 de 37 kDa normalizados contra las de las condiciones NA. Se muestra promedios ± ES y la diferencia significativa (*) con una $P \leq 0.05$.

9. Actividad de la ATPasa de H⁺ en presencia de DMSO

Furuya *et al.* 2014, reportaron que la MPK4 se activaba en plántulas de *Arabidopsis* de 2 semanas de edad en condiciones de bajas temperaturas (4°C durante 30 min) y también en presencia de DMSO, usado como agente rigidizante de las membranas. Con este antecedente y ya que una de las causas posibles de los cambios en la actividad de la ATPasa de H⁺ podría ser la rigidez membranal, que puede variar en condiciones de NA y de AC, se decidió determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ después de tratar las preparaciones de vesículas de membrana plasmática con DMSO como rigidizante. En la Figura 24 se presenta la actividad de la ATPasa de H⁺, de vesículas membranales tratadas con y sin DMSO. En estas condiciones, la actividad de la ATPasa de H⁺ en wt fue de alrededor de 100 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, la cual disminuyó a 60 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ con la aclimatación. Para la mutante *mpk4* la actividad en el tratamiento de NA fué de alrededor de 100 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, la cual aumento significativamente con la AC. Los resultados obtenidos son muy similares con y sin DMSO, y similares a los de las determinaciones previas en las que la actividad de la ATPasa disminuyó con la aclimatación en el genotipo tipo silvestre y aumentó ligeramente en la mutante *mpk4* AC comparada con la condición de NA. De tal manera, este resultado sugiere que la rigidez de la membrana parece no afectar la actividad de la ATPasa de H⁺, ni en plantas tipo silvestre, ni en la mutante *mpk4*.

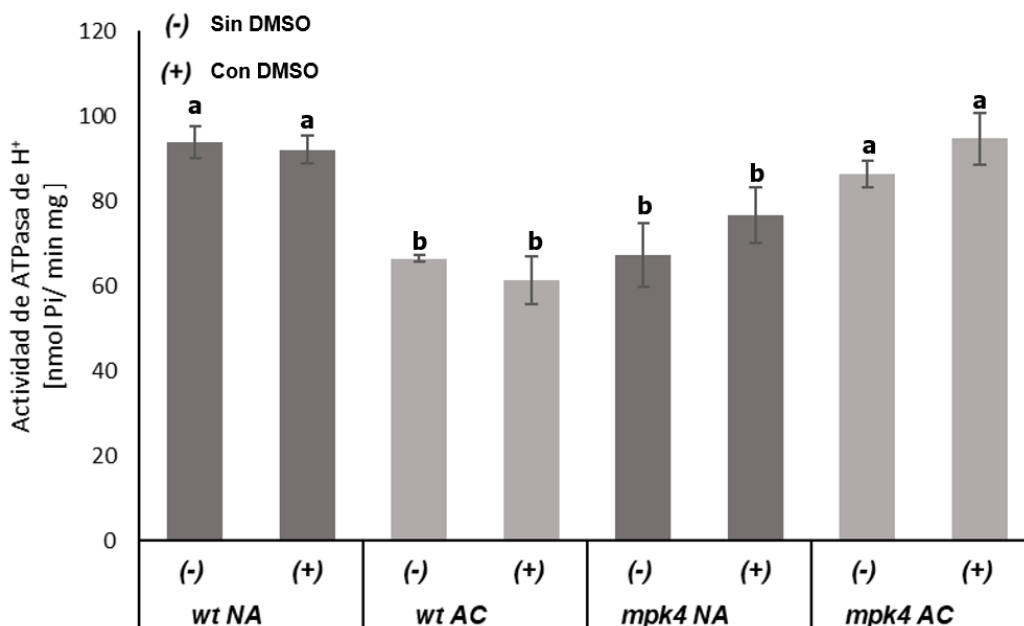


Figura 24. Actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas wt y *mpk4* NA y AC en presencia de DMSO. La actividad se midió mediante la determinación de Pi inorgánico derivado de la hidrólisis de ATP insensible a una mezcla de inhibidores (NaN₃, Na₂MoO₄•2H₂O y KNO₃) de otras actividades liberadoras de Pi. El experimento se realizó en vesículas de membrana plasmática de plantas de los genotipos y en las condiciones indicadas. Las membranas se incubaron 30 min con DMSO antes de iniciar la reacción. wt NA n=9, wt AC n=4, *mpk4* NA n=2, *mpk4* AC n=3. Las n corresponden a 1 réplica biológica cada una con 3 réplicas técnicas. Se muestran los promedios ± ES. Las diferencias significativas indicadas con letras entre las plantas NA y AC se calcularon de acuerdo con un valor de α=0.05.

DISCUSIÓN

La mayoría de las plantas que son capaces de tolerar la congelación adquieren esta habilidad a través de la aclimatación al frío, la cual se produce por la exposición a bajas temperaturas por encima de los 0°C. Este es el caso de *Arabidopsis*, especie en la que el proceso de aclimatación al frío ha sido investigado ampliamente. *A. thaliana* se ha extendido por el hemisferio norte desde los tiempos posglaciales. En las zonas continentales frías, sus poblaciones son capaces de aclimatarse en respuesta al frío persistente u oscilante (Liu *et al.* 2019; Zuther *et al.* 2018).

La capacidad de aclimatación y tolerancia al frío que presentan las plantas se basa en la percepción y la transducción de señales en sus células. Se ha documentado que el estrés por frío conduce inicialmente a la rigidificación de la membrana

plasmática y el reordenamiento del citoesqueleto, lo que conduce a una afluencia de calcio al citosol a través de canales. Este mecanismo ha sido ampliamente reconocido en *Arabidopsis*, en donde se sabe que una señal de calcio es decodificada por proteínas de unión a calcio, como CRPK1 y CRLK1/2 que han sido implicadas en la detección de señales de frío quienes por fosforilación regulan a los CBFs mediante la modulación de cascadas de MAPKs (Guo *et al.* 2018).

1. Efecto de la aclimatación en plantas con pérdida de función de MPK4

Efecto en la tolerancia a la congelación y en la capacidad de recuperación. Los resultados sobre el reto de congelación al que se sometieron plantas de la línea wt mostraron que, mediante la aclimatación al frío, las plantas de *A. thaliana* mejoran su capacidad de sobrevivencia ante temperaturas congelantes, ya que las plantas que fueron aclimatadas tuvieron una sobrevivencia mayor comparado con la de las plantas NA. Este resultado coincide con lo reportado previamente en el laboratorio por Cano-Ramírez (2014) y Ponce-Pineda (2016).

El patrón de sobrevivencia presentado por las plantas *mpk4* fue del 100%, similar al de las plantas wt, por lo que la aclimatación permitió a las mutante *mpk4* aclimatada sobrevivir exitosamente al reto de congelación. Este resultado indica que la ausencia de MPK4 no es relevante para que la planta lograra aclimatarse, es decir, que la MPK4 es dispensable para el proceso de aclimatación de las plantas tipo silvestre.

La capacidad de tolerancia a la congelación de las plantas tipo silvestre y *mpk4* aclimatadas también se vio reflejada en el grado de deterioro sufrido tras el reto, lo cual implica su capacidad de recuperación una vez que la temperatura se torna óptima. Las plantas wt y *mpk4* aclimatadas reasumieron con mayor vigor la continuación de su desarrollo. Contrariamente, las plantas *mpk4* no aclimatadas que lograron sobrevivir (40%), presentaron menor turgencia y mayor deterioro después del reto de congelación. Se ha reportado que los daños por congelación son atribuibles a la formación inicial de hielo en los espacios extracelulares, así como a la alteración de la fisiología general y la función de las proteínas a bajas temperaturas. Las dos fuentes principales de daño por congelación resultan de la deshidratación celular y las lesiones en las membranas. Cuando se forma hielo en

el compartimento intercelular, la reducción del potencial hídrico hace que el agua no congelada se mueva desde el citoplasma al espacio intercelular. Las consecuencias inmediatas son similares a las de la sequía, como la reducción de la cantidad de agua disponible para los procesos celulares (Knigh y Knigh 2012).

Los resultados obtenidos sobre la capacidad de tolerancia a la congelación de las plantas wt y mutante *mpk4* no coinciden con los reportados por Zhao *et al.* en 2017, ya que, sobre el ensayo de sobrevivencia a la congelación, ellos reportan un porcentaje de sobrevivencia de alrededor del 50% para wt AC y para *mpk4* AC un porcentaje aproximado al 20%. Ambos menores a los porcentajes obtenidos en este trabajo, donde la sobrevivencia para ambos genotipos AC fueron de alrededor del 90%. Esta discrepancia en los resultados puede deberse a distintos factores relacionados con la edad de las plantas, fotoperiodo, el tiempo y temperatura de aclimatación y el tiempo y temperatura del reto de congelación.

Los experimentos de Zhao *et al.* en plántulas de 10 días de edad, la aclimatación se realizó a 4°C durante una semana y el reto de congelación se realizó a -7°C durante una hora (Zhao *et al.* 2017). Mientras que las condiciones estandarizadas en el laboratorio consistieron de plantas adultas de entre 3-4 meses de edad, aclimatación de una semana a 4°C y un reto de congelación de -15°C por 120 min. En un experimento previo en el laboratorio para determinar el tiempo necesario para aclimatación de plántulas de *A. thaliana*, se probaron plántulas de 14 días de edad, sometidas a 1, 2 y 3 semanas de aclimatación a 4°C y exposición a congelación por 1, 2 y 3 h (Gutiérrez-Angoa, 2016). Con estos tratamientos plántulas de 3 diferentes edades fueron expuestas a congelación, observándose que las plántulas AC por una semana y sometidas por 1, 2 y 3 h al reto, a la semana de recuperación no presentaron grandes diferencias en su fenotipo respecto a su control NA. Las plántulas AC por dos semanas presentaron mayor daño por congelación que las plántulas NA de la misma edad y, por último, las plantas que se sometieron a aclimatación por 3 semanas, no sufrieron daños por congelación, en tanto que las NA mostraron daño a las 3 h de exposición a -15°C (Gutiérrez-Angoa 2016). Estos resultados indican que sólo las plantas de alrededor de 5 semanas de edad son capaces de desarrollar una aclimatación exitosa y que la tolerancia a la aclimatación

varía con respecto a la edad de la planta y el tiempo y temperatura de aclimatación y reto. Por otro lado, se han reportado experimentos para determinar la tolerancia al frío en las etapas de germinación y crecimiento vegetativo en arroz, no encontrándose correlaciones significativas entre estas dos etapas de desarrollo, respecto a la tolerancia a la aclimatación. Esto indica que se debe ser cuidadoso al estimar la tolerancia a la congelación en una etapa de desarrollo dada, ya que la sensibilidad al frío cambia durante el ciclo de vida en algunas variedades de arroz y de hecho, se ha propuesto que la tolerancia a bajas temperaturas en el arroz en las etapas de crecimiento vegetativo y reproductivo parecen ser diferentes y gobernados por mecanismos genéticos que actúan probablemente en direcciones distintas (Bertin *et al.* 1996).

Es importante también señalar que el nivel de tolerancia a la congelación alcanzado durante la aclimatación al frío es una respuesta coordinada entre las señales ambientales y el genotipo y fisiología de la planta. Por ejemplo, la actividad de las MAP cinasas durante la respuesta al estrés puede ser medida bioquímicamente. Sin embargo, su activación durante diversas etapas de crecimiento y desarrollo es probable que se limite a un tejido específico o incluso a pocas células en una etapa específica de desarrollo (Xu y Zhang 2014).

En nuestros experimentos se observó que las plantas wt AC y en menor medida las *mpk4* AC, desarrollaron una coloración morada en las hojas. Los pigmentos de las plantas incluyen varias moléculas diferentes, entre ellas la clorofila, los carotenoides, las antocianinas y las betalaínas. Los últimos tres pigmentos también son antioxidantes importantes, se han publicado datos demostrando que las semillas de maíz de color intenso tienen una mayor capacidad antioxidante y tasas de germinación más altas que las de color más claro, bajo condiciones adversas (Deng *et al.* 2017). Tomando en cuenta estos datos, la coloración morada que presentaron las plantas aclimatadas puede deberse a la síntesis de moléculas antioxidantes, como antocianinas que ayudarían a contender contra el estrés oxidativo que se presenta como consecuencia de exposición a temperaturas mucho más bajas.

Efecto en el funcionamiento fotosintético. La fotosíntesis es vital para la sobrevivencia de las plantas y es un proceso metabólico altamente coordinado y sensible a las condiciones ambientales. Cuando las plantas se enfrentan a cambios en el ambiente puede verse afectado el proceso fotosintético. Por tanto, conocer la eficiencia del aparato fotosintético permite conocer su afectación por cambios ambientales como el frío.

a) Actividad del fotosistema II (PSII)

La fluorescencia de la clorofila *a* se ha utilizado para caracterizar eventos que pueden afectar el aparato fotosintético, particularmente la actividad del PSII. La determinación cuantitativa de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*, su análisis y la obtención de los parámetros correspondientes, constituyen una forma precisa, confiable y rápida de obtener información molecular que tiene una expresión fisiológica (González-Moreno *et al.* 2008). Entre los parámetros comúnmente reportados está la razón F_v/F_m , que indica la eficiencia del aparato fotosintético. Este parámetro está definido como el total de la energía atrapada por los centros de reacción que es utilizada para realizar el trabajo fotoquímico, en *A. thaliana* se ha reportado que la relación F_v/F_m es de alrededor de 0.84, para plantas no aclimatadas y de aproximadamente 0.83, en plantas expuestas a 2 semanas de aclimatación a 4°C (Correia *et al.* 2006; Cvetkovi *et al.* 2017). Los valores obtenidos para wt NA, AC y *mpk4* NA, fueron de alrededor de 0.822 y para *mpk4* AC hubo un ligero pero significativo aumento, con un valor de alrededor de 0.826, siendo estos valores menores, pero cercanos a los reportados sobre plantas en buen estado fisiológico. Se sabe que sólo el estrés severo puede causar una reducción significativa en F_v/F_m . Por esta razón, a menudo se utiliza este parámetro para detectar daños severos por frío. Cuando este valor cae por debajo de 0.6, es indicativo de un desempeño disminuido de la fotosíntesis (Ritchie *et al.* 2006).

Los valores de F_v/F_m registrados previamente al reto de congelación explican el buen estado fisiológico de las plantas NA y AC de ambos genotipos antes de ser retadas. La similitud entre la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) determinada en las plantas wt NA y *mpk4* NA, coincide con los reportes de la literatura, en los que F_v/F_m

de la mutante *mpk4-2* no difirió significativamente con respecto a los de la wt NA (Gawrońska *et al.* 2014). Los demás parámetros, como ET0/RC, DI0/RC, Delta (Ro), Pi abs y de phi/ (Eo), aquí evaluados indican que los cambios implican una mínima disminución en la eficiencia del aparato fotosintético, tanto en las plantas aclimatadas a 4°C como en las mutantes *mpk4*, como se muestra en las curvas OJIP y en las gráficas de radar. El aumento del contenido de clorofila total en wt AC, podría sugerir un mecanismo compensatorio para mantener el funcionamiento adecuado del centro de reacción y, por tanto, de la fotosíntesis. Las diferencias mínimas en la fotosíntesis permiten a las plantas mantener condiciones fisiológicas adecuadas, indicando que durante la aclimatación suceden cambios adaptativos que evitan el deterioro del proceso fotosintético o que los que llegan a presentarse, son corregidos. Estos resultados también indican que la aclimatación o la pérdida de función de MPK4 no parecen ser factores que afecten la funcionalidad del fotosistema II.

b) Estructura del cloroplasto

El conocimiento de la ultraestructura y la dinámica del cloroplasto es esencial para comprender su función en un entorno cambiante y desafiante (Kirchhoff 2018). La ultraestructura de los cloroplastos es muy similar entre especies cuando las plantas se encuentran en condiciones ambientales favorables. En la literatura se describió que los cloroplastos de *A. thaliana* bajo condiciones permisivas de 22°C, presentaban numerosos gránulos de almidón y pilas de tilacoides (granadas) bien desarrolladas e interconectadas por tilacoides lamelares con las membranas internas y externas de los cloroplastos (Kratsch y Wise 2001; Saucedo-García *et al.* 2011). La ultraestructura observada en las micrografías obtenidas de las plantas tipo silvestre NA, coincide con la descrita para plantas en buen estado fisiológico.

Se sabe que los cloroplastos son el primer organelo más severamente afectado por estrés por frío. En general, los síntomas presentados en esta condición incluyen hinchamiento, reducción del tamaño y número de los gránulos de almidón, dilatación de los tilacoides, desapilamiento de los granas, acumulación de plastoglobulos y formación de vesículas periféricas al cloroplasto. Se ha reportado que la severidad

del daño del cloroplasto depende del tiempo de exposición al frío y que los síntomas en todas las especies son similares (Kratsch y Wise 2001).

La ultraestructura de los cloroplastos observada en las plantas wt AC presentó algunos síntomas relacionados con el estrés por frío, como el hinchamiento del organelo y la disminución del número y tamaño de los gránulos de almidón. Sin embargo, se conservó el apilamiento de los tilacoides y no hubo presencia abundante de plastoglóbulos. Se ha descrito que en las plantas de *Arabidopsis* aclimatadas los principales elementos estructurales de los cloroplastos, como la cantidad de tilacoides y la preservación de la organización de los grana, aparentemente ayudan a mantener la función del aparato fotosintético en niveles adecuados o eficientes a temperaturas de alrededor de 0°C (Astakhova *et al.* 2014). Esta hipótesis es apoyada tanto por los parámetros fotosintéticos determinados, los cuales se encontraban en valores adecuados en las plantas wt AC, como por la conservación de la organización de los grana.

En la ultraestructura de cloroplastos de plantas *mpk4* NA, se observaron síntomas de daño. Esto ya se había descrito en la literatura en las mutantes en *mpk4*, las cuales mostraban hinchamiento, menos gránulos de almidón y un aumento significativo de plastoglóbulos (Gawrońska *et al.* 2014), características que coinciden con la ultraestructura obtenida para *mpk4* NA en este trabajo. Estos síntomas de daño presentados por la mutante *mpk4* pueden estar relacionados con lo reportado en un estudio de microarreglos, en donde se explica que mutantes en MEKK1 y MPK4, muestran una supresión significativa de los genes codificantes en proteínas cloroplásticas (Pitzschkea *et al.* 2009). Los daños presentes en la mutante *mpk4* parecen disminuir con la aclimatación. Esto puede deberse a que la aclimatación conlleva una remodelación génica y metabólica, donde posiblemente está implicada la cascada en la que participa MPK4. Sin embargo, hay otras vías que se activan durante la aclimatación que podrían estar regulando otros genes que conllevarían a la restauración estructural del cloroplasto y la preservación de un proceso fotosintético adecuado.

La disminución en número y tamaño de los gránulos de almidón observada en la ultraestructura de los cloroplastos de plantas wt y *mpk4* AC, puede deberse al bloqueo de la biosíntesis del almidón, la aceleración de su degradación o la amplificación de los ciclos de su síntesis y degradación, por la disminución de la temperatura en la aclimatación, viéndose afectadas las reacciones de la fase oscura de la fotosíntesis. Esto puede deberse a que en bajas temperaturas las plantas incrementan la concentración de azúcares, ya que estos ayudan a reforzar a los tejidos fotosintéticos contra el daño por frío a través de sus propiedades osmoprotectoras. El almidón es la fuente más alta de azúcares, por lo que podría actuar como un reservorio metabólico dinámico para mantener los niveles de azúcar dentro del rango de protección (Dong y Beckles 2019). Los cambios en la disminución del número y tamaño de los gránulos de almidón en las condiciones de aclimatación en wt y *mpk4*, pueden deberse a su degradación para mantener una concentración adecuada de osmolitos y poder contender contra temperaturas congelantes.

Otra de las características observadas en la ultraestructura de los cloroplastos de todos los genotipos y tratamientos, son los plastoglóbulos, cuyo número se vió exacerbado en las plantas *mpk4* NA. Los plastoglóbulos se han definido como partículas de lipoproteínas rodeadas por una monocapa lipídica a manera de membrana (Kirchhoff 2018). Los plastoglóbulos son típicamente de entre 30-500 nm de diámetro, pero su tamaño puede variar en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico y transiciones del desarrollo, como la senescencia (Kirchhoff 2018). Aún no se sabe bien cuál es la función de los plastoglóbulos, pero sí que su abundancia aumenta en condiciones ambientales desfavorables, como el frío, el estrés oxidativo y la senescencia. Se ha reportado que hay una fuerte correlación entre el desmantelamiento de tilacoides y el aumento de los plastoglóbulos (Wijk y Kessler 2017). Relacionando la información de los plastoglóbulos con los resultados obtenidos en la ultraestructura de la mutante *mpk4*, se confirma la importancia de MPK4 en la activación de genes que codifican para proteínas del cloroplasto.

2. Efecto de la pérdida de función de la MPK4 en la actividad de la ATPasa de H⁺

Diferencias en la actividad de la ATPasa de H⁺ por pérdida de función de MPK4 y en condiciones de aclimatación. Se ha documentado que la actividad de la ATPasa de H⁺ puede ser modulada por distintas condiciones de estrés ambiental como la salinidad, la sequía y la temperatura (Muzi *et al.* 2016). Previamente, en el laboratorio se determinó que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas tipo silvestre de *A. thaliana* disminuye alrededor del 40% en plantas previamente aclimatadas (Ponce-Pineda 2016, Peña-Moral 2015). Este resultado fue reproducido en este trabajo, mostrando que la ATPasa de H⁺ de *A. thaliana* es sensible a la disminución de la temperatura, como se ha descrito previamente (Muzi *et al.* 2016).

Respecto a las MAP cinasas, en el laboratorio se ha estudiado la actividad de la ATPasa de H⁺ en plantas mutantes *mpk3* y *mpk6* en condiciones de NA y de AC. Observándose que posiblemente estas dos enzimas fungen como reguladores negativos de la actividad de la ATPasa de H⁺ en condiciones de no aclimatación. Tomando en cuenta que se ha reportado que MPK4 se activa en frío y que es una enzima con funciones antagónicas a MPK3 y MPK6 también en condiciones de frío (Liu y Zhou 2018; Teige *et al.* 2004), resultó de interés determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas purificadas de membrana plasmática de la mutante *mpk4*. Encontrándose que en condiciones de NA la actividad de la ATPasa de H⁺ de la mutante *mpk4* fue de alrededor de 30% menor, a la de plantas tipo silvestre NA; esto sugiere que en las plantas tipo silvestre, la MPK4 funciona regulador positivo de la actividad de ATPasa de H⁺ en condiciones de temperaturas experimentales estándar. En la aclimatación, la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas de la línea *mpk4* se incrementó aproximadamente un 30%, respecto a la condición NA de la misma mutante, sugiriendo que MPK4 es un regulador negativo de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en condiciones de aclimatación al frío y que podría estar regulando los procesos de su fosforilación y defosforilación. Aunque no se ha determinado el mecanismo por el cual sucede la disminución o aumento de la actividad de la ATPasa de H⁺, parece claro que cascadas de MAP

cinastas están implicadas. Tratando de tener más información para sustentar la forma en que la MPK4 podría estar implicada en la respuesta a frío, se emprendieron experimentos relacionados con la integridad membranal, la cinética de la enzima y su interacción con una proteína reguladora de su actividad.

Efecto de la pérdida de función de MPK4 en la integridad membranal. Las bajas temperaturas son uno de los principales factores adversos que impactan en el crecimiento y la productividad de las plantas y los cultivos agrícolas. La respuesta de las plantas a las bajas temperaturas depende de la duración e intensidad del estrés. En muchas plantas originarias de regiones templadas, como *Arabidopsis*, la exposición a temperaturas moderadamente bajas induce la aclimatación. Una de las propiedades físicas celulares importantes durante la aclimatación al frío y en general ante cualquier tipo de estrés, es la integridad membranal.

El daño a la integridad membranal se puede medir a través del aumento de la fuga de solutos, como se realizó en este trabajo. Los resultados indican que las plantas tipo silvestre que se aclimataron, presentaron alrededor de 10% menor pérdida de solutos que las plantas no aclimatadas, lo cual es consistente con lo reportado previamente en el laboratorio por Cano-Ramírez (2014). El resultado indica que la aclimatación permite una mayor conservación de la integridad membranal, lo cual ayuda a la posterior resistencia a temperaturas congelantes. En concordancia, se ha encontrado en plantas de petunia que la fuga de solutos en plantas NA, después de un reto a 2°C durante 1 h, presentaron un daño severo reflejado en la alta fuga de electrolitos, aproximadamente del doble en comparación con las plantas AC (a 5°C durante 4 semanas). Además, estas plantas de petunia acumularon mayor cantidad de compuestos fenólicos y en general mostraron un aumento correspondiente en la capacidad antioxidante que podría estar relacionada con la aclimatación al frío (Pennycooke *et al.* 2005).

Respecto a la mutante *mpk4*, no se pudo evaluar el efecto de la aclimatación en la integridad membranal, ya que hubo una desintegración de las hojas durante la realización del experimento, tanto en hojas NA como AC. Este fenómeno puede deberse a que aparentemente las hojas de la línea *mpk4* son muy frágiles y se

desintegran durante el ensayo, causando un aumento la conductividad eléctrica, pero no por daños en la integridad membranal, sino por fragilidad general del tejido foliar. Probablemente esto podría indicar que MPK4 está implicada en la regulación de genes que participan en la síntesis de compuestos que conforman /o la pared celular que constituyen barreras físicas de las células de las hojas. Lo anterior, bien podría estar relacionado con el hecho de que se descubrió que MPK4 desempeña un papel importante en la resistencia de Arabidopsis a patógenos bacterianos, probablemente a través de una vía dependiente de ácido salicílico (Andreasson *et al.* 2005). También ha sido reportado que las mutantes en *mpk4* muestran un crecimiento atrofiado o lento, indicando que MPK4 también es importante para el desarrollo de la planta (Töldsepp *et al.* 2018). Se descubrió que se requiere MPK4 para la citocinesis en Arabidopsis y se ha visto que MPK4 desempeña un papel importante en la regulación del cierre estomático inducido por sequía o ácido abscísico en algunas especies (Takáč *et al.* 2016). Estos antecedentes en conjunto, muestran la importancia de MPK4 en el metabolismo, así que no resulta descabellado pensar que su ausencia se relacione de alguna manera con la desintegración de las hojas en las condiciones del experimento realizado.

Los resultados de la fuga de solutos de las plantas tipo silvestre demuestran que las funciones de la membrana plasmática se preservan al ser aclimatadas. Estas modificaciones positivas en la estructura de la membrana podrían estar relacionadas con la modificación de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la aclimatación. No se ha investigado hasta ahora la naturaleza exacta de esta alteración, sin embargo, se ha reportado que durante la aclimatación hay una remodelación lipídica y una síntesis de proteínas y de compuestos protectores de las membranas (Uemura *et al.* 2006), que podría contribuir a explicar los diferentes niveles de actividad encontrados en condiciones de AC tanto en wt como en la línea *mpk4*.

Efecto de la aclimatación y la pérdida de función de MPK4 en la cinética de la ATPasa de H⁺. Con el fin de entender las diferencias en las actividades de ATPasa de H⁺ encontradas en las membranas plasmáticas de las plantas wt NA y AC y *mpk4*

NA y AC, se hizo un estudio cinético de la actividad en un intervalo de concentraciones de ATP/Mg²⁺ no saturantes a saturantes. Las curvas obtenidas en todos los tratamientos, tanto en el genotipo tipo silvestre como en la mutante *mpk4*, se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Este patrón cinético de la ATPasa de H⁺ en wt ya había sido determinado anteriormente (Palmgren y Christensen 1993) incluso en el laboratorio (Ponce-Pineda 2018). Sin embargo, debido a que se ha encontrado que la cinética de la ATPasa de H⁺ en plantas wt NA presenta cooperatividad, probablemente debido a una oligomerización (Sánchez Nieto *et al.* 2011; Muzi *et al.* 2016), se procedió a hacer el ajuste al modelo de Hill, obteniéndose la V_{max} , K' y el número de Hill (n). En esta ecuación, un número de Hill menor a 1 indica cooperatividad negativa y mayor a 1 cooperatividad positiva. Se encontró que tanto en wt NA y AC como *mpk4* NA y AC el valor de n fue muy aproximado a 1. Con estos valores, se puede decir que la cinética de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ es michaeliana para las plantas wt NA y AC y *mpk4* NA y *mpk4* AC.

Dentro del análisis de la cinética de la ATPasa de H⁺ en las plantas wt y *mpk4* NA y AC, se compararon los parámetros cinéticos determinados de acuerdo a la ecuación de Michaelis Menten, donde la V_{max} en wt NA fue de 164.66 ± 21.13 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹, valor que disminuyó de forma marcada en las plantas wt AC, sin embargo, la K_m fue muy similar en ambos tratamientos (1.91 y 1.78 mM, respectivamente), de manera que la aclimatación afectó negativamente la velocidad de reacción de la ATPasa de H⁺, pero la afinidad por el sustrato, lo que se ve reflejado en una eficiencia catalítica aproximadamente 50% menor en wt AC respecto a wt NA. Apoyando este resultado, ya se había visto que por exposición a 4°C durante 6 h la actividad de la enzima disminuía (Muzi *et al.* 2016). Entre *mpk4* NA y AC no se presentó una diferencia muy marcada de V_{max} , sin embargo, para *mpk4* AC la K_m de la ATPasa de H⁺ disminuyó aproximadamente a la mitad, comparado con wt NA y AC y *mpk4* NA, infiriéndose un aumento de la afinidad por el sustrato de la ATPasa de H⁺ en las plantas *mpk4* AC. Este resultado concuerda con la mayor eficiencia catalítica de la ATPasa de H⁺ en *mpk4* AC, pues esta es mayor comparada con la de las plantas wt AC y *mpk4* NA. Lo anterior sugiere que en la planta wt la actividad de MPK4 en condiciones de aclimatación, participa en un mecanismo de regulación

de la ATPasa de H⁺ que contribuye a modificar negativamente su actividad. Así, se puede deducir que, bajo condiciones de aclimatación la ATPasa de H⁺ de las plantas wt es más lenta y por lo tanto menos eficiente para hacer hidrólisis del ATP. Los parámetros determinados indican que tanto la aclimatación, como la ausencia de MPK4 conllevan a una modificación en la actividad de la ATPasa de H⁺, lo cual se ve reflejado en diferentes niveles de actividad, explicadas por diferencias en las constantes catalíticas V_{max} , K_m y eficiencia catalítica entre las líneas y los tratamientos estudiados.

Las diferencias en la actividad también podrían deberse a que se estén expresando diferentes isoformas en los diferentes tratamientos. En un estudio previo se examinaron las propiedades funcionales de las tres principales isoformas (AHA1, AHA2 y AHA3) de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *A. thaliana*, expresadas y purificadas de levadura para determinar sus parámetros cinéticos (Tabla 5) (Palmgren y Christensen 1993). Las tres isoformas presentaron un comportamiento michaeliano (Palmgren y Christensen 1993), pero AHA3 tuvo una K_m (1.50 mM) más cercanas a las determinadas para la enzima de las plantas wt NA ($K_m= 1.91$), wt AC ($km=1.78$) y *mpk4* NA ($K_m= 1.18$). Por ello, probablemente esta isoforma se esté expresando en mayor proporción en las hojas de las plantas wt y *mpk4* NA. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otras isoformas, tanto en wt y *mpk4* NA, como en el tratamiento de aclimatación en ambos genotipos, ya que los parámetros cinéticos determinados son diferentes y otros estudios han reportado la expresión de los genes de AHA1, 2, 3, 5, 7, 8,10, y 11 en tejido verde (Yuan *et al.* 2017).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de AHA1, AHA2 y AHA3 (Palmgren y Christensen 1993).

Constantes catalíticas de la reacción de hidrólisis de ATP		
Isoforma	V _{max} (nmol Pi mg ⁻¹ min ⁻¹)	K _m (mM)
AHA1	1250	0.15
AHA2	2450	0.15
AHA3	1500	1.50

Las tres isoformas fueron sobre-expresadas y purificadas de células de levadura y se determinó su cinética con una concentración variable de ATP de 50 a 300 μ M a pH=6.5.

Para conocer más sobre el mecanismo de regulación de la ATPasa de H⁺ en la aclimatación y por MAP cinasas, se realizaron experimentos relacionados con la determinación de la cantidad de enzima, su interacción con la proteína 14-3-3 y la fluidez membranal.

3. Niveles de ATPasa de H⁺ en plantas wt y *mpk4* NA y AC

Para determinar si la cantidad de enzima estaba influyendo en la actividad de la ATPasa de H⁺, se determinaron los niveles de esta enzima mediante inmunoréplica y su subsecuente análisis densitométrico. En estos experimentos se determinó que entre la enzima de las plantas wt NA y wt AC no hubo diferencias en la cantidad de ATPasa de H⁺, por lo que la disminución de la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas aclimatadas no está asociada a una disminución en la cantidad de enzima. Por otro lado, en la mutante *mpk4* se presentó un aumento significativo de alrededor del 79% \pm 27.04 en los niveles de ATPasa de H⁺ respecto a su control NA; dicho porcentaje es comparable con el aumento del 30% de la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas *mpk4* AC respecto a las *mpk4* NA. Por lo que se puede inferir que en este caso, el aumento observado en la actividad de la ATPasa de H⁺ podría estar asociado a una mayor cantidad de proteína, ya sea porque es más sintetizada en condiciones de aclimatación, o bien porque es menos degradada en las mismas condiciones. La diferencia entre los patrones de actividad y niveles de enzima de wt y *mpk4*, indican que, en las plantas tipo silvestre, MPK4 podría estar regulando

negativamente a algún factor de transcripción que conlleve a la síntesis de *nov*o de la ATPasa de H⁺, o bien a la de un factor de transcripción que inhibiera la síntesis de una proteasa que degrada a la ATPasa. Lo anterior está sustentado en reportes que documentan que las cascadas de MAP cinasas regulan la activación o desactivación de factores de transcripción involucrados en numerosos procesos, entre ellos los relacionados con las repuestas de estrés por frío (Zhao *et al.* 2017).

4. Niveles de la proteína 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 son proteínas diméricas altamente conservadas con una masa de aproximadamente 30 kDa. En *Arabidopsis*, se expresan 13 isoformas que se designan con letras griegas (χ , ω , ψ , ϕ , υ , λ , ν , κ , μ , ϵ , σ , ι , π). El rasgo que comparten las proteínas 14-3-3 es su capacidad para unirse a otras proteínas mediante el reconocimiento de motivos consenso fosforilados (Catalá *et al.* 2014). En la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, se ha visto que las proteínas 14-3-3 se unen a la región del carboxilo terminal cuando este está fosforilado, estabilizando este estado que se traduce en una mayor actividad de la enzima. Ya que se han observado diferentes valores de actividad enzimática en la enzima de las plantas wt y *mpk4* NA o AC, se decidió evaluar los niveles de proteínas 14-3-3 en estas plantas, intentando establecer una posible asociación entre la presencia de estas proteínas y la actividad enzimática. En las inmunoréplicas se revelaron dos bandas, una de 30 kDa en la que el análisis densitométrico no arrojó diferencias significativas entre los genotipos y tratamientos. Y otra de 37 kDa en la que no se distinguió diferencia significativa en su acumulación entre las plantas wt NA y AC, pero sí en las plantas *mpk4* AC, respecto a las *mpk4* NA, en un porcentaje de alrededor del 50%. Este resultado sugiere que la mayor actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas *mpk4* en condiciones de aclimatación, podría deberse al incremento en la cantidad de alguna isoforma de la proteína 14-3-3, causando que la ATPasa de H⁺ está más fosforilada en esta condición. Las proteínas 14-3-3 pueden interaccionar a través de un residuo de Thr conservado en el extremo carboxilo que se fosforila (Thr947 en la isoforma AHA1 de *Arabidopsis*), con la ATPasa de H⁺ causando su activación. La fosforilación de dicho residuo

aparentemente induce el desplazamiento de esta región, aumentando así la actividad de la enzima (Chen *et al.* 2006). Lo anterior indicaría que en las plantas wt, la aclimatación produce que la MPK4 no sólo conduce a regular negativamente el aumento de la cantidad de la ATPasa de H⁺ en la membrana, sino también a la disminución de su actividad por medio de una menor interacción con la proteína 14-3-3. Esto también implica que si hay menos proteína 14-3-3 asociada a la enzima, su fosforilación es menor. Este último hecho, obliga a considerar la posible acción regulatoria (directa o indirecta) de la MPK4 sobre una cinasa/fosfatasa de la ATPasa de H⁺. Tomando esto en consideración, MPK4 podría estar involucrada en la activación o desactivación de un factor de transcripción que active a alguna isoforma de la 14-3-3 en frío, como por ejemplo la isoforma psi codificada por el gen RCI1A, que se induce en bajas temperaturas (Denison *et al.* 2011).

5. Efecto de la rigidización membranal en la acción de MPK4 sobre la actividad de la ATPasa de H⁺

Uno de los principales cambios que suceden durante la aclimatación es la remodelación de la membrana plasmática que conlleva a un aumento en su fluidez como preparación para contender contra las bajas temperaturas que se avecinan (Janská *et al.* 2010). Por otro lado, Furuya *et al.* (2014) reportaron que la rigidez membranal inducida por frío o DMSO activan a MPK4. Entonces, resultó de interés para este trabajo averiguar si la rigidización de la membrana y/o la ausencia de MPK4 afectaban la actividad de la ATPasa de H⁺ en la aclimatación, para esto se determinó la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática de las plantas wt y *mpk4* NA y AC, incubadas con DMSO como agente rigidificante. Se sabe que el DMSO induce un efecto de rigidización en la membrana similar al que se da a bajas temperaturas, mediante la polarización de la fluorescencia con 1,6-diphenyl-1,3,5,-hexatrieno (DPH) se confirmó en protoplastos que el DMSO reduce la fluidez membranal a 25°C, causando un incremento en el índice *p* (polarización de la fluorescencia) (Örvar *et al.* 2000). En nuestros experimentos no se encontró diferencia entre las actividades de las vesículas no incubadas e incubadas con DMSO de las plantas wt y *mpk4* NA y AC. La actividad de la ATPasa de H⁺ de wt disminuyó con y sin DMSO con la aclimatación y en *mpk4* la actividad

aumentó con el tratamiento el tratamiento AC con y sin incubar con DMSO. Esto quiere decir que el aumento en la rigidez membranal inducida por baja temperatura o por el DMSO, no está participando en la regulación de la enzima en condiciones de aclimatación al frío. Este resultado concuerda con Gutiérrez-Nájera *et al.* (2004), quienes haciendo un estudio de la actividad inhibitoria de la FB1 (Fumonisina B1) sobre la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, encontraron que la fluidez o rigidez membranal no influyen en la actividad de la ATPasa de H⁺. Sin embargo, se ha descrito que la rigidez membranal sí es importante en el proceso de señalización por frío, pues en un experimento realizado con protoplastos se determinó que la rigidez membranal inducida por DMSO a 25°C o por frío, indujo un aumento del Ca²⁺ citosólico seguido de la expresión del gen *cas30* y una reorganización del citoesqueleto, incrementándose la tolerancia al congelamiento (Örvar *et al.* 2000). Lo anterior implica que la rigidez membranal inducida por frío, aunque no esté regulando directamente la actividad de la ATPasa de H⁺, sí está activando cascadas de señalización como en la que participa MPK4 (MEKK1-MKK2-MPK4) (Furuya *et al.* 2014). La cual sí podría estar involucrada en la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺. Esto apoya la hipótesis de que la membrana plasmática es un sensor que cambia su fluidez en respuesta a temperatura y que estos cambios activan las cascadas de señalización como las de las MAP cinasas. En conjunto, esta sucesión de eventos conlleva a adquirir la tolerancia a la congelación y probablemente, a cambios en la actividad de la ATPasa de H⁺. Esto concuerda con lo postulado previamente en el laboratorio por Cano-Ramírez (2014), quién sugiere que la fase lipídica de la membrana plasmática tiene propiedades fisicoquímicas capaces de percibir los cambios de temperatura, mismos que se expresan en cambios en su fluidez. Por lo tanto, la rigidez membranal puede desencadenar por sí sola la señalización, adaptación y sobrevivencia de las plantas al congelamiento.

De los resultados de los experimentos de cinética, cantidad de ATPasa, presencia de las proteínas 14-3-3 y ensayos con DMSO, se puede deducir que la rigidez membranal presentada a tiempos cortos a baja temperatura puede activar una cascada de señalización en la que MPK4 participa, activando o desactivando factores de transcripción que actúan sobre genes cuya función desencadena la

inhibición de los niveles de enzima activa de la ATPasa de H⁺, la expresión de las proteínas como las 14-3-3 y/o los estados de fosforilación de la ATPasa de H⁺, controlando así su actividad. Esta regulación de la ATPasa de H⁺ durante la aclimatación, podría formar parte de la remodelación metabólica, ya que al disminuir la actividad de la ATPasa de H⁺, la energía de las plantas podría estarse centrando en mantener procesos vitales como la fotosíntesis en la fase luminosa y por el contrario inducir el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua para así mantener las plantas en un estado fisiológico capaz de resistir temperaturas congelantes.

CONCLUSIONES PARCIALES

- 1) Los cambios en la actividad y en los parámetros cinéticos de la ATPasa de H⁺ sugieren que MPK4 regula negativamente la actividad de la ATPasa de H⁺ en las plantas wt durante la aclimatación posiblemente mediante la activación o desactivación de factores de transcripción que promueven niveles menores de la ATPasa de H⁺ en la membrana y niveles menores de la proteína 14-3-3. Sin embargo, es posible que la MPK4 también esté influenciando la actividad de la ATPasa de H⁺ a través de otros mecanismos que inciden en la regulación de la enzima, como la activación de cinasas/fosfatasa, la síntesis de lípidos anulares, entre otros y que no se exploraron en esta tesis.
- 2) De los resultados de sobrevivencia a la congelación se puede determinar que, la aclimatación permite a las plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* silvestre tolerar temperaturas congelantes. Debido a que las plantas mutantes en MPK4 se aclimatan igual que las wt se infiere que MPK4 no es imprescindible para las plantas wt en el proceso de aclimatación.
- 3) Los parámetros fotosintéticos determinados indican que durante la aclimatación las plantas wt aumentan su contenido de clorofila y mantienen su capacidad fotosintética a niveles óptimos, mientras que las plantas mutantes *mpk4* aunque no aumentan su contenido de clorofila mantienen su capacidad fotosintética, por lo que

la fotosíntesis de la fase luminosa es un proceso que se conserva a niveles adecuados aun a bajas temperaturas y es independiente de MPK4.

4) La ultraestructura del cloroplasto indica que la MPK4 podría ser importante en el metabolismo de lípidos y de carbohidratos en el cloroplasto, ya que en la mutante *mpk4* aumentan los plastoglobulos y disminuyen los gránulos de almidón en número y tamaño. Este efecto es compensado ligeramente por la aclimatación. La MPK4 también parece mantener la integridad del cloroplasto, misma que se pierde parcialmente en la mutante y en la que aparecen más plastoglobulos con una posible función de asimilación de tilacoides degradados.

5) Los experimentos de pérdida de solutos permitieron determinar que la aclimatación conserva en mejores condiciones la integridad membranal de las plantas wt ante temperaturas congelantes, mientras que los resultados de las mutantes *mpk4* no pueden ser interpretados, por la fragilidad de la cutícula en esta mutante.

6) La determinación de la actividad enzimática en presencia de DMSO como rigidificante, indica que la rigidez membranal inducida por frío no afecta la actividad de la ATPasa de H⁺ pero sí activa la cascada de señalización que contiene a MPK4, la cual probablemente regula negativamente la actividad de la ATPasa de H⁺.

CONCLUSIÓN GENERAL

Con los resultados obtenidos se puede concluir que MPK4 está involucrada en un mecanismo de regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺, actuando como un regulador negativo de la actividad durante la aclimatación y como regulador positivo en condiciones regulares de temperatura.

El mecanismo mediante el cual la MPK4 regula la actividad de la ATPasa de H⁺ en la aclimatación posiblemente se debe a la activación o desactivación de factores de transcripción de los genes que codifican para la ATPasa H⁺ o de sus agentes moduladores y para alguna isoforma de la proteína 14-3-3, disminuyendo los niveles

de estas enzimas y regulando así la actividad de la ATPasa de H⁺ y su interacción con la proteína 14-3-3.

PERSPECTIVAS

- 1) Caracterizar la actividad de MPK4 en las condiciones de aclimatación al frío estandarizadas en el laboratorio, mediante ensayos de fosforilación de mielina básica u otros métodos.
- 2) Establecer los niveles de fosforilación de la ATPasa de H⁺ mediante el uso de anticuerpos para identificar los residuos fosforilados involucrados en las modificaciones de la actividad en condiciones de aclimatación u otros métodos.
- 3) Estudiar del tráfico vesicular para determinar la integración de la ATPasa de H⁺ a la membrana plasmática durante la aclimatación.
- 4) Determinar de los niveles de transcrito de las distintas isoformas de la ATPasa de H⁺ en condiciones de aclimatación.
- 5) Determinar de los niveles de transcrito de la isoforma *psi* de la proteína 14-3-3 codificada por el gen *RC11A*, la cual se ha encontrado se expresa en frío.
- 6) Determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática de plantas adultas asperjadas con DMSO para determinar la rigidez membranal como parte inicial de la señalización.

APÉNDICE

Apéndice 1

Fluorescencia de la Clorofila a

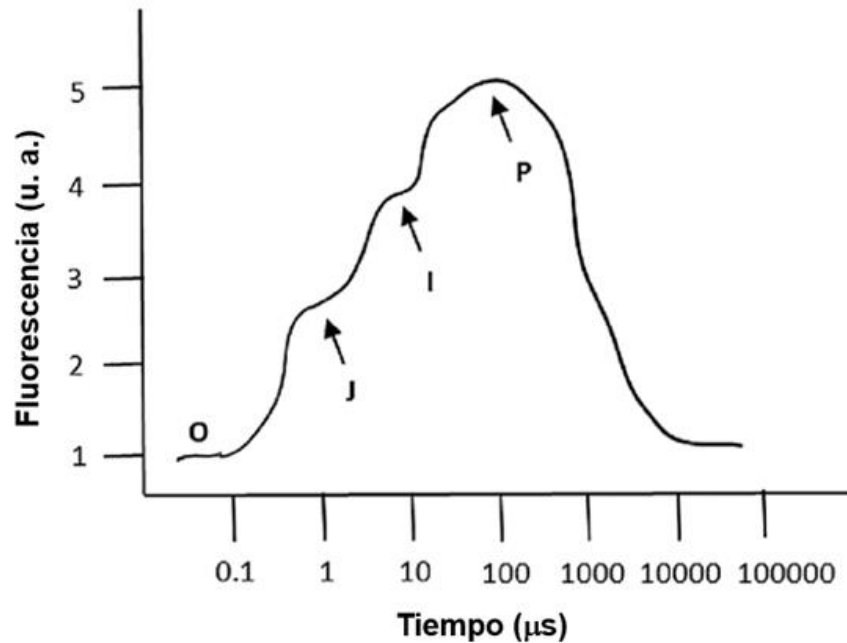


Figura A. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II. O, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0). Aparece alrededor de los 50 μs y en ese momento todos los centros de reacción están oxidados “abiertos”. J, se desarrolla a los 2 μs y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A . I, se desarrolla a los 20 μs y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B . P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m o F_5). En este momento todos los centros de reacción están reducidos “cerrados” (González-Moreno *et al.* 2008).

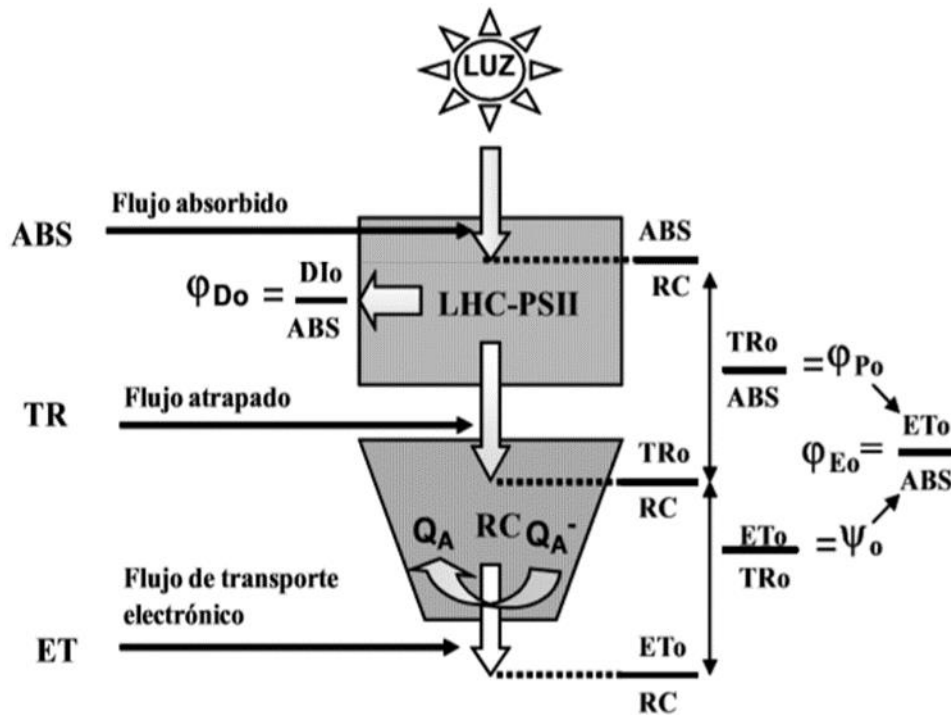


Figura B. Modelo simplificado de los flujos de energía en el aparato fotosintético. ABS se refiere a el flujo de fotones absorbidos por los pigmentos antena. Parte de esta energía de excitación se disipa como calor y en menor grado como emisión de fluorescencia y la otra parte es canalizada como flujo atrapado al centro de reacción (TR) y es convertido a energía redox reduciendo al aceptor de electrones Q_A a Q_A⁻ el cual se oxida creando transporte de electrones (ET). Está representada, la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A (ϕ_{Eo} o ϕ_{Eo}), la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón más allá de Q_A⁻ en la cadena transportadora de electrones ($\psi(Eo)$ o ψ_o) y el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ET_o/ABS o ϕ_{Po}) (González-Moreno *et al.* 2008).

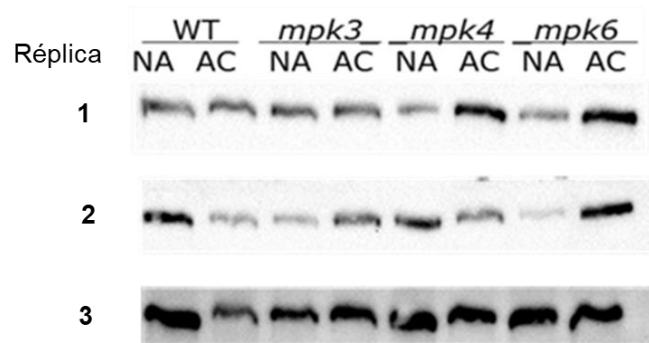
Apéndice 2

Tabla 6. Equivalencia de la concentración de ATP/Mg²⁺ añadida y la concentración de ATPMg como sustrato de la reacción de hidrólisis de ATP. (O'Sullivan y Smithers, 1979)

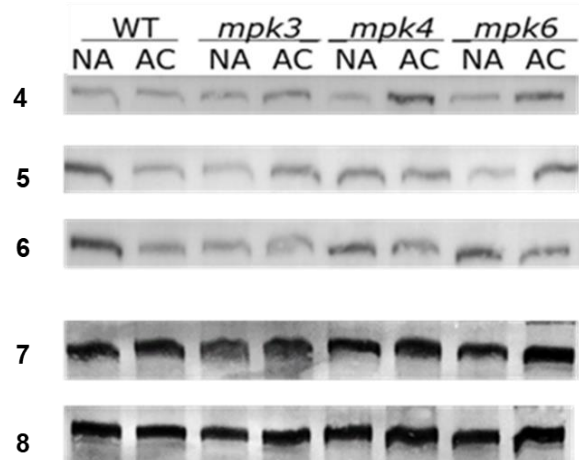
ATP/Mg ²⁺ (mM)	ATPMg (mM)
0.2	0.1266
0.4	0.2892
0.6	0.4518
0.8	0.6144
1	0.777
2	1.59
4	3.216
6	4.842
8	6.468
10	8.094
12	9.72

Apéndice 3

Revelado con peroxidasa



Revelado con fosfatasa alcalina



Réplicas de las inmunodetección de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática de hojas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos wt y *mpk4* NA y AC. Se realizaron 8 réplicas 3 de ellas se revelaron con peroxidasa y 5 por fosfatasa alcalina. Se utilizaron cuatro preparaciones de vesículas de membrana independientes por cada línea y tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Andreasson E, Jenkins T, Brodersen, Thorgrimsen S, Petersen N, Zhu S, Qiu J, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman M, Nielsen H, Hirt, Somssich I, Mattsson O y Mundy J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 24: 2579-2589.

Astakhova N, Popov V, Selivanov A, Burakhanova E, Alieva G y Moshkov I. (2014). Reorganization of chloroplast ultrastructure associated with low-temperature hardening of *Arabidopsis* plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61: 744-750.

Barrero-Gil J y Salinas J. (2018). Gene regulatory networks mediating cold acclimation: the CBF pathway. *Survival strategies in extreme cold and desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1081: 3-22.

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

Bertin P, Kinet J y Bouharmont J. (1996). Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica*, 89: 201-210.

Bigéard J. y Hirt H. (2018). Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1-18.

Carmona-Salazar L, El Hafidi, M, Enríquez-Arredondo C, Vázquez-Vázquez C, González De La Vara L y Gavilanes-Ruiz M. (2011). Isolation of detergent resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Analytical Biochemistry*, 417: 220–227.

Catalá R, López-Cobollo R, Castellano M, Angosto T, Alonso J, Ecker J y Salinas J. (2014). The *Arabidopsis* 14-3-3 Protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-

temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation. *Plant Cell*, 26: 3326–3342.

Cano-Ramirez D. (2014). Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias: Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Química, UNAM.

Chen F, Li Q, Sun L y He Z. (2006). The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Research*, 13: 53–63.

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

Correia M, Osorio M, Osorio J, Barrote I, Martins M y David M. (2006). Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 75–84.

Cvetkovic J, Müller M y Baier M. (2017). Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Scientific Reports*, 7: 44055.

Deng B, Zhang Y, Yang K, Li Z. (2017). The differential antioxidant capacity of watermelon flesh at different maturity stages and its inhibitory effects on seed aging may explain the significance of fruit flesh colors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 139.

Denison F, Paul A, Zupanska A, Ferl R. (2011). 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 22, 720: 727.

Dóczi R y Bögre L. (2018). The quest for MAP kinase substrates: gaining momentum. *Cell Press Reviews*, 23: 918-932.

Dong S y Beckles M. (2019). Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink promote a better abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, 234-235: 80-93.

Duby G y Boutry M. (2009). The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *European Journal of Physiology*, 457: 645-655.

Dutilleul C, Benhassine-Kesri G, Demandre C, Rézé N, Launay A, Pelletier S, Renou J, Zachowski A, Baudouin E y Guillas I. (2012). Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and *Arabidopsis thaliana* response to chilling. *New Phytologist*, 194: 181-191.

Lira-Silva E, Jasso-Chávez R y Pardo-Vázquez J. (2014). Respuestas al problema bioquímico. *Revista de Educación Bioquímica*, 23: 2.

Falhof J, Torbol J, Thoe F y Palmgren M. (2015). Plasma Membrane H⁺-ATPase: Regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 9: 323-337.

Fu H, Subramanian R y Masters S. (2000). 14-3-3 PROTEINS: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40:617–47.

Furuya T, Matsuoka D y Nanmori T. (2014). Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 588: 2025–2030.

González-Reyes K. (2010). Tesis que, para obtener el título de Ingeniero Químico, presenta: Caracterización de la cinética de la reacción de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos. Facultad de Química.

Gutierrez-Najera N, Muñoz-Clares R, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sanchez-Nieto S, Plasencia J y Gavilanes-Ruíz M. (2004). Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 221: 589-596.

Gao M, Liu L, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S y Zhang Y. (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research*, 18: 1190-1198.

Gawrońska P, Witoña D, Vashutinaa K, Bederskab M, Betlińska B, Rusaczonka A y Karpińska S. (2014). Mitogen-activated protein kinase 4 is a salicylic acid-independent regulator of growth but not of photosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 7: 1151–1166.

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

González-Moreno S, Perales-Vela H y Salcedo-Alvarez M. (2008). La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27: 119-129.

Green A, Perderson T, Falhof J, Kemmer G, Lund A, Ekberg K, Fuglsang T, Pomorski T, Buch-Pedersen M y Palmgren M. (2015). Specific activation of the plant p-type plasma membrane H⁺-ATPase by lyso-phospholipids depends on the autoinhibitory N-and C- terminal domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 290: 16281–16291.

Guo X, Liu D y Chong K. (2018). Cold signaling in plants: insights into mechanisms and regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60: 745–756.

Gutiérrez-Angoa L. (2016). Tesis para optar por el grado de maestra en ciencias: Efecto de la aclimatación al frío en la regulación transcripcional de la serina palmitoiltransferasa de *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Química, UNAM.

Haruta M, Gray W y Sussman M. (2016). Regulation of the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation. *Current Opinion in Plant Biology*. 28: 68-75.

Hager A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116: 483

Hatfield J y Prueger J, (2015). Temperature extremes: effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*,10: 4-10.

Hoagland D. (1920). "Optimum nutrient solutions for plants". *Science*. 52: 562–564.

Hou Q, Ufer G. y Bartels D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell*, 39: 1029-1048.

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

Ling H. (2015). Functional roles of plant protein kinases in signal transduction pathways during abiotic and biotic stress. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 2: 147.

Hill A. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology*, 40: 4-7.

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

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

Jagodzik P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M y Ludwikow A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1387.

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

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

Kratsch H y Wise R. (2001). The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell and Environment*, 23: 337-350.

Knigth M y Knigth H. (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, 195: 737–751.

Kirchhoff H. (2018). Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytologist*, 223: 565-57.

Lin C y Chen S. (2018). New functions of an old kinase MPK4 in guard cells. *Plant Signaling and Behavior*, 13:5.

Lissarre M, Ohta M, Sato A y Miura. (2010). Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plant. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 948-952

Liu Y, Dang P, Liu L y He C. (2019). Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 38: 511–519.

Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W y Zhang S. (2007). Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal*, 51: 941–954.

Liu Y y Zhou J. (2018). Regulation of ICE1 in freezing tolerance. *Trends in Plant Science*, 23:2.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A y Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

Michaelis L and Menten M (1913). Die Kinetik der Intervertinwirkung. *Biochem*, 49: 333-369.

Mishra N, Tuteja R y Tuteja N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452: 55–68.

Mitch E y Coaker G. (2011). The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Molecular Plant*, 4: 416-427.

Morales-Cedillo F, González-Solís A, Gutiérrez-Ruiz L, Cano-Ramírez D y Gavilanes-Ruiz M. (2015). Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell*, 34: 617-629.

Morales-Cedillo F. (2014). Tesis de para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Relación estructural esfingolípidos ATPasa de H⁺ y su relevancia funcional en *Arabidopsis*. Facultad de Química, UNAM.

Morsomme P y Boutry M. (1999). The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 1-16.

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

Nakagami H, Pitzschke A y Hirt H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stresses signaling. *Trends in Plant Science*, 10: 339-346.

O'Sullivan w y Smither G. (1979). Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods in Enzymology*, 63: 294-336.

Palmgren M. y Christensen G. (1993). Functional Comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:28.

Pennycooke J, Cox S, Stushnoff C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia x hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53: 225–232.

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

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

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

Pitzschkea A, Djameia A, Bittonc F y Hirta H. (2009). A major role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 pathway in ROS signaling. *Molecular Plant*, 2:120–137.

Ponce-Pineda I. (2016). Tesis que, para obtener el título de Licenciatura en Ingeniería Química, presenta: Análisis energético del efecto de la temperatura en la catálisis de la ATPasa de H⁺ en membranas con diferente contenido de esfingolípidos. Facultad de Química, UNAM.

Ponce-Pineda I. (2018). Tesis de para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Caracterización de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea mutante *mpk3* en condiciones de aclimatación al frío. Facultad de Química, UNAM.

Rihan H, Al-Issawi M y Fuller M. (2017). Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions*, 1: 143-157.

Ritchie A, Riley L, Dumroese R y Landis T. (2006). Chlorophyll fluorescence: what is it and what do the numbers mean?. *USDA Forest Service Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations*, 34-43.

Roberts M. (2003). 14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signaling. *Trends in Plant Science*, 8: 218-223.

Roberts M, Salinas J y Collige D, (2002). 14-3-3 Proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Molecular Biology*, 1031: 1031-1039.

Ruiz-Granados Y, De La Cruz-Torres V, Sampedro J. (2019). The Oligomeric State of the Plasma Membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. *Molecules*. 24: 958.

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

Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. (2011). Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta*, 5 :965-78.

Saucedo-García M, Guevara-García A, González-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana, Markham J, Lozano-Rosas G, Dietrich C, Ramos-Vega M, Cahoon E y Gavilanes-Ruíz M. (2011). MPK6, sphinganine and the *LCB2a* gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 191: 943–957.

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

Saucedo-García y Gavilanes-Ruíz. (2005). Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica*. 24: 4-11.

Shi Y, Ding Y y Yang S. (2018). Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation. *Trends in Plant Science*, 23: 623-637.

Sukhova E. y Sukhov V. (2018). Dependence of the CO₂ uptake in a plant cell on the plasma membrane H⁺-ATPase activity: theoretical analysis. *Membrane and Cell Biology*, 12:146–159.

Takáč T, Vadovič P, Pechan T, Luptovčiak I, Šamajová O y Šamaj J. (2016). Comparative Proteomic Study of Arabidopsis mutants *mpk4* and *mpk6*. Scientific Reports, 6: 28306.

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

Töldsepp K, Zhang J, Takahashi Y, Sindarovska Y, Hörak H, Ceciliato P, Koolmeister K, Wang Y, Vaahtera L, Jakobson L, Yeh C, Park J, Brosche M, Kollist H y Schroeder J. (2018). Mitogen-activated protein kinases MPK4 and MPK12 are key components mediating CO₂-induced stomatal movements. The Plant Journal, 96:1018-1035.

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

Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou H, Rajashekar C, Williams T y Wang X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. The Journal of Biological Chemistry, 277: 31994-2002.

Wijk K y Kessler F. (2017). Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation. Annual Review of Plant Biology, 68:253–89.

Xu J y Zhang S. (2014). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. Trends in Plant Science, 20: 56-64.

Yuan W, Zhang D, Song T, Xu F, Lin S, Xu W, Li Q, Zhu Y, Lian J y Zhang J. (2017). Arabidopsis plasma membrane H⁺-ATPase genes *AHA2* and *AHA7* have distinct and overlapping roles in the modulation of root tip H⁺ efflux in response to low-phosphorus stress. Journal of Experimental Botany. 68: 1731–1741.

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

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

Zuther E, Schaarschmidt S, Fischer A, Erban A, Pagter M, Mubeen U, Giavalisco P, Kopka J, Sprenger H y Hinch D. (2018). Molecular signatures of increased freezing tolerance due to low temperature memory in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 42: 854-873.