



Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio de la fibrilarina y de los fosfolípidos
nucleares durante la muerte celular regulada inducida
por estrés por calor

Tesis que presenta

Javier Adrian Morales Morales

En opción al título de

Doctor en ciencias

**(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y
Biología Molecular)**

Mérida, Yucatán, México

2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Estudio de los fosfoinosítidos nucleares durante la muerte celular regulada inducida por estrés por calor” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, noviembre del 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

JAVIER ADRIAN MORALES MORALES

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Estudio funcional de la unión entre fibrilarina y fosfolípidos de inositol involucrados en la síntesis de RNA ribosomal y Estudio funcional de la fibrilarina en la progresión viral de plantas” bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (176598 y 1572)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 404391 y al financiamiento para realizar este trabajo, proyecto de Fronteras de la Ciencia 1572.

A Wilma Aracely Gonzales Kantún, Ángela Kú Gonzales y Felipe Barredo Pool, por su apoyo técnico, sin el que este trabajo no hubiera sido posible.

Al comité tutorial: Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Juan Fco. Jiménez Bremont, por sus consejos durante el doctorado.

A mi comité revisor, Dra. Ana Ly Arroyo Herrera, Dra. Luisa López Ochoa, Dr. Felipe Vázquez Flota y Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, por los valiosos comentarios y sugerencias, que enriquecieron y mejoraron notablemente este documento de tesis.

Al Dr. Julio Ramón Ugalde, por su confianza, su guía y sus palabras de aliento.

Al CICY por permitirme realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones y especialmente al Dr. Enrique Castaño de la Serna por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por el tiempo y esfuerzo que dedico a mi formación tanto en la maestría como en el doctorado.

A mis amigos del laboratorio 23, por los momentos divertidos y el apoyo que nos brindamos

DEDICATORIAS

Para mi familia, por su cariño.

Para Gloria, porque sin ti no estaría aquí ahora y para Elías, por todo lo que me enseñas.

INDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	i
INDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES.....	5
1. MUERTE CELULAR	5
1.1 MUERTE CELULAR REGULADA	6
1.2 MUERTE CELULAR PROGRAMADA	9
1.3 APOPTOSIS	10
1.4 MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA	11
1.5 NECROSIS	12
1.6 MUERTE CELULAR REGULADA EN PLANTAS	13
1.7 MUERTE CELULAR REGULADA INDUCIDA POR ESTRÉS POR CALOR.	14
1.8 FOSFOINOSÍTIDOS.....	15
1.8.1 FOSFOINOSÍTIDOS DURANTE EL ESTRÉS Y LA MUERTE CELULAR REGULADA	16

INDICE

1.9 ÁCIDO FOSFATÍDICO	19
1.10 BIOSENSORES DE FOSFOINOSÍTIDOS	20
1.11 FIBRILARINA	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
CAPÍTULO II	27
MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PH SILVESTRE, PH-W36F DE LA PLC- δ 1 Y DE SPO20	27
2.2 MARCAJE FLUORESCENTE DEL DOMINIO PH DE LA PLC- δ 1	28
2.3 INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR REGULADA	28
2.4 EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>BRASSICA OLERACEA</i>	29
2.5 CORTES HISTOLÓGICOS DE <i>BRASSICA OLERACEA</i>	29
2.6 CORTES HISTOLÓGICOS CON CRIOSTATO	29
2.7 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BIOSENSORES DE FOSFOINOSÍTIDOS	30
2.8 CLONACIÓN DEL DOMINIO PH Y EL DOMINIO XY-E341A DE LA PLC- δ 1 EN EL VECTOR PET-15B	31

INDICE

2.8.1 CLONACIÓN EN PGEM-T EASY	31
2.8.2 SUBCLONACIÓN EN PET-15B	32
2.9 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DOMINIO PH-HIS	33
2.10 INMUNODETECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS PH SILVESTRE, PH-W36F, PH-HIS Y SPO20	33
2.11 EXTRACCIÓN DE PIPs	34
2.12 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y TLC PARA SEPARAR PIPs	34
2.13 MARCAJE RADIATIVO DE FOSFOINOSÍTIDOS CON ³² P	35
CAPÍTULO III	37
RESULTADOS	37
3.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DOMINIO PH DE LA PLC- δ 1	37
3.2 ENSAYOS DE INMUNOFUORESCENCIA CON EL DOMINIO PH DE LA PLC- δ 1	38
3.3 INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR REGULADA	39
3.4 ANÁLISIS DEL ADN DE <i>BRASSICA OLERACEA</i> POSTERIOR A LA INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR	40
3.5 CLONACIÓN DEL DOMINIO PH EN EL PLÁSMIDO PET-15B	41
3.6 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DOMINIO PH-HIS Y DEL DOMINIO XY-E341A DE LA PLC δ 1	44
3.7 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE SPO20	45
3.8 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DOMINIO PH-W36F	45
3.9 EXTRACCIÓN DE PIPs, CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y TLC	46

INDICE

3.10 MARCAJE RADIOACTIVO DE FOSFOINOSÍTIDOS CON ³² P	48
3.11 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BIOSENSORES DE FOSFOINOSÍTIDOS	49
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPs.....	51
4.1 AROMATIC AMINO ACIDS AND THEIR RELEVANCE IN THE SPECIFICITY OF THE PH DOMAIN	52
DISCUSIÓN GENERAL	66
INDUCCIÓN DE MCR EN <i>B. OLERACEA</i>	66
DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LOS PIPs NUCLEARES.....	69
CONCLUSION.....	74
PERSPECTIVAS	75
REFERENCIAS	76
ANEXOS	95
A.1 <i>BRASSICA</i> AS A MODEL TO STUDY STRESS AND CELL DEATH	95
A.2 THE EFFECT OF PLANT STRESS ON PHOSPHOINOSITIDES	109
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1.1 Clasificación de la muerte celular	6
Figura 1.2. Clasificación morfológica de la muerte celular regulada en animales y plantas	8
Figura 1.8. Diagrama experimental.....	26
Figura 3.1. Purificación del dominio PH silvestre.....	37
Figura 3.2. Ensayo de inmunofluorescencia con el dominio PH-Alexa 488	38

INDICE

Figura 3.3. Cortes histológicos teñidos con DAPI y marcados con el dominio PH-Alexa 488.	40
Figura 3.4. comparación del ADN genómico de <i>Brassica oleracea</i>	41
Figura 3.5 Clonación del dominio PH en pGEM T easy.....	42
Figura 3.6. Clonación del dominio PH en pet15b.....	43
Figura 3.7 Purificación del dominio PH-His.....	44
Figura 3.8 Purificación de Spo20.....	45
Figura 3.9. Purificación del dominio PH-W36F.....	46
Figura 3.10. Fatblots y cromatografías en membrana de nitrocelulosa de las extracciones de PIPs.....	48
Figura 3.11. TLC de los fosfolípidos de inflorescencias de coliflor.....	48
Figura 3.12. TLC y cromatografía en nitrocelulosa de fosfolípidos marcados con ³² P	49
Figura 3.13. Purificación de los biosensores de PIPs	50
Figure 4.1 Selection of residues for site direct mutagenesis	59
Figure 4.2 Purification of the wild type and mutated PH domains and determination of their specificities	60
Figure 4.3 Surface changes in PIP recognition site of wt and mutants PH domains.....	62
Figure A.1. Cell death can be due to a failure of the adaptive response to a stimulus or be part of the normal development of an organism.....	98
Figure A.2. Histological slices of <i>Brassica oleracea</i> inflorescences stained with DAPI observed with a fluorescence microscope.....	107
Figure A.3. Histological slices of <i>Brassica oleracea</i> inflorescences under heat stress.....	109
Figure A.4 Phosphoinositides in plant stress	117

INDICE

Figure A.5. Stress related protein with PIP interaction.	126
---	-----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Clasificación bioquímica de la muerte celular regulada.	9
Cuadro 1.2. Proteínas que regulan la muerte celular que interactúan con PIPs.	19
Cuadro 2.1. Biosensores usados para detectar PIPs en el núcleo de <i>B. oleracea</i>	31
Cuadro 2.2 Programación del termociclador para la amplificación del dominio PH y XY-E341A.	32

ABREVIATURAS

aa:	Aminoácidos
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
AtMTM1	miotubularina mitocondrial de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATX-1	factor tipo tritórax de <i>Arabidopsis thaliana</i>
CysP:	cisteína proteasa
DAG	diacilglicerol
D:O.	densidad óptica
Dominio PH	dominio de homología a pleckstrina
Fib:	fibrilarina
GST	glutación S transferasa
His6	hexahistidina
IP ₃	inositol 1,4,5 trisfosfato
MC:	Muerte celular
MCA:	Muerte celular accidental
MCP:	Muerte celular programada
MCR:	Muerte celular regulada
PA	Ácido fosfatídico

PIPs	Fosfoinosítidos
PI(3)P	fosfatidilinositol 3 fosfato
PI(4)P	fosfatidilinositol 4 fosfato
PI(5)P	fosfatidilinositol 5 fosfato
PI(3,4)P ₂	fosfatidilinositol 3, 4 bisfosfato
PI(3,5)P ₂	fosfatidilinositol 3, 5 bisfosfato
PI(4,5)P ₂	fosfatidilinositol 4, 5 bisfosfato
PI(3,4)P ₃	fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato
PI(4,5)P ₂	fosfatidilinositol 4, 5 bisfosfato
PI(3,4,5)P ₃	fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato
PIPs	fosfoinosítidos
PLC:	Fosfolipasa C
PLD:	Fosfolipasa D
Pb	pares de bases
PBS	amortiguador fosfato salino
PBS-T	amortiguador fosfato salino más tween 20
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
TLC:	Cromatografía de capa fina

RESUMEN

La muerte celular regulada (MCR) en plantas es un fenómeno que aún no está claramente entendido. La nomenclatura de la MCR en células animales, enumera tres formas principales de la misma: la necrosis, la muerte celular autofágica y la apoptosis y estas a su vez se subdividen de acuerdo a la morfología y mecanismos particulares. En plantas se ha propuesto clasificarla en muerte celular autolítica y no autolítica.

Los fosfoinosítidos son lípidos derivados del fosfatidilinositol. Se sabe que están implicados en la regulación de procesos como el tráfico de membranas, la endocitosis, la exocitosis y señalización celular. Los fosfoinosítidos localizados en el núcleo celular han sido relacionados con proteínas que participan en el remodelado de la cromatina, el procesamiento del ARN mensajero y otros procesos nucleares, aunque la manera en que participan en estos procesos es poco clara.

En trabajo se busca estudiar los cambios en la distribución de los fosfoinosítidos nucleares durante un proceso en el que su morfología se ve claramente modificada, como lo es la muerte celular regulada a través de microscopia confocal, usando biosensores que nos permitan visualizarlos.

Se pudo observar cambios en la morfología nuclear con todos los tratamientos para inducir muerte celular, entre ellos núcleos condensados, en forma de media luna o fragmentados.

Se observó que con tratamientos de 45 °C a partir de dos horas en inflorescencias de *B. oleracea* se observan núcleos condensados en forma de media luna y ADN genómico degradado, característicos de la muerte celular apoptótica.

El cambio de distribución de fibrilarina (Fib) en núcleos de células estresadas sugieren que Fib puede ser usado como es un biosensor que puede servir tanto para determinar estrés en las células de coliflor al igual que puede actuar como un sensor de fosfolípidos nucleares, debido a que es capaz de interactuar con ellos a través de una unión directa.

ABSTRACT

Regulated cell death (RCD) in plants is a phenomenon that is not yet clearly understood. The nomenclature of the RCD in animal cells, lists three main forms of it: necrosis, autophagic cell death and apoptosis; and these in turn are subdivided according to morphology and particular mechanisms. in autolytic and non-autolytic cell death.

Phosphoinositides are lipids derived from phosphatidylinositol. It is known that they are involved in the regulation of processes such as membrane trafficking, endocytosis, exocytosis and cell signaling. Phosphoinositides located in the cell nucleus have been related to proteins involved in chromatin remodeling, mRNA processing and other nuclear processes, although the way in which they participate in these processes is unclear.

The aim of the work is to study changes in the distribution of nuclear phosphoinositides during a process in which their morphology is clearly modified, such as regulated cell death through confocal microscopy, using biosensors that allow us to visualize them.

We observed changes in nuclear morphology with all treatments to induce cell death, including condensed nuclei, crescent-shaped or fragmented.

Temperature treatment of 45 °C from two hours in inflorescences of *B. oleracea*, induced condensed nuclei in the form of half moon and degraded genomic DNA, characteristic of apoptotic cell death.

The change in the distribution of fibrillarlin (Fib) in stressed cell nuclei suggests that Fib can be used as it is a biosensor that can serve both to determine stress in cauliflower cells as well as can act as a sensor of nuclear phospholipids, because it is capable of to interact with them through a direct union.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular ocurre cuando a la célula le es imposible restablecer su homeóstasis debido a estímulos externos o bien ocurre como parte del desarrollo de la célula (Duprez *et al.*, 2009). La muerte celular se puede clasificar en muerte celular accidental (MCA) y muerte celular regulada (MCR) (Galluzzi *et al.*, 2012).

La MCA sucede cuando los estímulos externos son tan intensos que la célula muere sin ningún tipo de regulación y de manera instantánea, mientras que la MCR ocurre bajo controles bioquímicos y moleculares establecidos (Galluzzi *et al.*, 2015; Galluzzi *et al.*, 2012). Ambos tipos de muerte celular son causados por factores como el estrés biótico y el estrés abiótico, sin embargo, cuando la MCR es parte del programa de desarrollo de una célula, se habla de muerte celular programada (MCP)(Galluzzi *et al.*, 2015).

En células animales hay tres clases principales de MCR: la necrosis, la muerte celular autofágica y la apoptosis(Kroemer *et al.*, 2009; van Doorn, 2011). En células vegetales el conocimiento sobre la muerte celular es escaso. Aunque existe coincidencia en los aspectos morfológicos y bioquímicos entre la muerte celular en plantas y animales, la anterior clasificación no se corresponde completamente entre unos y otros, por lo que se ha sugerido clasificar la MCR de plantas en muerte celular autofágica y no autofágica(van Doorn *et al.*, 2011).

Se sabe que existen proteínas que controlan MCR y muchas de ellas se encuentran en el núcleo celular. Proteínas como las caspasas, la fosfatasa PTEN, las proteínas tipo mTOR que regulan distintos tipos de muerte celular interactúan con moléculas lipídicas llamadas fosfoinosítidos (Echard, 2012; Martin-Belmonte *et al.*, 2007).

Los fosfoinosítidos (PIPs) son fosfolípidos derivados del fosfatidilinositol (PI) que está compuesto por una molécula de diacilglicerol (DAG) unida por un puente de fosfato a un anillo de inositol.

El anillo de inositol puede ser reversiblemente fosforilado en sus posiciones 3, 4 y 5, lo que da lugar a siete posibles polifosfoinosítidos: fosfatidil inositol 3-monofosfato (PI(3)P),

fosfatidil inositol 4-monofosfato (PI(4)P), fosfatidil inositol 5-monofosfato (PI(5)P), fosfatidil inositol 3, 4-bisfosfato (PI(3,4)P₂), fosfatidil inositol 3, 5-bisfosfato (PI(3,5)P₂), fosfatidil inositol 4, 5-bisfosfato (PI(4,5)P₂), y fosfatidil inositol 3, 4, 5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃).

Los PIPs actúan en muchos procesos de transducción de señales y otros procesos fisiológicos entre los que se encuentran la respuesta a estrés biótico y abiótico, la dinámica del citoesqueleto, la migración y la polaridad celular y el tráfico vesicular en organismos eucariotas, así como la muerte, la proliferación y la diferenciación celular (Echard, 2012) (Balla, 2013; Dieck *et al.*, 2012).

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Muerte celular

El equilibrio homeostático de un organismo depende del mantenimiento constante del balance entre la supervivencia y la muerte celular (Berghe *et al.*, 2014). Esto quiere decir que la muerte celular es parte del desarrollo normal y los ciclos de maduración y también es parte de muchos patrones de respuesta de los tejidos vivos a agentes xenobióticos (Kanduc *et al.*, 2002).

Para crear una clasificación más precisa de los diferentes procesos de muerte celular se creó el Nomenclature Committee on Cell Death (Comité de Nomenclatura de Muerte Celular) o NCCD. El propósito de este comité es el de tratar de establecer un consenso entre los distintos conocimientos en este campo de la investigación y evitar confusiones.

La muerte de una célula puede establecerse cuando esta ha perdido la integridad de su membrana plasmática, lo que resulta en una morfología irreconocible de la misma; así mismo también ocurre cuando la célula, incluyendo su núcleo, se fragmentan en cuerpos discretos y en el caso de las células animales, el cadáver o sus fragmentos son fagocitados por células especializadas o por células adyacentes (Galluzzi *et al.*, 2007).

Igualmente se han establecido puntos de no retorno que desencadenan el conjunto de eventos que provocan la muerte celular: la activación masiva de caspasas, la disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), una completa permeabilización de la membrana mitocondrial y la exposición de fosfatidilserina (PS) en las membranas biológicas (Kroemer *et al.*, 2009).

La muerte celular puede dividirse en dos grandes tipos (figura 1.1): la muerte celular accidental (Bone *et al.*, 1994) y la muerte celular regulada (MCR) (Galluzzi *et al.*, 2012).

La MCA es un proceso pasivo que ocurre cuando la intensidad de un estímulo físico, químico o mecánico es tan grande que la integridad celular se deteriora de manera descontrolada y ocurre de manera instantánea, mientras que durante la MCR, se activa

CAPÍTULO I

una maquinaria genética específica que dirige este tipo de muerte celular, siempre y cuando el estímulo externo no sea desmesurado o bien, puede ser parte de un programa de desarrollo celular y es entonces que se habla de muerte celular programada (MCP) (Galluzzi *et al.*, 2015).

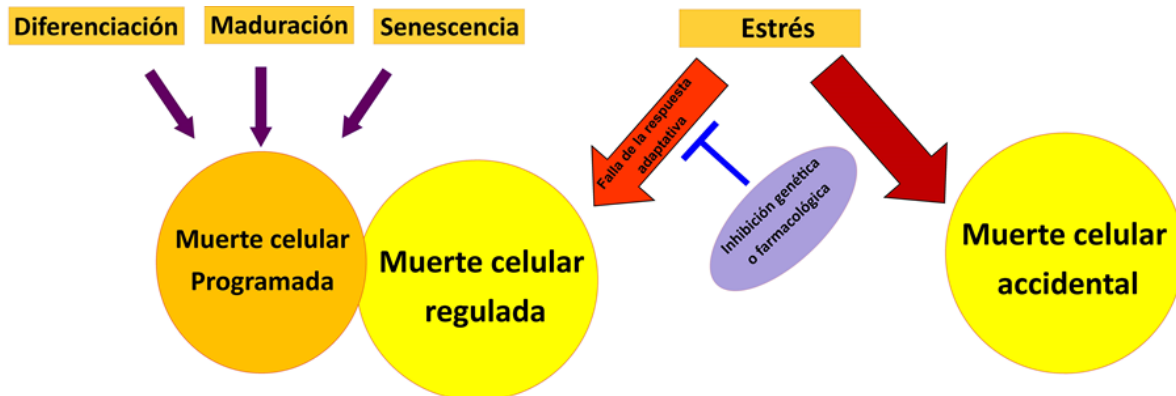


Figura 1.1 Clasificación de la muerte celular. La muerte celular puede deberse a una falla de la respuesta adaptativa un estímulo o ser parte del desarrollo normal de un organismo. Existen dos categorías de muerte celular: accidental y regulada. Lo que desencadena una u otra es la intensidad de un estímulo externo. Cuando la muerte celular regulada es parte del ciclo de vida normal de una célula o tejido entonces es una muerte celular programada.

1.1 Muerte celular regulada

La MCR es un proceso crucial por el que los organismos pluricelulares mantienen su homeostasis o la de uno de sus tejidos, aunque también puede ser parte del proceso de desarrollo de los mismos y entonces es nombrada MCP (Duprez *et al.*, 2009).

La MCR es un proceso activo por el que se eliminan células específicas que pueden representar una amenaza para un organismo completo. Por esta razón en la MCR, las vías de señalización molecular que rigen las diferentes formas de la misma, son ordenadas y están estrictamente controladas (Ashkenazi y Salvesen, 2014).

A diferencia de la MCA, la MCR puede ser influenciada por vía farmacológica o genética específica. Haciendo uso de inhibidores específicos para cada manifestación particular de MCR, se pueden detener o retardar los eventos que controlan la muerte de las células (Galluzzi *et al.*, 2015).

CAPÍTULO I

El primer reporte de distintos tipos de muerte celular se hizo en embriones de ratón (Schweichel y Merker, 1973). Se observaron tres morfologías diferentes de muerte celular después de exponer los embriones a toxinas: muerte celular de tipo I, que fue asociada con la heterofagia; la muerte celular de tipo II, asociada con la autofagia y la muerte celular tipo III, en la que no estaba relacionada ningún tipo de digestión. Hoy en día estos tres modos de muerte celular se refieren a la apoptosis, a la muerte celular relacionada con la autofagia y a la necrosis respectivamente (Berghe *et al.*, 2014).

La MCR (figura 1.2) en células animales se puede dividir morfológicamente en los tres tipos citados anteriormente: apoptosis, autofagia y necrosis, mientras que bioquímicamente puede dividirse en: anoikis, muerte celular autofágica, apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas, apoptosis extrínseca por receptores de muerte, apoptosis extrínseca por receptores dependientes, cornificación, entosis, necrosis, catástrofe mitótica, netosis, partanatos, piroptosis y paraptosis (cuadro 1.1) (Galluzzi *et al.*, 2012).

En plantas, el conocimiento sobre la MCR es muy escaso, ya que en las células animales (principalmente humanas) su estudio es fundamental debido su implicación en enfermedades como el cáncer.

Se ha propuesto dividir a la MCR de plantas en dos categorías morfológicas: la muerte celular autolítica y no autolítica. La principal diferencia entre ambas es que en la muerte celular autolítica la liberación de diferentes hidrolasas que degradan proteínas, lípidos y otras moléculas, provocan un aclaramiento rápido del citoplasma y la destrucción del tonoplasto, mientras que en la muerte celular no autolítica, el aclaramiento del citoplasma es más lento y la ruptura del tonoplasto ocurren después de la muerte celular. La muerte celular no autolítica puede definirse en términos negativos con respecto de la autolítica. La muerte celular de tipo autofágica de los animales y la necrosis tienen ciertas similitudes con la muerte celular autolítica y no autolítica respectivamente (van Doorn, 2011).

CAPÍTULO I

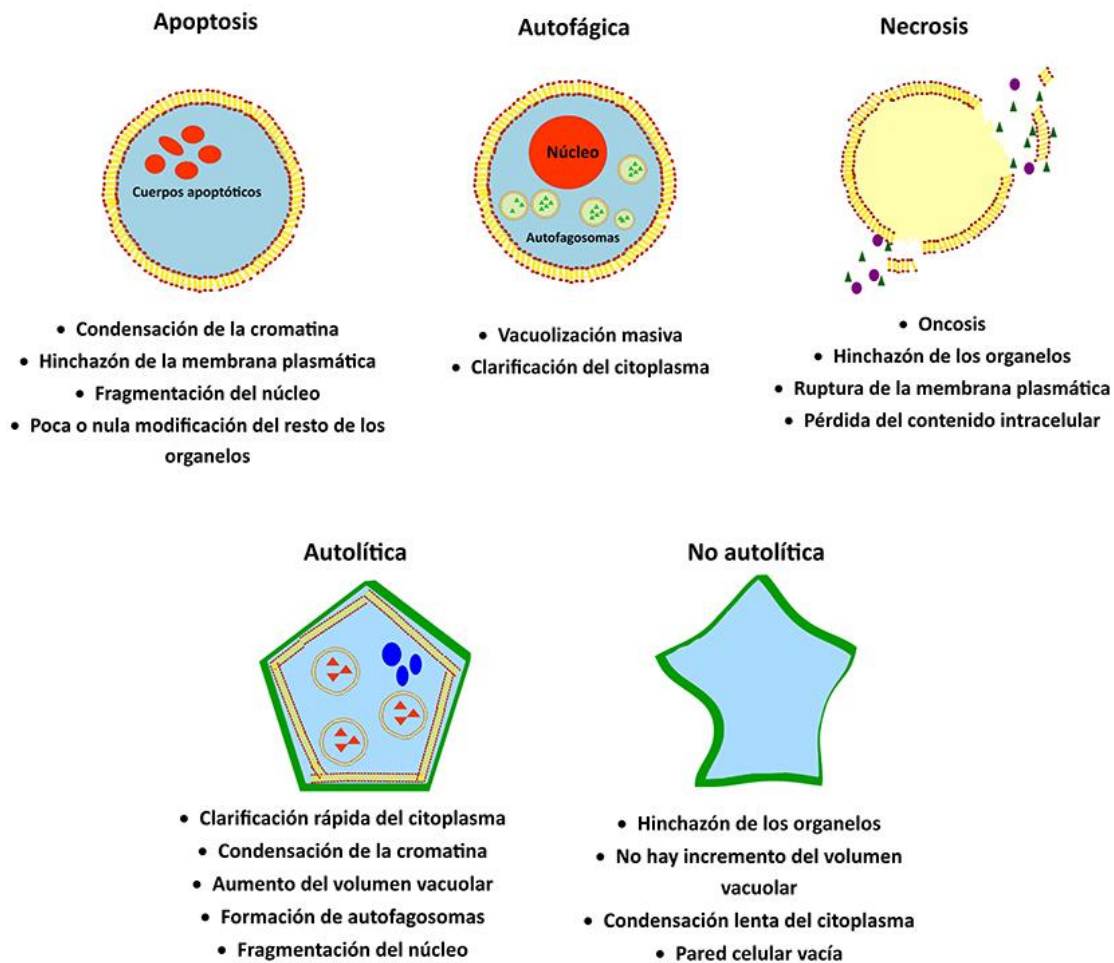


Figura 1.2. Clasificación morfológica de la muerte celular regulada en animales y plantas. El conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares de la MCR en plantas es escaso. En células animales se puede dividir en los tres tipos principales: apoptosis, autofagia y necrosis sin embargo existen otros más como paraptosis, piroptosis y catástrofe mitótica. En plantas se puede dividir en muerte celular autolítica y no autolítica, con características similares a la MCR en animales.

La muerte celular autolítica se observa durante estreses moderados y durante el desarrollo normal de la planta, por ejemplo, durante la embriogénesis. La muerte celular no autolítica puede observarse durante las interacciones planta-patógeno en la respuesta

CAPÍTULO I

hipersensible (Kabbage *et al.*, 2017; van Doorn, 2011; van Doorn *et al.*, 2011)

Aunque en plantas no existe la apoptosis, si existe muerte celular regulada por proteínas con actividad de caspasas, también llamada de tipo apoptótica. Estas “fitocaspasas” se acumulan en el citoplasma de las células vegetales sometidas a estrés biótico y abiótico y su actividad puede ser inhibida por los mismos inhibidores de las caspasas de células animales (Bonneau *et al.*, 2008; Chichkova *et al.*, 2012; del Pozo y Lam, 1998; Tewari *et al.*, 2013; Vacca *et al.*, 2007).

Cuadro 1.1 Clasificación bioquímica de la muerte celular regulada.

Nombre	proteinas implicadas	Características morfológicas
Apoptosis intrínseca dependiente de caspasas	DIABLO, Caspasas 3, 8 y 9	Picnosis, condensación de la cromatina, cariorrexis, poca o nula modificación del resto de los organelos, hinchazón de la membrana plasmática
Apoptosis intrínseca independiente de caspasas	AIF, ENDOG, BCL2	Apoptótica
Apoptosis extrínseca dependiente de caspasas	TNFR1, Fas/CD95, TRAIL-R, RIP1, caspasas 3 y 9	Apoptótica
Apoptosis extrínseca independiente de caspasas	IMS, BCL-2	Apoptótica
Muerte celular autofágica	AKT, TOR, PI3K	Vacuolización masiva y clarificación del citoplasma
Necrosis	TNFR1, Fas/CD95, TRAIL-R, RIP1, RIP3	Oncosis, hinchazón de los organelos, ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido intracelular
Paraptosis	IGFR1, BCL2	Vacuolización citoplasmática e hinchazón mitocondrial
Piroptosis	Caspasas 1 y 7	Apoptótica/necrotica

1.2 Muerte celular programada

El concepto de MCP fue acuñado en 1964 cuando Lockshin y Williams describieron la muerte celular que se desarrolla durante la metamorfosis de insectos (Berghe *et al.*, 2014).

La gran mayoría del conocimiento que se tiene sobre la MCP proviene de tres modelos

CAPÍTULO I

principales: el nematodo *Caenorhabditis. elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el ratón (Fuchs y Steller, 2011).

La MCP se refiere a los casos fisiológicos de muerte celular, sin importar los mecanismos moleculares que la regulan, que ocurren como parte del desarrollo embrionógico o post embrionógico, y para mantener la homeostasis de un tejido, refiriéndose en este caso al equilibrio entre la muerte y la proliferación celular. (Galluzzi *et al.*, 2012).

La MCP es fundamental para el correcto desarrollo de las plantas y los animales, la metamorfosis de anfibios e insectos, la morfogénesis de los órganos, y el recambio celular. (Joza *et al.*, 2001). Una función anormal de la MCP, resulta en la aparición de múltiples enfermedades, incluyendo desórdenes del desarrollo en plantas y animales, así como enfermedades degenerativas y cáncer (Fuchs y Steller, 2011).

1.3 Apoptosis

Durante muchos años la apoptosis fue considerada sinónimo de muerte celular regulada, mientras que se consideraba a la necrosis como su contraparte, en la que la apoptosis era definida como una muerte celular especial bioquímicamente controlada y activa, mientras que la necrosis era un tipo de muerte pasiva, sin ningún control bioquímico establecido, denominada como una muerte celular ordinaria (Kanduc *et al.*, 2002).

El primero en asignar características morfológicas definidas a la apoptosis fueron (Kerr *et al.*, 1972). Ellos usaron microscopía electrónica para definir dos etapas en el proceso de la muerte por apoptosis en células de hígado y endometrio de ratas teñidas con citrato de plomo y acetato de uracilo: la primera comprendía la formación de cuerpos apoptóticos y la segunda, la fagocitosis y degradación de estos cuerpos por otras células.

La apoptosis genera una serie de cambios morfológicos: un redondeo de las células, reducción del volumen celular (picnosis) condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrexis), poca o nula modificación del resto de los organelos, sangrado de la membrana plasmática, aunque mantiene su integridad hasta la etapa final y finalmente son engullidas por fagocitos (*in vivo*) (Kroemer *et al.*, 2009).

CAPÍTULO I

En la apoptosis está involucrada una familia de cisteína-aspartato proteasas que realizan la proteólisis en el residuo de aspartato, mediada a través del residuo de cisteína denominadas caspasas. Estas se dividen en aquellas que son iniciadoras y las efectoras, por ejemplo las caspasas 8 y 3, respectivamente (Ashkenazi y Salvesen, 2014).

Existen dos vías que regulan la apoptosis. La vía extrínseca está regulada por una serie de receptores y factores específicos que desencadenan la activación de la caspasa 8 y posteriormente la activación de la caspasa 3. En la vía intrínseca, es la mitocondria la que desempeña un papel regulador, en la que se activa la caspasa 9 y posteriormente la caspasa 3, llevando a la muerte de la célula (Ouyang *et al.*, 2012).

Aunque en plantas, existen múltiples evidencias de que existen proteínas homólogas a las caspasas de animales, que desempeñan roles similares en la muerte celular regulada de plantas, estas carecen de células que fagociten los cuerpos apoptóticos, por lo que se acepta que en plantas no hay apoptosis desde un criterio puramente morfológico (van Doorn, 2011).

1.4 Muerte celular autofágica

La autofagia es un mecanismo conservado en eucariotas por el cual los organismos degradan y reciclan componentes celulares (Duprez *et al.*, 2009). Los organelos son secuestrados por vacuolas de doble membrana denominadas autofagosomas para después ser degradados por diversas hidrolasas (Galluzzi *et al.*, 2007).

La muerte celular autofágica ha sido caracterizada morfológicamente (principalmente a través de la microscopia de transmisión de electrones) como un tipo de muerte celular acompañada de una vacuolización masiva del citoplasma y una clarificación del mismo, sin asociación con fagocitos (Kroemer *et al.*, 2009).

La autofagia es un fenómeno constante en las células de los organismos y no necesariamente implica muerte celular. En animales la autofagia puede inhibir, alterar, promover o no tener ningún efecto sobre la muerte celular, pero esto depende del tipo de célula, los niveles de estrés o la autofagia basal del organismo (Marino *et al.*, 2014).

Bioquímicamente la muerte celular autofágica está relacionada con la lipidación de la

CAPÍTULO I

proteína asociada a microtúbulos LC3 o un incremento en la degradación de sustratos autofágicos como secuestosoma 1 (SQSTM1) y con la enzima TOR, una cinasa que forma parte de la vía de señalización de la cinasa PI3K-AKT-mTOR. (Galluzzi *et al.*, 2012).

La enzima homóloga de TOR en mamíferos llamada mTOR, regula a las cinasas ULK1 y ULK2. Durante la falta de nutrientes, mTOR hiperfosforila a estas cinasas impidiendo que formen un complejo con otras proteínas que median la formación de los autofagosomas (Ouyang *et al.*, 2012).

1.5 Necrosis

La necrosis fue considerada durante muchos años, sinónimo de muerte celular accidental. Un mecanismo totalmente opuesto a la apoptosis que era considerada a su vez como una muerte celular programa (Kanduc *et al.*, 2002).

La necrosis caracteriza morfológicamente por una ganancia en el volumen celular (oncosis), hinchazón de los organelos, ruptura de la membrana plasmática y la consiguiente pérdida del contenido intracelular (Kroemer *et al.*, 2009).

La falta de un mecanismo de regulación de la necrosis, comenzó a ser cuestionada cuando se observó que el factor de necrosis tumoral TNF, podía inducir muerte celular apoptótica y necrótica en células de fibroblasto de ratón F17 (Laster *et al.*, 1988). Posteriormente, al emplear péptidos inhibidores de caspasas en células fibrosarcoma de ratón L929 y células HeLa, los efectos del TNF fueron mayores y en las células hubo un incremento en la concentración de las especies reactivas de oxígeno lo que las indujo a la muerte celular (Vercammen *et al.*, 1998).

Igualmente se descubrió que las cinasas RIPK1 y RIPK2, son indispensables en la necrosis regulada por TNF. Esta vía de señalización activa al factor nuclear κ B. Este factor regula positivamente genes que inhiben la apoptosis y desencadenan la necrosis (Vandenabeele *et al.*, 2010).

La necrosis puede ser evitada inhibiendo a la cinasa RIP1. Se comprobó que en células linfocitarias humanas Jurkat, el inhibidor de la necrosis, necrostatina-1 actúa directamente

CAPÍTULO I

sobre RIP1 impidiendo su autofosforilación y deteniendo los mecanismos moleculares que desencadenan la necrosis.

1.6 Muerte celular regulada en plantas

En células animales se reconocen tres categorías principales de muerte celular. Estas categorías se basan en características morfológicas y son la apoptosis, la muerte celular autofágica y la necrosis (Kroemer *et al.*, 2009).

Las características morfológicas y bioquímicas de la MCR en plantas y animales, no corresponden completamente. Debido a lo anterior se ha propuesto dividir la MCR de plantas en dos categorías: muerte celular autolítica y no autolítica.

La muerte de tipo autolítica es causada cuando por la ruptura del tonoplasto seguida por un rápido aclaramiento del citoplasma. Este tipo de muerte regulada ocurre durante el desarrollo normal de las plantas y durante estrés abiótico leve. En la muerte de tipo no autolítica, la ruptura del tonoplasto y el aclaramiento ocurre después de la muerte celular. La muerte regulada no autolítica tiene lugar principalmente durante interacciones planta-patógeno (van Doorn, 2011).

En la muerte celular autolítica participan una gran variedad de hidrolasas, entre estas, proteínas de tipo caspasas. La muerte celular no autolítica se presenta en la respuesta hipersensible, se caracteriza por un anillo de células muertas que cercan a un organismo patógeno (van Doorn *et al.*, 2011).

Las plantas no tienen apoptosis, ya que las plantas carecen de células que fagociten los cuerpos apoptóticos, sin embargo, existen procesos donde se puede observar una morfología similar a la apoptosis, por ejemplo, durante la formación del xilema, la incompatibilidad del polen, y el desarrollo de los embriones. Además de esto, existen proteínas de tipo caspasas que llevan a cabo funciones similares en la muerte celular de plantas y animales (Chichkova *et al.*, 2012).

En cultivos celulares de protoplastos de masas proembriónicas proliferativas y de embriones somáticos tempranos de *Picea abies* se observó que existen dos etapas en la que se manifiesta la MCP y que son indispensables para la formación correcta de los

CAPÍTULO I

embriones. Esto se demostró mediante la detección de ADN fragmentado utilizando dUTP acoplado a fluoresceína observando una fragmentación de ADN durante estas dos etapas de desarrollo (Filonova *et al.*, 2000).

El arroz (*Oryza sativa*) forma raíces adventicias en los nodos del tallo durante su desarrollo normal. Este desarrollo es precedido por la muerte de las células epidérmicas inducida por H₂O₂. Se detectó que el H₂O₂, se acumulaba en las células superiores de las raíces adventicias actuando como una señal que induce la muerte de estas células (Steffens y Sauter, 2009).

1.7 Muerte celular regulada inducida por estrés por calor

Todos los organismos, incluidas las plantas están sufriendo constantemente las condiciones cambiantes del ambiente y los ataques de patógenos. Estos cambios pueden provocar estrés en los seres vivos, que inician un proceso de adaptación para lograr mantener el equilibrio homeostático (Mittler, 2006).

El estrés desencadena una mayor producción de ROI (especies reactivas de oxígeno) lo que actúa como una señal para la activación de vías de respuesta a estrés (Mittler, 2002), pero cuando estos mecanismos de defensa no son suficientes, pueden provocar muerte celular.

El estrés por calor afecta a una gran variedad de organismos y las plantas no son la excepción. El estrés por calor provoca pérdidas de la viabilidad de distintos cultivos. Debido al calentamiento global, se prevé que las altas temperaturas se conviertan en factor limitante para la producción, por lo que la investigación sobre la tolerancia al estrés por calor será de gran importancia (Uchida *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015). Las plantas poseen un mayor número de factores de transcripción relacionados a la tolerancia al estrés por calor, a comparación de células animales; esto probablemente se deba a que las plantas no son capaces de trasladarse a otro lugar para mitigar las altas temperaturas (Panchuk *et al.*, 2002).

El estrés abiótico, incluido el estrés por calor afecta distintos organelos celulares incluido el núcleo y las estructuras nucleares. Los cuerpos cajales sufren un cambio en su

CAPÍTULO I

arquitectura debido a una redistribución de sus componentes, principalmente de la coilina, y la fibrilarina dos proteínas que están presentes de manera abundante en estas estructuras. Estos cambios se han observado en células eucariotas, incluidas las plantas, por ejemplo *Arabidopsis* y tabaco (Love *et al.*, 2016).

El nucléolo es otra estructura nuclear que realiza cambios en su morfología durante estrés térmico. Durante este proceso, la estructura nucleolar se rompe y puede desencadenar muerte celular (Boulon *et al.*, 2010). En maíz se observó que el tamaño del nucléolo se incrementaba durante el mismo (Wang *et al.*, 2015) y en caña de azúcar que la proteína chaperona HSP70 (heat shock protein 70) se acumulaba en el nucléolo durante el estrés y una vez que este estímulo desaparecía se relocalizaban al citoplasma (Vierling, 1991).

En células de tabaco BY-2, el estrés térmico provocado por un tratamiento de 55 °C por diez minutos provocó un incremento del H₂O₂, Esto desencadenó la activación de la MCR, provocando la muerte de las células de tabaco a las 72 horas (Vacca *et al.*, 2004).

La MCR inducida por estrés térmico en plantas tiene varias similitudes con la apoptosis en animales. En maíz por ejemplo, se ha observado un patrón de degradación de ADN en forma de escalera, condensación de la cromatina y el incremento en la expresión de genes de proteínas de tipo caspasas (Wang *et al.*, 2015).

1.8 Fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos (PIPs) son ácidos lipídicos poco abundantes derivados del fosfatidil inositol. Estos se encuentran principalmente en la parte citosólica de la membrana plasmática y las membranas intracelulares. En las células de mamíferos representan alrededor del 1.5% de los fosfolípidos de la membrana plasmática mientras que en las membranas de las células vegetales su presencia es menor al 1% (Munnik y Nielsen, 2011).

Los hidroxilos de las posiciones 3, 4, y 5 del fosfatidilinositol pueden ser reversiblemente fosforilados, lo que da lugar a siete posibles polifosfoinosítidos: fosfatidil inositol 3-monofosfato (PI(3)P), fosfatidil inositol 4-monofosfato (PI(4)P), fosfatidil inositol 5-monofosfato (PI(5)P), fosfatidil inositol 3, 4-bisfosfato (PI(3,4)P₂), fosfatidil inositol 3, 5-

CAPÍTULO I

bisfosfato (PI(3,5)P₂), fosfatidil inositol 4, 5-bisfosfato (PI(4,5)P₂), y fosfatidil inositol 3, 4, 5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃) (Hille, 2012).

La mayor parte del conocimiento que se tenía sobre los PIPs era relativo a sus funciones como precursores de segundos mensajeros. En la actualidad se sabe que, en los mamíferos, los PIPs pueden controlar algunas funciones celulares, como la polaridad, la migración y la supervivencia celular. Los PIPs también participan en la dinámica del citoesqueleto, el tráfico vesicular y en la identidad de las membranas celulares debido a que las especies de PIPs y su concentración varía de una membrana a otra (Echard, 2012).

En el núcleo participan en funciones como el procesamiento del pre-RNA_m, la expresión de genes y la remodelación de la cromatina, sin embargo el mecanismo por el que los fosfoinosítidos participan en estas funciones se desconoce (Lewis *et al.*, 2011).

De manera similar, la fragmentación de núcleo debida a la MCR se asoció con la recalcitrancia a la regeneración de plantas completas en cultivos de protoplastos de hojas de *Brassica napus*. La inducción de la MCR se atribuyó al estrés causado por proceso de aislamiento de los protoplastos (Watanabe *et al.*, 2002a).

La falta de hierro en cultivos de protoplastos de *Brassica napus* indujo muerte no autolítica. Esta deficiencia en plantas de *B. napus* ocasionaba la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que posteriormente provocaba la detección de una enzima con actividad de tipo caspasa 3. También se observó condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo (Tewari *et al.*, 2013).

1.8.1 Fosfoinosítidos durante el estrés y la muerte celular regulada

Los PIPs actúa en estrés en dos frentes, primero como precursores del segundo mensajero en la detección de estrés y activación de mecanismos de tolerancia al estrés, incluyendo la detección y respuesta al estrés biótico y abiótico (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2015; Ruelland *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015) (Kalachova *et al.*, 2016) y segundo, interactuando directamente con las proteínas, modulando su actividad (Mellman *et al.*, 2008; Ndamukong *et al.*, 2010; Sobol *et al.*, 2018; Yildirim *et al.*, 2013). Por consiguiente,

CAPÍTULO I

pensamos que están involucrados en la muerte celular, no solo como precursores de segundos mensajeros, sino actuando en la formación de complejos proteína-proteína o proteína-ADN y ARN, por consiguiente siendo parte esencial en la organización del núcleo durante distintas etapas del ciclo celular y en eventos como la respuesta a estrés y la MCR donde el núcleo debe sufrir una reestructuración como parte de dichos procesos.

PI(3,5)P₂ fue detectado en células de suspensión de zanahoria bajo estrés osmótico con NaCl (Dove *et al.*, 1997). En *A. thaliana*, PLC hidroliza PI(4,5)P₂ durante el estrés salino en brotes, hojas y raíces. En estos tejidos se ha detectado un aumento en la expresión del ARNm de esta enzima desde la primera hora y alcanza el nivel máximo de expresión en la quinta hora (Hirayama *et al.*, 1995).

Por otro lado, el PI(4)P extracelular parece ser una molécula importante en la interacción planta-patógeno. Este fosfoinosítido aumentó en células en suspensión de tabaco posterior a un tratamiento con xilanasas, una enzima que los hongos utilizan contra las plantas, para degradar la pared celular. Este PIP, agregado de manera exógena desencadena la misma respuesta que la xilanasas, induciendo la producción de ROS como respuesta de defensa y conduciendo a la muerte celular en células en suspensión de tomate (Gonorazky *et al.*, 2008). Una revisión más extensa de los PIPs durante el estrés en plantas puede ser consultada en los anexos de este trabajo.

Aunque no existen muchos trabajos en el que se estudie el papel que juegan los PIPs en el proceso de la muerte celular regulada en plantas, existe evidencia que nos hace pensar que si tienen un rol importante en ésta. Por ejemplo, p53 está relacionada con la apoptosis a través de vías de señalización que dependen de PIPs, principalmente el balance entre PIP₃ y PI(4,5)P₂, manteniendo un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Khandelwal *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2016; Perwez Hussain y Harris, 2006). Así mismo, p53 en plantas está relacionada con la respuesta estrés en plantas y se ha comprobado su capacidad de unirse *in vitro* a PIPs (Khandelwal *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2016),

En plantas y animales se han encontrado que existen proteínas que participan en la MCR, que interactúan con PIPs y cuya actividad está regulada en alguna medida por los mismos

CAPÍTULO I

(cuadro 1.2).

PIP₂ está relacionado con la reparación del ADN por daño UV (Wang *et al.*, 2017) y el mantenimiento de la integridad cromosómica en células humanas (Shen *et al.*, 2007); así como en la respuesta a estrés por calor. Por lo que nosotros esperamos encontrar una presencia mayor de este PIP durante el estrés por calor en nuestro tejido tratado con calor, en contraste con una baja concentración del mismo en núcleos de células sin tratamiento (Mishkind *et al.*, 2009).

La muerte celular autofágica parece estar regulada negativamente por la vía de señalización de la cinasa PI3K. Esta enzima sintetiza a los PIPs PI(3)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, y PI(3,4,5)P₂ (Boss y Im, 2012). En *Drosophila* se observó que larvas sometidas a privación de alimentos para inducir autofagia reducían la actividad de esta enzima, posiblemente por una disminución en la concentración de PIP₃ (Scott *et al.*, 2004).

La proteína TOR, que es regulada por la cinasa AKT1, cuya actividad está estrechamente relacionada con los niveles de PI(3)P y PIP₃ (Kroemer *et al.*, 2008).

El PI(4,5)P₂ inhibe la actividad de la caspasa tipo 9 y PIP₃ la actividad de la caspasa tipo 3. Esta caspasa se une a la enzima PI5K1 α que se encarga de la síntesis de PIP₂ y la inactiva durante la apoptosis. Se comprobó *in vitro* que la presencia de PIP₂ impedía la unión de la caspasa tipo 9 a la caspasa tipo 3 impidiendo su activación, mientras que PIP₃ evitaba la unión de la caspasa tipo 3 a la PI5K1 α (Mejillano *et al.*, 2001).

En un estudio realizado con células de tabaco BY-2 se observó que el PI(4,5)P₂ se incrementa durante el estrés por calor, acumulándose principalmente en el núcleo y la envoltura nuclear, al mismo tiempo que sus niveles decrecen en la membrana plasmática como resultado de un incremento en la actividad de la enzima PLD, además de un aumento en los niveles de ácido fosfatídico (PA del inglés phosphatidic acid) (Mishkind *et al.*, 2009).

CAPÍTULO I

Cuadro 1.2. Proteínas que regulan la muerte celular que interactúan con PIPs.

Proteína	Fosfoinosítido	Tipo de muerte	Referencia
HsCASP 3, 7, 8 y 9	PI(4,5)P ₂	Apoptosis	Mejillano <i>et al.</i> , 2001
HsAKT/PTEN	PI(3,4,5)P ₃	Apoptosis	Shi <i>et al.</i> , 2006
AtCas3	No hay datos	No autolítica	Tewari <i>et al.</i> , 2013
BoPTEN	No hay datos	No autolítica	Gupta <i>et al.</i> , 2002
DmTOR	PI(3)P/ PI(3,4,5)P ₃	Muerte celular autofágica	Kroemer <i>et al.</i> , 2008
AtTOR	No hay datos	No autolítica	Menand <i>et al.</i> , 2002
Bcp53	PI(3,4,5)P ₃	Apoptosis	Khandelwal., 2002

1.9 Ácido fosfatídico

El ácido fosfatídico (PA) la forma fosforilada del diacilglicerol (DAG) que es precursor de otros fosfolípidos, pero además que participa en múltiples procesos celulares como un segundo mensajero en diversas cascadas de señalización en mamíferos y plantas por la acción de la fosfolipasa D (PLD) y/o la acción combinada de PLC y diacilglicerol (DAG) quinasa (Munnik *et al.*, 1996).

Ya se ha mencionado que, en varios eucariotas, como en levaduras, animales y plantas, la PLC se encarga de hidrolizar el PIP₂ y así generar dos mensajeros: DAG e IP₃, de esta manera es necesaria en muchos procesos de las plantas como la respuesta a estrés y el desarrollo. Sin embargo, también existen diferencias entre las PLC de plantas y otros organismos. Una de estas diferencias es parece ser que IP₆ y PA y no DAG e IP₃, las moléculas mensajeras en las vías de señalización de las plantas (Hou *et al.*, 2016; Meijer y Munnik, 2003). El PA se sintetiza a partir de dos vías, primero por la actividad de una PLC y posteriormente de una DAG cinasa; segundo, a partir de la actividad de una

CAPÍTULO I

fosfolipasa D (PLD) que hidroliza fosfatidilcolina.

La síntesis de PA a partir de la actividad de la PLD está relacionada con la respuesta a diferentes fuentes de estrés abiótico como son la salinidad la sequía y el calor. Por ejemplo, junto al aumento del PIP2 nuclear en suspensiones celulares de tabaco (BY-2), también puede observarse un incremento de PA en la membrana plasmática en células expuestas al calor debido a la actividad de PLD como ya se había mencionado anteriormente (Mishkind *et al.*, 2009).

1.10 Biosensores de fosfoinosítidos

Se ha atribuido una gran cantidad de funciones a estas siete moléculas, incluidas algunas específicas del núcleo celular: procesamiento previo al ARNm, expresión génica, remodelación de la cromatina, proliferación y muerte celular (Di Paolo y De Camilli, 2006). Los mecanismos por los cuales los PIP están involucrados en estas funciones no han sido esclarecidos debido a que los enfoques metodológicos actuales que no permiten diferenciar entre el metabolismo de los PIP y los cambios en las interacciones PIP-proteína (Lewis *et al.*, 2011). Por lo cual, muchos estudios han utilizado un biosensor, una molécula, generalmente un dominio proteico, capaz de reconocer un ligando específico (Várnai y Balla, 2006). Como son: PLC, SPO20, AKT, ENT3, ENT5 y tubby.

Recientemente, PLC δ 1-PH, EEA1-fyve GRP1-PH, OSH1-PH, AKT-PH y tubby, fueron utilizados para comparar su localización nuclear en células derivadas de osteosarcoma humano U2OS. Además de evaluar si biosensores específicos para determinado PIP, tiene el mismo patrón nuclear, evaluaron las diferencias de estos patrones en células *in vivo* y fijadas [Kalasova, 2016 #302].

Spo20 fue utilizado para localizar PA en células humanas derivadas del epitelio pigmentario de la retina, RPE1. Aquí se evaluó si este biosensor era capaz de reconocer específicamente el PA presente principalmente en la membrana plasmática, por lo que la microscopía se complementó con ensayos de afinidad *in vitro* con el uso de liposomas, que demostraron que Spo20 es capaz de unirse al PA celular [Horchani, 2014 #145].

CAPÍTULO I

Recientemente, se demostró que el PI(4,5)P₂ es necesario para reclutar proteínas en respuesta al daño del ADN por radiación UV en fibroblastos embrionarios de ratón (línea celular MEF, RPTPα + / +). Se detectó la acumulación de PI(4,5)P₂ en el ADN dañado por radiación UV. Al mismo tiempo, sobreexpresando el dominio PH-plcδ1 con una señal de localización nuclear para secuestrar el PI(4,5)P₂ es posible prevenir el reclutamiento la proteína relacionada con Ataxia telangiectasia y Rad3 (ATR), una proteína necesaria para la reparación del ADN [Wang, 2017 #554].

De la misma manera el dominio PH-plcδ1, Tubby y PH-fyve, se utilizaron en *A. thaliana*, donde analizó la localización de estos biosensores en la raíz. La mayoría de estos biosensores se localizaron principalmente en la membrana plasmática [Simon, 2014 #242].

1.11 Fibrilarina

La fibrilarina (Fib) es una proteína nucleolar de una masa aproximada a los 36 kDa con actividad de metiltransferasa, Fib está implicada en el procesamiento y maduración del ARN ribosomal (ARNr) al igual que en el ensamblaje de ribosomas (Amin *et al.*, 2007; Cerdido y Medina, 1995; Loza-Muller *et al.*, 2015; Newton *et al.*, 2003; Rodriguez-Corona *et al.*, 2017), la metilación de histonas (Loza-Muller *et al.*, 2015) y se ha relacionado con el movimiento del virus y la infección sistémica en las plantas (Canetta *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2017). Esto la asociada a procesos de vital importancia como el desarrollo celular, la progresión viral, la oncogénesis, el estrés celular, la muerte celular y por supuesto, la biogénesis de los ribosomas (Marcel *et al.*, 2013; Newton *et al.*, 2003; Tollervey *et al.*, 1993).

Al obtener mutantes de Fib en levaduras (llamada Nop 1), se observaron que estas mutaciones producían levaduras sensibles a la temperatura, Las mutaciones de las colonias nombradas 1.2 y 1.5 en esta proteína produjeron una inhibición del procesamiento de los ARN ribosomales 18S y 25S mientras que en la mutante 1.3 se produjo una inhibición de la metilación de la subunidad 35S; afectando igualmente la formación de la subunidad 60S en la mutante 1.4 mediante un mecanismo que aún se desconoce (Tollervey *et al.*, 1993).

CAPÍTULO I

Durante el estrés por calor, la organización nucleolar de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* cambia debido a que muchas de las proteínas nucleolares migran hacia el citoplasma, incluida la fibrilarina, esto se observa después de un tratamiento de 42.5 °C durante 1 a 3 horas (Liu *et al.*, 1996). En tratamientos de una hora a 45.5 °C en células HeLa, se pudo observar también esta relocalización de la fibrilarina, que además parece estar asociada a la proteínas hsp70, ya que al inmunoprecipitar dicha proteína es posible detectar Fib al realizar una inmunodetección de la misma en células sin tratamiento y estresadas, sin embargo la señal de Fib es aproximadamente 3 veces mayor en células estresadas, y la cantidad de la misma disminuye conforme las células se recuperan (Kodiha *et al.*, 2005).

Recientemente se describió la interacción entre Fib y PIPs en *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017). AtFib1 y AtFib2 muestran una especificidad diferencial hacia los PIPs, lo que sugiere que estos pueden modular la actividad como ribonucleasa de Fib, una actividad no descrita con anterioridad. Esto abre la posibilidad que la interacción Fib y las proteínas virales dependan de los PIPs, así como la formación de distintos complejos proteicos con Fib, desde que la movilidad y la dinámica de una proteína puede variar debido a su interacción con otras moléculas (Demarco *et al.*, 2006).

AtFib1 y AtFib2 difieren en su dominio GAR, no solo a nivel de estructura primaria, sino también terciario, cambiando en su orientación espacial. Mientras que AtFib1 interactúa *in vitro* fuertemente con PI(4)P y débilmente con PI(3) P, PI(5)P y PI(3,5)P2; AtFib2 muestra un nivel de interacción similar con todos los PIPs y PA. Interesante, GAR parece ser el dominio responsable de la unión a los PIP (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017) y es necesaria para la interacción de proteínas virales. La proteína ORF3 del virus de rosetón de maní (GRV, por sus siglas en inglés) no puede interactuar con mutantes de fibrilarina que carecen de dominio GAR (Canetta *et al.*, 2008).

Mutantes de Fib han mostrado especificidades por PA y PIPs, acompañadas además por diferente dinámica y distribución dentro del núcleo de las células (datos no publicados). Esto resulta particularmente interesante ya que esto sugiere que la interacción de Fib con el PA y los PIPs determina la movilidad de esta enzima, así como su localización y su actividad.

CAPÍTULO I

Se pudo observar que la presencia de PI(5)P incrementa la actividad de ribonucleasa. PI(3,5)P₂, PI(3,5)P₂ y PIP₃, tienen un efecto inhibitorio de dicha actividad. Fib requiere de un ARN guía para metilar los ARNr, uno de estos ARN guías es el ARN pequeño nucleolar (snoRNA) U3. A pesar de que estos PIPs inhiben la actividad de ribonucleasa no impiden la unión de Fib y U3, algo que si ocurre cuando Fib y U3 se incuban con PA (Guillen y Corona, no publicado. Dadas estas observaciones fibrilarina puede ser utilizada como un sensor tanto de PIPs como de estrés en plantas.

Esto pudiera resultar relevante en la respuesta a diferentes tipos de estrés en los seres vivos, ya que se ha observado que tanto la fibrilarina, como el nucléolo cambian su organización en estrés tanto biótico (ataque de virus) como abiótico (calor, frio radiación UV) o inhibidores como la actinomicina D (Boulon *et al.*, 2010).

CAPÍTULO I

JUSTIFICACIÓN

La MCR es un proceso por el que los organismos mantienen la homeostasis de sus tejidos, manteniendo un balance entre la proliferación y la muerte celular y lidiar con diversos tipos de estrés de manera controlada, sin poner en riesgo la viabilidad del organismo completo. Así mismo la MCR es indispensable para el desarrollo adecuado de un organismo, regulando la formación de órganos y la eliminación de tejido innecesario durante cierto proceso del desarrollo como la senescencia.

Existen diversas características que permiten clasificar en distintos tipos a la MCR, éstas pueden ser morfológicas o basadas en criterios moleculares y bioquímicos. Sin embargo, la mayoría de este conocimiento proviene del estudio de células animales, debido a la importancia de la muerte celular en diversas enfermedades humanas, por lo que se desconocen la mayoría de los mecanismos de regulación de la muerte celular en plantas.

Los fosfoinosítidos son lípidos que han sido relacionados con proteínas nucleares que participan en el remodelado de la cromatina, el procesamiento del ARN mensajero y otros procesos. Se sabe que interactúan con proteínas implicadas en el control de la MCR, tales como las caspasas tipo 3 y 8, PTEN, AKT, fibrilarina y mTOR. En las plantas existen homólogos de estas proteínas, pero no está claro si tienen las mismas funciones biológicas o interacción con los mismos fosfoinosítidos que en animales.

El estudio de los fosfoinosítidos en el núcleo de las plantas durante la MCR, bajo diferentes condiciones, que permitan analizar la redistribución de estos y su interacción con proteínas específicas, involucradas con la MCR, puede permitir un mejor entendimiento de la misma, permitiendo además saber si estos mecanismos están conservados en plantas y animales.

Conocer todo esto podría ser útil para entender cómo regulan las plantas la muerte celular durante condiciones de estrés y si es posible manipular los estados de desarrollo y morfogénesis de las mismas.

CAPÍTULO I

HIPÓTESIS

La muerte celular regulada en células de *Brassica oleracea* presentará un patrón nuclear específico de PIPs, los cuales diferirán al de células no estresadas, durante la MCR inducida por calor.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de los fosfoinosítidos nucleares y sus interactores proteicos durante la MCR inducida por estrés térmico en *Brassica oleracea* mediante biosensores de PIPs.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones para el estudio de los fosfoinosítidos nucleares durante la muerte celular regulada en *B. oleracea*.
2. Generar herramientas para la detección de PIPs.
3. Definir la distribución de los fosfoinosítidos nucleares durante la MCR

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental (figura 1.8) propuesta para cumplir con los objetivos específicos constó de las siguientes etapas:

Se expresaron dominios de unión a fosfoinosítidos, además del dominio Spo20, PH-his y se marcó con el fluoróforo Alexa 488 el dominio PH-PLC- δ 1.

Las muestras de inflorescencias de *Brassica oleracea* se sometieron a distintos tratamientos para inducir MCR, y se realizaron cortes histológicos de las mismas.

Los cortes fueron utilizados para realizar inmunolocalización de PIPs para determinar si existen cambios en los patrones de distribución de los PIPs para cada tratamiento.

En paralelo, se desarrollaron herramientas que en un futuro puedan ser usadas para detectar PIPs, tanto en las células como *in vitro*. Incluidos el dominio XY-E341A y el uso de biosensores para la detección de PIPs en extracciones de fosfolípidos.

CAPÍTULO I

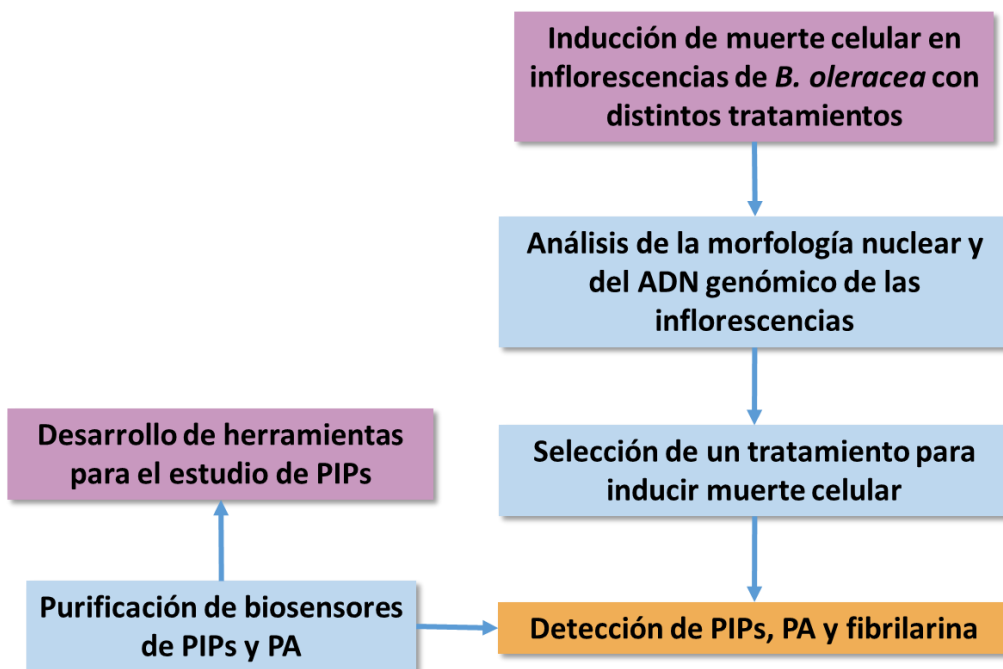


Figura 1.8. Diagrama experimental. Se indujo la MCR a tejidos de *Brassica oleracea* mediante distintos tratamientos. Se expresaron dominios de unión a PIPs para detectarlos en los núcleos de *B. oleracea*.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Expresión y purificación de los péptidos PH silvestre, PH-W36F de la PLC- δ 1 y de Spo20

Se inocularon bacterias *Escherichia coli* BL21 con las secuencias silvestre del dominio PH de la PLC- δ 1 y su mutante W36F, clonadas en el plásmido pGST3, en 3 mL de medio de cultivo Luria Bertani o LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 gramos de NaCl para un volumen de un litro) con 0.1 mg/ μ L de ampicilina y se dejaron creciendo toda la noche a 37 °C y 200 rpm.

Posteriormente se inocularon 1.5 mL a 750 mL de medio LB con 0.1 mg/ μ L de ampicilina y se dejó incubando a 37 °C y 200 rpm hasta que el medio alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.6 al medirla en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. A continuación, se indujo la expresión de ambos dominios con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al 0.1M en medio LB durante cuatro horas, a 37 °C y 200 rpm.

Al concluir las cuatro horas de incubación, el medio se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 mL de amortiguador y esta mezcla se sonicó cuatro veces durante 5 segundos para lisar las bacterias y liberar el contenido citoplasmático. Una vez sonicada se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm y posteriormente se recuperó el sobrenadante.

La secuencia que codifica para Spo20 se encuentra en el plásmido pGEX-4T que al igual que el plásmido anterior fue usado para transformar bacterias *E. coli* BL21. La inducción se realizó de la misma manera que con los dominios PH silvestre y el mutante W36F.

Los péptidos expresados poseen una etiqueta de GST, por lo que se utilizó una cromatografía de afinidad para la purificación de los mismos. Se utilizó una columna con 300 μ l de la resina glutatión-sefarosa 4B. Posteriormente, los dominios se recuperaron de dicha matriz bajo condiciones de elución suaves con 300 μ l de glutatión 10 mM y 10 % de glicerol para conservar la antigenicidad y la funcionalidad de los péptidos.

CAPÍTULO II

Con el objetivo de confirmar la purificación de los dominios, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10% para cada dominio y se tiñó con azul de Coomassie para verificar la presencia de los péptidos.

2.2 Marcaje fluorescente del dominio PH de la PLC- δ 1

Los dominios se marcaron fluorescentemente con el fluoróforo Alexa 488 ((longitud de excitación: 488 nm y de emisión 525 nm), con el kit comercial de Life Technologies (no de catálogo A-10235) cuya longitud de excitación es de 488 nm y de emisión de 525 nm en un color verde.

Para evitar que el glutatión interfiriera con la eficiencia del marcaje fluorescente, se reemplazó el amortiguador de elución por medio de diálisis con PBS más 10% de glicerol. Posteriormente se le agregó 50 μ L 1M de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). La solución se transfirió al vial con el Alexa 488 y esta reacción se dejó incubando a temperatura ambiente por una hora.

Después de ese tiempo, la reacción se pasó por una resina de elución molecular que ayudaría a separar el dominio marcado del fluoróforo que no reaccionó. El dominio se eluyó con PBS y se recuperaron 3 mL de la elución. Finalmente se concentró la proteína por medio de diálisis para tener un volumen final de 500 μ L que fueron alicuotados y almacenados.

2.3 Inducción de muerte celular regulada

Se utilizaron coliflores de origen comercial. Se eligieron aquellas que presentaban una coloración blanca, ya que esta indica una mayor frescura. Posteriormente se cortaron inflorescencias de diferentes zonas de la coliflor, preferentemente aquellas que estaban menos expuestas a golpes y se sometieron a los distintos tratamientos.

La muerte celular regulada en inflorescencias de *Brassica oleracea* se indujo utilizando tratamientos con temperatura (45 °C) durante seis y 24 horas, glifosato al 0.1% (v/v), sorbitol y NaCl en concentraciones de 600 y 300mM respectivamente, durante 2 horas (Monetti *et al.*, 2014) y un tratamiento con peróxido de hidrogeno, H_2O_2 al 0.1% (v/v) por 26 horas.

CAPÍTULO II

2.4 Extracción de ADN de *Brassica oleracea*

La extracción de ADN de *Brassica oleracea* se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Edwards *et al.*, (1991). Se extrajo ADN de 0.1 g de inflorescencias de coliflor antes y después de la inducción de la muerte celular.

2.5 Cortes histológicos de *Brassica oleracea*

Se tomaron muestras de las inflorescencias de coliflor tanto en condiciones de testigo (sin estrés) y sometidas a los diferentes tratamientos y se cortaron a un tamaño aproximado de 1 cm. Éstos cortes se dejaron incubando 30 minutos en formaldehído al 4 % a temperatura ambiente.

Para poder ser cortados en un micrótopo, las muestras fueron sometidas a un protocolo de inclusión en parafina. Para esto, el agua de los tejidos necesita ser reemplazada por un disolvente pueda ser embebido en parafina. Para esto, las inflorescencias se incubaron en alcohol al 30, 50, 70, 82 y 92% (v/v) durante una hora a 4 °C en cada concentración, dos horas en alcohol absoluto y finalmente en alcohol absoluto (nuevo) toda la noche.

Al día siguiente las muestras se incubaron dos veces durante tres horas cada vez, en butanol y por último se dejó incubando toda la noche en butanol más parafina a temperatura ambiente y agitación constante (100 rpm).

Posteriormente se hicieron tres incubaciones de dos horas con a 60 °C. Finalmente, las muestras se montaron en moldes para después ser cortadas con un grosor de 6 µm en un micrótopo de la marca MicroM modelo HM340E y cada corte se colocó en portaobjetos.

2.6 Cortes histológicos con criostato

A diferencia de los cortes en el micrótopo que requiere de la inclusión con parafina de las muestras para que esta sirva de soporte y permita los cortes; el uso del criostato, que consiste en una cámara de congelación (-28 °C) donde se coloca la cuchilla, es necesario incluir las muestras en un medio de congelamiento. La ventaja de este método, es que es más rápido y no se requiere el uso de solventes (metanol, etanol, xileno, etc.) para la inclusión o desparafinación, por lo que es menos probable la alteración de la morfología celular haciendo la microscopía más confiable.

CAPÍTULO II

Para la inclusión de las inflorescencias de *B. oleracea* se preparó amortiguador PB (9.08 g de Na_2HPO_4 , 2.1 g de NaH_2PO_4 , pH 7.2). Este amortiguador se usó para preparar una solución de paraformaldehído al 4% (v/v) en el que se incubaron por 48 horas a 4 °C. Se lavó con PB tres veces y posteriormente se incubaron en gradientes de sacarosa con PB de la siguiente manera: sacarosa 10% (v/v) durante una hora, sacarosa 20% (v/v) más tres gotas de medio de inclusión leica por una hora y sacarosa al 30% y seis gotas de medio de inclusión y se dejó en refrigeración hasta la realización de los cortes.

Los cortes se realizaron en el criostato a -28 °C, en el que se obtuvieron cortes con grosores de 20, 10, 5 y 3 micras. Los cortes se incubaron con anticuerpo vs fibrilarina y DAPI siguiendo el protocolo de ensayo de inmunofluorescencia (Sauer *et al.*, 2006).

2.7 Expresión y purificación de biosensores de fosfoinosítidos

Para poder detectar los diferentes fosfoinosítidos nucleares en condiciones de control (sin tratamientos) y bajo estrés, se requiere de biosensores que reconozcan a estos fosfolípidos. Se decidió utilizar nueve biosensores más el dominio PH de la PLC- δ 1 con diferentes afinidades y especificidades por los PIPs (tabla 1) cuyas secuencias están clonadas en diferentes vectores de expresión en bacterias y fueron proporcionados por el Dr. Pavel Hozak. Se utilizó el mismo protocolo para la expresión y la purificación del dominio PH de la PLC- δ 1, ya que los vectores de expresión permiten obtener un péptido que consta del biosensor más dos etiquetas, una de histidinas (H8) y una de GST.

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Biosensores usados para detectar PIPs en el núcleo de *B. oleracea*.

Biosensor	Especificidad	Etiquetas	Tamaño (kDa)
PH-AKT	PI(3,5)P ₂ , PIP ₃	GST/H8	56
FYVE	PI(3)P	GST/H8	47
PH-OSH1	PI(4)P	GST/H8	46
PH-OSH2	PI(5)P	GST/H8	62
PH-DOK5	PI(3)P	GST/H8	47
PH-GRP1	PIP ₃	GST/H8	46
TUBBY	PI(4)P	GST/H8	63
PH-PLC- δ 1	PI(4,5)P ₂	GST	46
ENT3	PI(3,5)P ₂	GST	46
ENT5	PI(3,5)P ₂	GST	46

2.8 Clonación del dominio PH y el dominio XY-E341A de la PLC- δ 1 en el vector pET-15b

2.8.1 Clonación en pGEM-T Easy

El vector de expresión pET-15b posee una etiqueta de histidinas que nos permitirá determinar si el dominio PH es capaz de reconocer a la totalidad de los PIPs presentes en los tejidos de *B. oleracea*. Se diseñaron un par de iniciadores con una longitud de 23 pares de bases complementarias a la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio más seis bases de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI en el iniciador sentido y BamHI en el iniciador antisentido. Estos se utilizaron para amplificar la secuencia del dominio PH clonada en el vector pGST3, mediante PCR utilizando el programa descrito en el cuadro 2.2 utilizando el Master Mix Dream Taq (Thermo Scientific). La polimerasa está diluida en el amortiguador preparado a una concentración de 2X. EL amortiguador contiene 4 mM de MgCl₂ y 0.4 mM de dNTPs. Para cada reacción de 50 μ L se usó 2.5 mM de cada cebador y 20 pg de ADN molde. Para las titulaciones de MgCl₂, se usó un amortiguador sin el mismo.

CAPÍTULO II

Para la amplificación y clonación del dominio XY-E341A se utilizó una estrategia similar y se diseñaron los cebadores específicos con los sitios de reconocimiento para *Nde* I y *Bam* HI.

Las secuencias amplificadas mediante PCR se ligaron en el vector pGEM-T (Easy 50ng) con 1 μ l de la enzima T4 ligasa (3U/ μ l), 1 μ l de la reacción de PCR y 5 μ l del amortiguador de la reacción (2X) en una reacción de ligación con un volumen final de 10 μ l incubada a 4 °C toda la noche para posteriormente usar dicho producto para transformar posteriormente a *E. coli* DH5 α o TOP 10 quimiocompetentes por el método químico con cloruro de calcio (CaCl₂) al 0.1M (Cohen *et al.*, 1972).

Cuadro 2.2 Programación del termociclador para la amplificación del dominio PH y XY-E341A

Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización
2 min 94 °C	30	1 min 94 °C	1 min 60 °C	3 min. 72 °C
	Final	1 min 94 °C	12 min 72 °C	

2.8.2 Subclonación en pET-15b

Los plásmidos se recuperaron por el método de lisis alcalina (Green y Sambrook, 2016) y se digirieron a la par del plásmido pET -15b con 1 μ L de las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI durante 4 horas. Posteriormente las digestiones fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% (p/v) para purificar las bandas correspondientes al plásmido pET.15b y a la secuencia del dominio PH utilizando el kit comercial de purificación de ADN Wizard Purification System de Promega.

Ambas muestras se mezclaron en una reacción de ligación que fue utilizada para transformar la cepa bacteriana *E. coli* TOP10. La subclonación fue comprobada realizado una nueva digestión con las enzimas *Nde* I y *Bam* HI.

CAPÍTULO II

2.9 Expresión y purificación del dominio PH-His

Para la inducción se usaron bacterias *E. coli* BL21 competentes que crecieron en medio LB a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.6. La transformación de ambas cepas se llevó a cabo por el método de choque térmico. La expresión de los dominios se hizo por inducción por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido o IPTG al 0.1M en medio LB durante dos horas, a 37 °C y 200rpm.

Una vez expresados los dominios fusionados a la etiqueta de histidinas, se utilizó una cromatografía de afinidad para la purificación de los mismos. Se utilizó una columna con 100 μ l de la resina Ni-sefarosa. Posteriormente, los dominios se recuperaron de dicha matriz bajo condiciones de elución suaves con 100 μ l de imidazol a una concentración del 250 mM para conservar la antigenicidad y la funcionalidad de los dominios.

2.10 Inmunodetección de los péptidos PH silvestre, PH-W36F, PH-His y Spo20

Para las posteriores inmunodetecciones de PIPs fue necesario contar con anticuerpos capaces de reconocerlos. Los anticuerpos se obtuvieron de suero de conejos inmunizados dos veces, cada dos semanas con 20 μ l (0.11 μ g/ μ l) de cada péptido (excepto el PH-His y PH-W36F) y dos semanas previas al primer sangrado.

Se hicieron un total de tres sangrados de donde se obtuvieron 40 ml de sangre. La sangre fue centrifugada a 4500rpm y se recuperaron 20 ml de suero que se distribuyó y almacenó en alícuotas de 1.5 ml y se almacenaron a 4, -20 y -80 °C.

Para verificar la presencia de anticuerpos contra los dominios se realizó la técnica de western blot. Se utilizaron 200 ng de los dominios PH y Spo20 para realizar una electroforesis SDS PAGE al 12% (p/v) para cada dominio. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se bloqueó con PBS-Tween 20 (0.1% v/v) y 3% de BSA (p/v) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una incubación con anticuerpo de conejo anti-dominio PH y anti Spo20 respectivamente (1/4000) toda la noche a 4 °C y una tercera con anticuerpo secundario anti conejo (1/4000) una hora a temperatura ambiente, con tres lavados entre incubaciones y se reveló con quimioluminiscencia (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection

CAPÍTULO II

Reagent).

2.11 Extracción de PIPs

La extracción de PIPs se llevó a cabo siguiendo el protocolo de acuerdo al protocolo de Drobag y colaboradores (2000). Se utilizaron inflorescencias de coliflor, que fueron congeladas con nitrógeno líquido y maceradas. Se colocaron 2 g de esta preparación en un tubo de vidrio y se añadieron 3.75 volúmenes de cloroformo (CHCl_3) para extraer los fosfolípidos del tejido vegetal. Posteriormente se agregó un volumen de HCl 2M y se centrifugó a 3000 rpm por cinco minutos. Se recuperó la fase orgánica y se repitió este paso. Seguidamente se realizaron tres lavados con una mezcla de CHCl_3 / MeOH/ HCl (1M) en una proporción de 3:48:47. Finalmente se realizó una evaporación con nitrógeno y se resuspendió con 100 μL de CHCl_3 .

2.12 Cromatografía en papel y TLC para separar PIPs

Para poder evaluar los posibles cambios en la concentración de PIPs antes y después de la inducción de MCR, se decidió desarrollar una cromatografía en membrana de nitrocelulosa, para detectar los distintos PIPs usando los dominios de reconocimiento a los mismos mediante un fatblot.

Se usaron 2 μL de la extracción de PIPs y se colocaron en una membrana de nitrocelulosa, así como 2 μL de PIP_2 como un testigo positivo. Se dejaron secar a temperatura ambiente por una hora y cada membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con 5 mL de PBS-T más 5% (p/v) de BSA, posteriormente se lavaron tres veces con 5 ml de PBS-T durante 15 minutos por lavado para después dejarlas incubando toda la noche a 4 °C en 3 mL de PBS-T más 3% (p/v) de BSA y una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del dominio PH silvestre.

Transcurrido el tiempo de incubación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a una concentración de 1/4000 durante toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario a una concentración de 1/5000 durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó con PBS-T y finalmente se expuso a los sustratos de la peroxidasa para enseguida ponerla en contacto con una película

CAPÍTULO II

fotográfica para comprobar que la extracción se llevó a cabo de la manera correcta.

Una vez comprobado que la extracción fue adecuada se realizó una cromatografía en papel. Se usaron 4 μL de la extracción y 4 μL de PIP_2 que se colocaron en una membrana de nitrocelulosa y se dejó secar por una hora a temperatura ambiente. Pasada la hora, la membrana se colocó en posición vertical en un envase de vidrio con el sistema de corrida $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 90:70:4:16 (Munnik *et al.*, 1996). La cromatografía se llevó a cabo por 4 horas y posteriormente se utilizó el mismo procedimiento empleado para los fatblots para exponer la membrana con una película fotográfica y observar el resultado de la cromatografía.

También se realizaron cromatografías de capa delgada o TLC (thin layer chromatography) con los fosfolípidos de inflorescencia, en las que se probaron diferentes volúmenes, así como tres distintas fases móviles: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 90:70:4; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:7 y $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1. Las placas se revelaron usando una reacción con ácido fosfomolibdico.

2.13 Marcaje radiactivo de fosfoinosítidos con ^{32}P

Se utilizaron 200 mg de células de *B. oleracea*, que fueron trituradas en frío en mortero de porcelana, utilizando nitrógeno líquido. El macerado fue transferido a un tubo cónico de 50 mL con 10 mL de solución amortiguadora HEPES 50 mM, pH 7,2; sacarosa 0,25 M; KCl 5mM; EDTA 1mM, en relación 1/10 (p/v), con el agregado de inhibidores de proteasas: (Leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y Aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Esta mezcla se sonicó con el fin de homogenizarla.

Para enriquecer el contenido de fosfolípidos, se obtuvieron las membranas mediante centrifugación. El homogenato se centrifugó a 100 g x 15 min, y a 105,000 g x 60 min, a 4°C. El primer precipitado se descartó después de lavarlo una vez con la solución de homogenización y el segundo se resuspendió en un volumen de 50 μL de HEPES 50 mM pH 7,4. La fracción de membrana obtenida se utilizó como fuente enzimática para el marcaje de los fosfolípidos.

La fosforilación con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se llevó a cabo en 100 μL de mezcla de reacción que contenía amortiguador HEPES 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM, MgCl_2 10 mM, MgATP 1 mM,

CAPÍTULO II

vanadato sódico 0,2 mM, Dtioeritritol (DTE) 0,5 mM y [γ -³²P]ATP (actividad específica: 750 cpm/pmol) y 60 μ g de proteínas y se incubó durante 2 min a 30°C para después detenerla con el 1.5 ml de cloroformo/metanol frío (1:2, v/v).

Luego de la fosforilación la extracción lipídica se efectuó de acuerdo al método de Stubbs y col. (1988). Se le añadió 0,5 ml de HCl 2.4 N y 0.5 ml de cloroformo. La fase inferior se extrajo y la superior se lavó con 1 ml de cloroformo. Ambas fases inferiores se mezclaron con 2 ml de metanol/HCl 1 N (1:1, v/v). Los lípidos contenidos en la fase inferior resultante se secaron en atmósfera de nitrógeno, se resuspendieron en el mínimo volumen posible de cloroformo/metanol (9:1, v/v) y se analizaron por cromatografía en capa delgada (TLC) y en membrana de nitrocelulosa.

Los fosfolípidos individuales se resolvieron por TLC, en placas de sílica gel impregnadas con oxalato de potasio 1% (p/v), EDTA 2 mM en metanol/agua (2:3, v/v) activadas a 110 °C durante 40 min. Para la TLC se usó el siguiente sistema: cloroformo/metanol/acetona/ácido acético/agua (40:15:14:12:7 v/v/v/v/v),), mientras que para la cromatografía en nitrocelulosa se usó el sistema descrito anteriormente.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Expresión y purificación del dominio PH de la PLC- δ 1

Se sometieron a inducción a bacterias BL21 transformadas con el dominio PH silvestre. Las proteínas se recuperaron después de una lisis y se purificaron por medio de cromatografía de afinidad. Posteriormente se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10%. Se confirmó la purificación del dominio, que tiene una masa molecular de ~16.67 kDa más la masa molecular de la GST de ~ 30 kDa lo que da un total esperado de ~46.67 kDa (figura 3.1)

En los carriles correspondientes a las eluciones realizadas con glutatión 10mM se aprecian bandas que corresponde a la del tamaño esperado para el dominio silvestre.

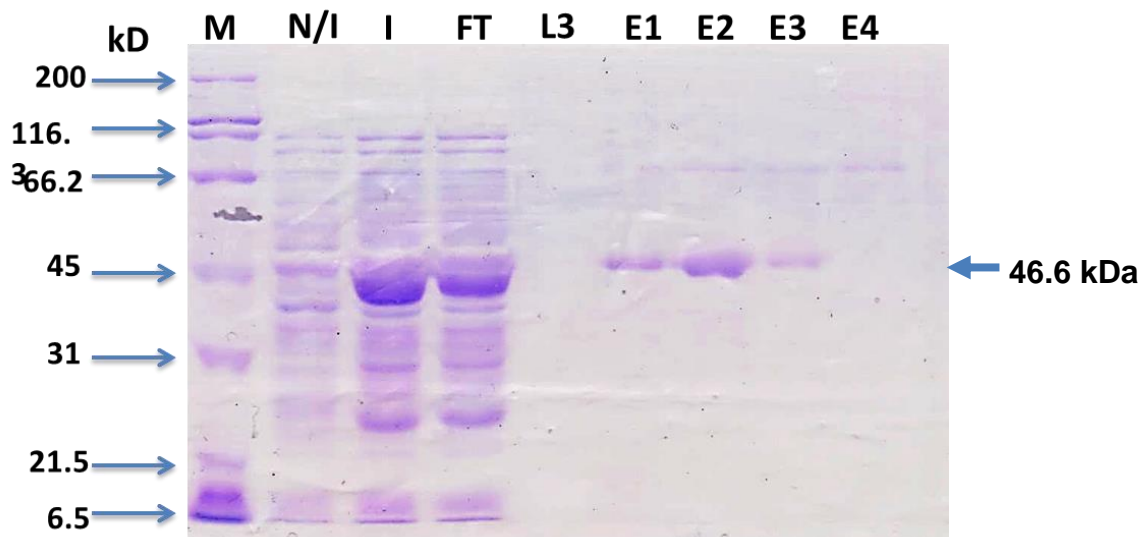


Figura 3.1. Purificación del dominio PH silvestre. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH silvestre. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. I (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. FT (carril 4): filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): Eluciones con glutatión al 10mM.

RESULTADOS

3.2 Ensayos de inmunofluorescencia con el dominio PH de la PLC- δ 1

Se realizaron cortes histológicos de coliflor y se procedió según lo descrito en materiales y métodos. Los cortes se observaron en un microscopio ZEISS modelo Axioplan y se observaron a dos longitudes de onda distintas (figura 3.2).

En ambos cortes se pudo observar la señal de DAPI a 355 nm mientras que solo en el corte incubado con el dominio PH-Alexa 488 se observó una señal de color verde que corresponde al fluoróforo acoplado al dominio en los núcleos de las células

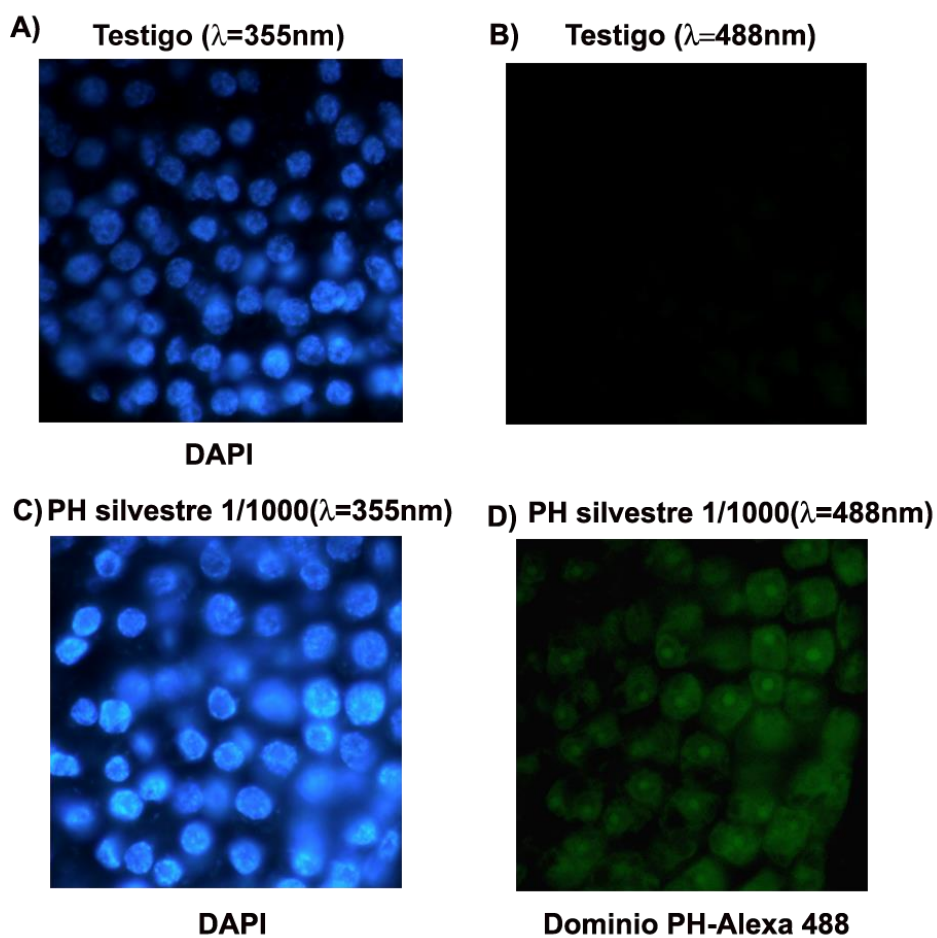


Figura 3.2. Ensayo de inmunofluorescencia con el dominio PH-Alexa 488. Cortes histológicos de *Brassica oleracea* observados con un microscopio de fluorescencia. A): Testigo teñido con DAPI. Se pueden observar en una longitud de onda de 355nm el ADN de los núcleos teñido de color azul con DAPI. B): Testigo teñido con DAPI. No se puede observar ninguna señal en la

RESULTADOS

longitud de onda de 488nm. C): Muestra teñida con DAPI y el dominio PH-Alexa 488. Se pueden observar en una longitud de onda de 355nm el ADN de los núcleos teñido de color azul con DAPI D): Muestra teñida con DAPI y el dominio PH-Alexa 488 (1/1000). Se pueden observar de color verde la señal emitida por el Alexa 488 en la longitud de onda de 488 nm.

3.3 Inducción de muerte celular regulada

Las inflorescencias de coliflor se sometieron a los tratamientos escogidos en los materiales y métodos. Posteriormente se fijaron e incluyeron en parafina para después realizar cortes histológicos. Los cortes se tiñeron con DAPI y se incubaron con el dominio PH-alexa488. Posteriormente se tomaron imágenes en un microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x.

En los distintos tratamientos se observaron cambios en la morfología nuclear. El tratamiento con sorbitol parece ser el que causa los cambios más notables si tomamos en cuenta la fragmentación nuclear (figura 3.3D). Se observan núcleos fragmentados en cuerpos más pequeños que concuerdan con la morfología descrita para las etapas finales de la apoptosis. El tratamiento que parece tener un menor impacto en la morfología del núcleo es el tratamiento con glifosato (figura 3.3B). En los tratamientos restantes se observan núcleos con forma de medias lunas y zonas con una señal intensa de DAPI, lo que indica condensación de la cromatina, estas señales son parte de las etapas más tempranas de la apoptosis.

RESULTADOS

Núcleos de *B. oleracea* teñidos con DAPI

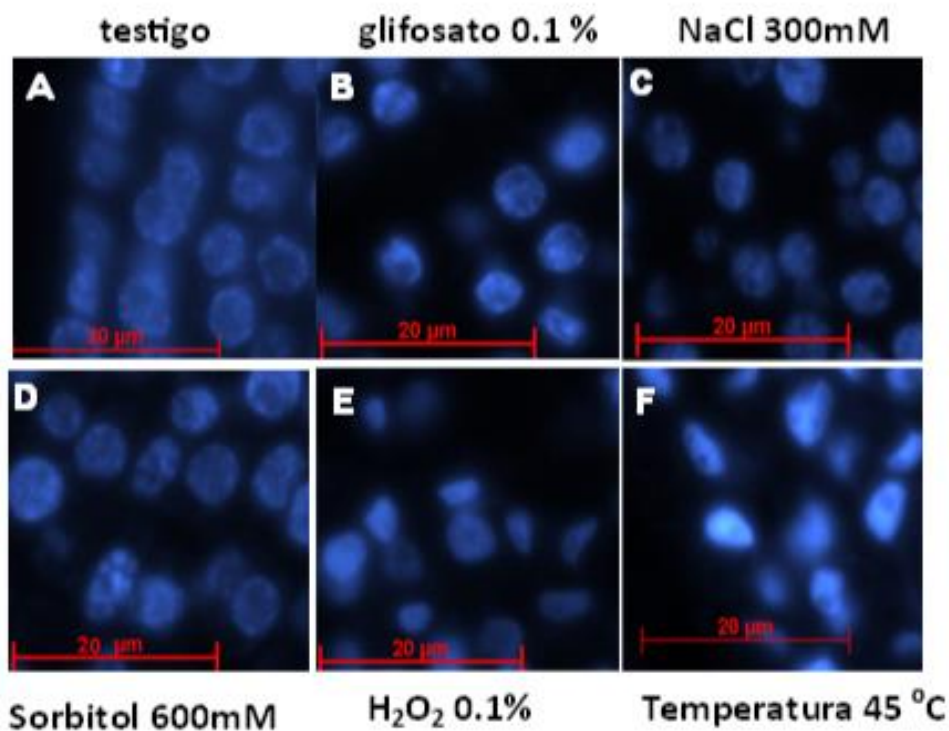


Figura 3.3. Cortes histológicos teñidos con DAPI y marcados con el dominio PH-Alexa 488. Cortes histológicos de *Brassica oleracea* observados con un microscopio de epifluorescencia. Núcleos de *B. oleracea* bajo diferentes condiciones de estrés vistos en el canal de 355nm. Se observan núcleos de inflorescencias sin tratamiento y tratados con glifosato, NaCl, sorbitol, H₂O₂ y calor (45°C). A): Núcleos sin ningún tratamiento de estrés B): Núcleos tratados con glifosato al 01%. C): Núcleos tratados con 300 mM de NaCl. D): Núcleos tratados con 600 mM de sorbitol E): Núcleos tratados con H₂O₂ al 0.1%. Todos los tratamientos fueron de dos horas, exceptuando el tratamiento con H₂O₂ que tuvo una duración 26 horas.

3.4 Análisis del ADN de *Brassica oleracea* posterior a la inducción de muerte celular

Después de inducir la muerte celular con los tratamientos de glifosato, sorbitol, NaCl y H₂O₂ se extrajo ADN de las inflorescencias y se separó en una electroforesis en gel de agarosa (figura 3.4).

RESULTADOS

En el gel se puede observar que en el ADN que se extrajo después del tratamiento con H_2O_2 hay bandas características de ADN degradado durante la apoptosis (muerte celular no autolítica). Igualmente se pueden observar estas bandas en el tratamiento con calor después de las 24 horas, pero de manera tenue.

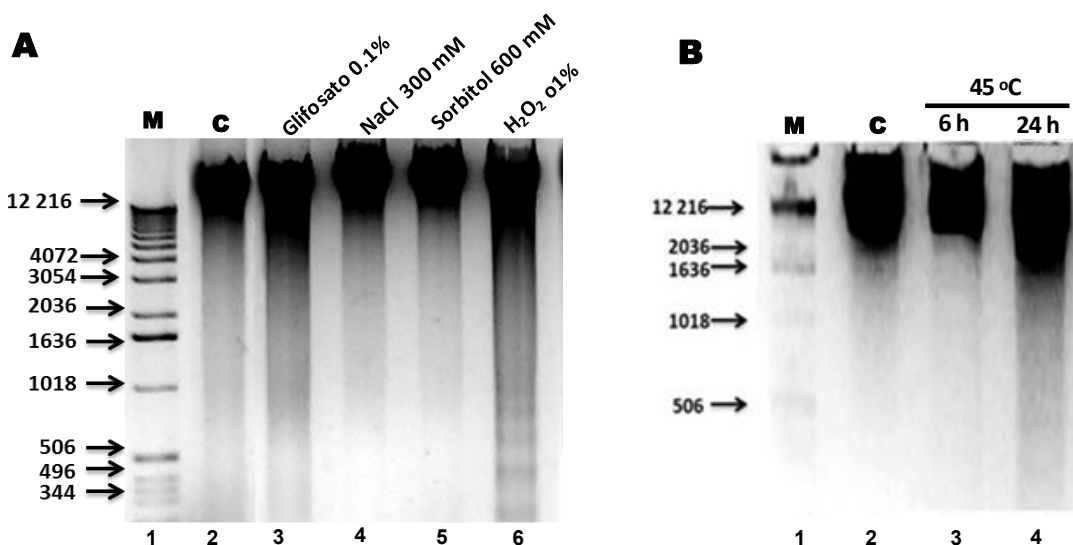


Figura 3.4. Comparación del ADN genómico de *Brassica oleracea*. A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con ADN extraído de las inflorescencias de Brassica. Carril 1: marcador de 1kb. Carril 2: ADN de Inflorescencias sin tratamiento (C). Carril 3: ADN de Inflorescencias tratadas con 0.1% de glifosato por 2 horas. Carril 4: ADN de Inflorescencias tratadas con 300 M de NaCl por 2 horas. Carril 5: ADN de Inflorescencias tratadas con sorbitol 0.6M por dos horas. Carril 6: ADN de Inflorescencias tratadas con 0.1% de H_2O_2 por 26 horas. B) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con ADN extraído de las inflorescencias de Brassica. Carril 1: marcador de 1kb. Carril 2: ADN de Inflorescencias sin tratamiento. Carril 3: ADN de Inflorescencias tratadas con calor: 45 °C por 6 horas. Carril 4: ADN de Inflorescencias tratadas con calor: 45 °C por 24 horas.

3.5 Clonación del dominio PH en el plásmido pET-15b

La secuencia del dominio PH se amplificó mediante PCR utilizando un par de iniciadores usando el programa descrito en materiales y métodos (cuadro 2.1) y haciendo una titulación de $MgCl_2$ de 0.5 a 3 mM. Se esperaba una secuencia de aproximadamente 600 pb que se pudo observar en un gel de agarosa al 1% en las concentraciones de 2.5 y 3 mM de $MgCl_2$ (figura 3.5 a), la concentración.

RESULTADOS

Posteriormente este producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy y se transformó con la misma a células competentes. La correcta clonación se verificó con la digestión de los plásmidos recuperados por lisis alcalina con BamHI y con BamHI y NdeI. Estas digestiones se observaron en un gel de agarosa al 1%. En estos geles se observó una banda de aproximadamente 600 pb correspondientes a la secuencia del dominio PH y de 3000pb correspondientes a pGEM-T Easy (figura 3.5b).

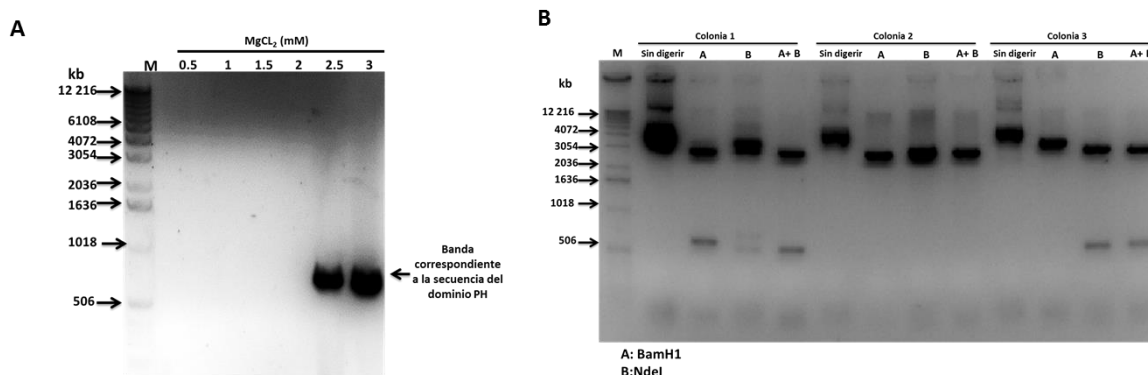


Figura 3.5 Clonación del dominio PH en pGEM-T Easy. A): titulación de MgCl₂ para amplificar la secuencia del dominio PH. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de para obtener la secuencia del dominio PH Carril 1: Marcador molecular. Carriles 2-7 PCRs con diferentes concentraciones de magnesio (0.5-3.0 mM). B): Digestión del plásmido con la secuencia del dominio PH. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los plásmidos digeridos con las enzimas *Bam* HI y *Nde* I. (Carril 1): Marcador de 1kb. Carriles 2-5: Plásmidos sin digerir y digeridos con la secuencia del dominio PH de la colonia 1. Carriles 6-9: Plásmidos sin digerir y digeridos con la secuencia del dominio PH de la colonia 2. Carriles 10-13: Plásmidos sin digerir y digeridos con la secuencia del dominio PH de la colonia 3. A: digerido con BamHI. B: Plásmido digerido con NdeI. A+B digerido con *Bam* HI y *Nde* I.

Una vez que la secuencia del dominio PH estuvo clonada en pGEM T Easy, se digirieron tanto pGEM como pET-15b y se recuperaron las secuencias de ADN digeridas. Ambas secuencias se ligaron y la reacción de ligación se usó para transformar bacterias quimiocompetentes y la subclonación se comprobó mediante digestión y PCR.

Se digirieron plásmidos de diferentes colonias para verificar la ligación correcta del dominio PH en el vector pET-15b usando nuevamente las enzimas *Bam* HI y *Nde* I. Se

RESULTADOS

pudo observar una banda de entre 6000 y 7000 pb correspondiente a pET-15b más la secuencia del dominio PH cuando se usó una sola enzima. Cuando se usaron dos enzimas se pudo observar una banda cercana a 6000 pb correspondiente a pET-15b; sin embargo, no se observó la banda de 600 pb de la secuencia del dominio.

Para determinar si estas colonias tenían clonada la secuencia del dominio PH se usaron los iniciadores para amplificarla. Se observaron bandas de aproximadamente 600 pb usando los plásmidos recuperados de las colonias 1 y 3 como ADN molde.

Finalmente se repitieron las digestiones usando una mayor cantidad de plásmido en la colonia 1 y además se usó la enzima *Eco* RV que tiene dos sitios de reconocimiento en la secuencia e pET-15b. Para las digestiones con *Eco* RV se esperaban bandas cercanas a los 2200 y 4400 pb, las cuales se pudieron observar en un gel de agarosa al 1%. Además, también se pudo observar la banda de 600 pb en la doble digestión con *Bam* HI y *Nde* I (figura 3.6).

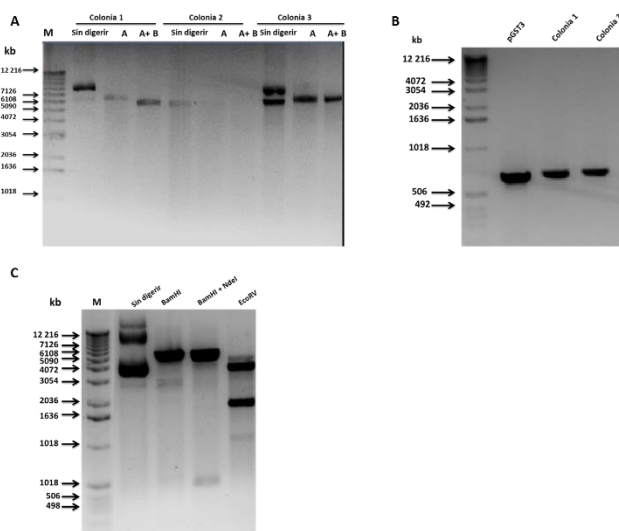


Figura 3.6. Clonación del dominio PH en pet15b. A) Digestión del plásmido con la secuencia del dominio PH. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los plásmidos digeridos con las enzimas *Bam* HI y *Nde* I. Carril 1: Marcador de 1kb. Carriles 2-5: Plásmidos sin digerir y digeridos con la secuencia del dominio PH de la colonia 1. Carriles 2-9: Plásmidos sin digerir y digeridos con la secuencia del dominio PH de la colonia 2. Carriles 10-13: Plásmidos sin digerir y digeridos con la secuencia del dominio PH de la colonia 3. A: digerido con BamHI. B. Plásmido digerido con NdeI.

RESULTADOS

A+B digerido con *Bam* HI y *Nde* I. B) Amplificación de la secuencia del dominio PH clonado en pET-15b. Carril 1: marcado de 1kb. Carril 2: amplificación de la secuencia del dominio PH clonado en pGST3. Carril 3: amplificación de la secuencia del dominio PH recuperado de la colonia 1. Carril 4: amplificación de la secuencia del dominio PH del plásmido recuperado de la colonia 3. C) Digestión del plásmido recuperado de la colonia 1. Carril 2. Plásmido sin digerir. Carril 3. Plásmido digerido con *Eco* RV. Carril 4. Plásmido digerido con *Bam*HI. Carril 5. Plásmido digerido con *Bam* HI y *Nde* I.

3.6 Expresión y purificación del dominio PH-His y del dominio XY-E341A de la PLC δ 1

La purificación del dominio se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en los materiales y métodos. Para determinar si el dominio se purificó siguiendo este método, las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y éste se tiñó con azul de Coomasie. El dominio PH posee una masa molecular de ~18.39 kDa más 930 Da de la etiqueta de histidina (6 His), lo que da una masa molecular total de 19.32 kDa. En el gel (figura 3.7) se pueden observar bandas con un patrón de migración similar al predicho para el dominio PH-His en los carriles correspondientes a las eluciones con imidazol, lo que indica que el dominio fue purificado.

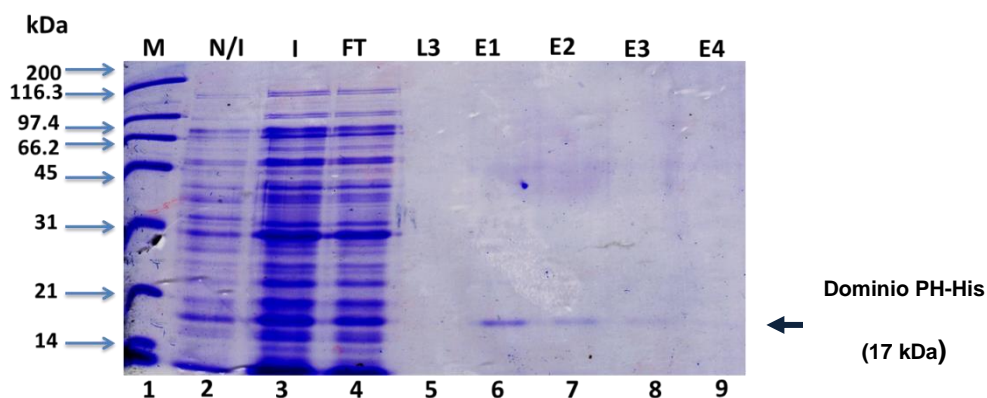


Figura 3.7 Purificación del dominio PH-His. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH-His. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. I (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. FT (carril 4): Filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con imidazol al 200

RESULTADOS

mM.

3.7 Expresión y purificación de Spo20

El péptido Spo20 está fusionado a una etiqueta de GST, por lo que después de expresarlo usando IPTG a una concentración de 0.1M durante 4 horas, se purificó usando el mismo protocolo que se empleó para purificar al dominio PH-GST.

Se expresó y se purificó un péptido con una masa molecular de 30 kDa, similar a la que se esperaba para Spo20 (figura 3.8).

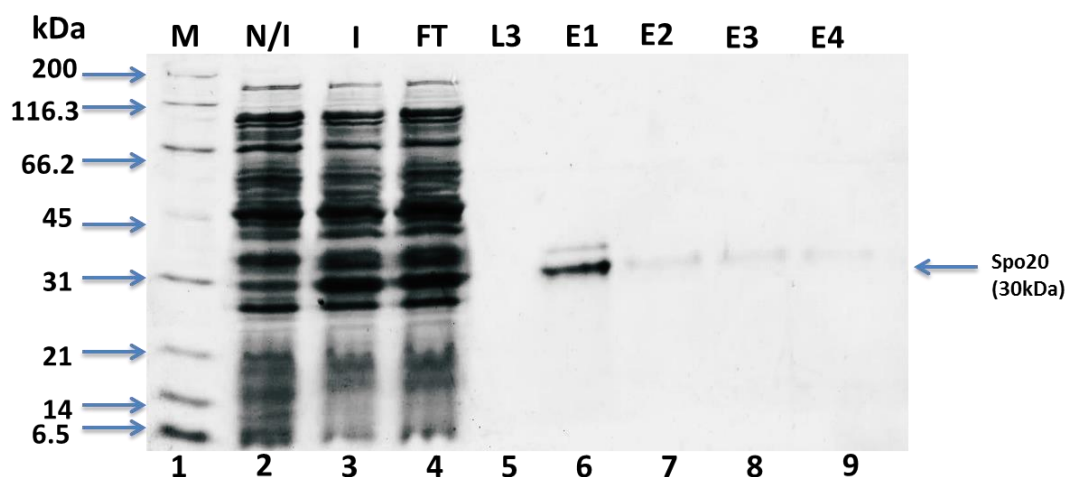


Figura 3.8 Purificación de Spo20. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación de Spo20. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. I (carril 3): extracto total de Spo20 inducido. FT (carril 4): Filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con glutatión al 10 mM.

3.8 Expresión y purificación del dominio PH-W36F

Con el objetivo de confirmar la purificación del dominio se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 12%. En los carriles del gel (figura 3.9) que corresponden a las eluciones realizadas con glutatión 10mM se aprecia una sola banda que corresponde a la del tamaño esperado para el dominio PH-w36, lo que indica que se logró purificar el dominio.

RESULTADOS

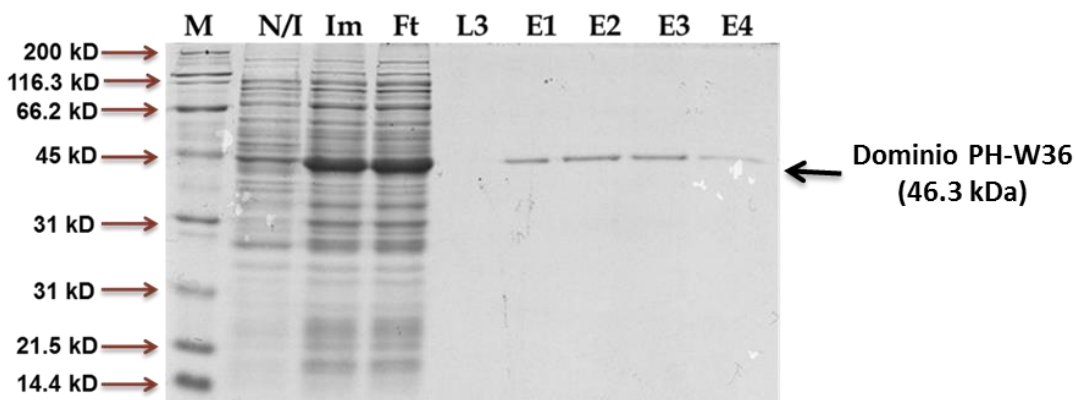


Figura 3.9. Purificación del dominio PH-W36F. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH W36F. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. I (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. FT (carril 4): Filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con glutatión al 10mM.

3.9 Extracción de PIPs, cromatografía en papel y TLC

Las extracciones se llevaron a cabo según se describió en el capítulo II, y se usaron para realizar fatblots y cromatografías en membrana de nitrocelulosa (figura 3.10).

En los fatblots se utilizaron las extracciones, PIP_2 (figura 3.10 A) como testigo positivo y ácido fosfatídico (PA) (figura 3.10 C) como testigo negativo. Para las cromatografías se usaron las extracciones y PIP_2 (figura 3.10 B). Ambos se incubaron con el dominio PH silvestre.

En los fatblots se observaron manchas que indican que el dominio PH silvestre reconoció a los PIPs presentes en las extracciones, esto también indica que las extracciones se realizaron de manera correcta.

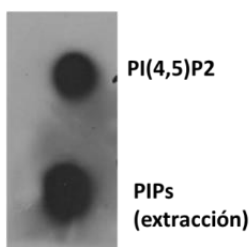
En las cromatografías se observa que las muestras se desplazaron a lo largo de la membrana, sin embargo, no se puede distinguir una clara separación de sus componentes. En el caso de la figura 3.10 D se observan tres franjas que pudieran corresponder a los componentes de la extracción que han sido separados durante la

RESULTADOS

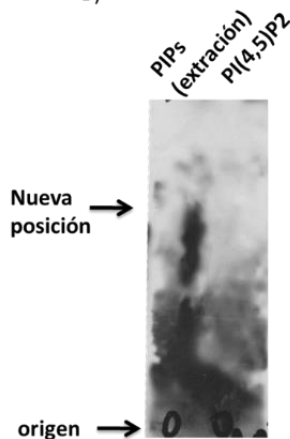
cromatografía. No obstante, el fondo no permite observar de mejor manera el desplazamiento de las muestras. Por esto es necesario repetir los experimentos para reducir el fondo, así como probar diferentes sistemas de separación.

Como una manera de validar los resultados de la cromatografía en papel se realizaron TLCs para separar los diferentes fosfolípidos que componen la extracción. Se usaron tres sistemas distintos, incluido el utilizado para las cromatografías en membrana. De ambos sistemas, el de mejor resolución fue el sistema de cloroformo/metanol 1:1, ya que se observó una mejor separación entre los componentes. Las dos primeras bandas pueden corresponder a PIP y PIP₂, mientras que el resto pertenece a otros fosfolípidos estructurales como fosfatidilcolina (Figura 3.11). Para posteriores experimentos se usará este sistema para la cromatografía en papel previo a probar la integridad de la membrana en dicho sistema.

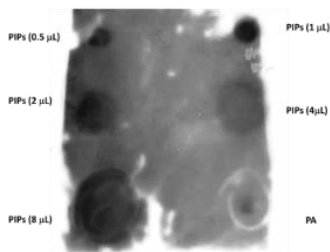
A)



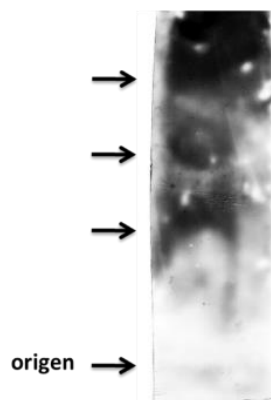
B)



C)



D)



RESULTADOS

Figura 3.10. Fatblots y cromatografías en membrana de nitrocelulosa de las extracciones de PIPs. A: fatblot con PIP2 y la extracción de PIPs. Se observan dos manchas que corresponden a los PIPs reconocidos por el dominio PH silvestre. B: cromatografía de extracción de PIPs y PIP2 en membrana de nitrocelulosa (4 horas). Se observa el desplazamiento de las muestras a lo largo de la membrana de nitrocelulosa. C: fatblot con PA y la extracción de PIPs con 0.5, 1, 2, 4 y 8 μ L de extracción. Se observan manchas que corresponden a los PIPs reconocidos por el dominio PH silvestre. En el caso de PA no se observa una mancha clara debido a que el dominio es incapaz de interactuar con este fosfolípido. D: cromatografía de la extracción de PIPs en membrana de nitrocelulosa. Se observa el desplazamiento de las muestras a lo largo de la membrana de nitrocelulosa (12 horas). Se pueden ver tres franjas que pudieran pertenecer a los distintos componentes de la extracción que han sido separados durante la cromatografía. Todas las membranas fueron incubadas con el dominio PH silvestre.

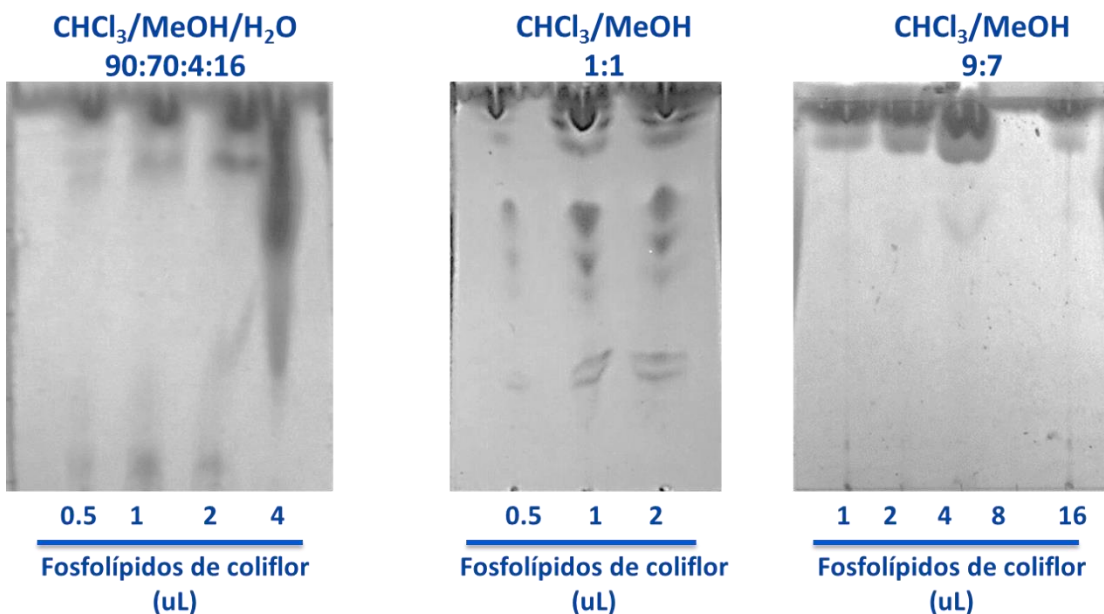


Figura 3.11. TLC de los fosfolípidos de inflorescencias de coliflor. Se probaron tres diferentes sistemas de fase móvil, el sistema de CHCl₃/MeOH 1:1 proporcionó una mejor resolución.

3.10 Marcaje radiactivo de fosfoinosítidos con ³²P

Se realizó el marcaje con ³²P de los fosfolípidos extraídos de suspensiones celulares de *B. oleracea* y éstos se usaron para realizar dos cromatografías, una TLC en una membrana de sílice y una más en membrana de nitrocelulosa.

RESULTADOS

Una vez terminadas las cromatografías, los fosfolípidos se visualizaron mediante autorradiografía, utilizando filmes fotográficos (Figura 3.12). Se observa en la TLC, dos bandas que probablemente corresponden a ATP que no fue utilizado por las lípidocinasas durante la fosforilación. Esto puede deberse a que la marca tenía 14 días, por lo que la actividad del ^{32}P se había reducido a la mitad, y aunque se usó una mayor cantidad para tener la actividad específica requerida, este isótopo decae en ^{32}S , por lo que no puede ser usado por las cinasas y por lo tanto no se observan las bandas correspondientes a los distintos fosfolípidos.

Además de lo anterior, se puede señalar que la resolución ofrecida por la TLC es mayor que la de la cromatografía en nitrocelulosa, ya que en la primera se observan bandas y en la segunda un barrido, debido a que la sílice permite una mejor separación, sin embargo, es necesario realizar repeticiones de ambas cromatografías.



Figura 3.12. TLC y cromatografía en nitrocelulosa de fosfolípidos marcados con ^{32}P . A: TLC de fosfolípidos marcados con ^{32}P . B: cromatografía en membrana de nitrocelulosa.

3.11 Expresión y purificación de biosensores de fosfoinosítidos

Se logró expresar y purificar 7 de los 10 biosensores elegidos para detectar PIPs durante estrés y MCR en núcleos de coliflor (figura 3.13). No se logró obtener las condiciones adecuadas para la expresión de los dominios tubby, ENT3 y ENT5.

Se pudieron observar bandas con un patrón de migración correspondiente a las masas moleculares esperadas para los biosensores, aunque la eficiencia de las inducciones y de

RESULTADOS

las purificaciones parecen variar en todos los biosensores.

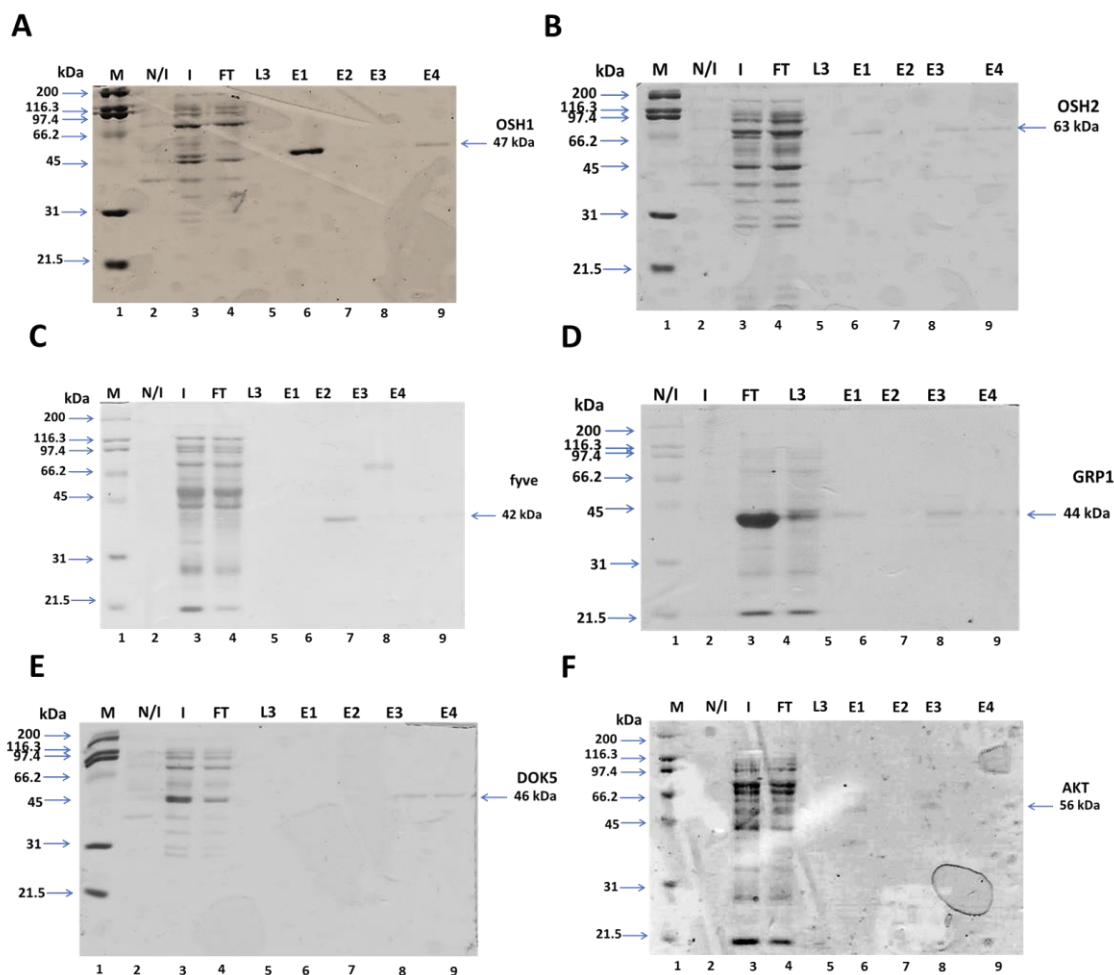


Figura 3.13. Purificación de los biosensores de PIPs. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% que corresponde a la purificación del dominio PH-OSH1. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. I (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. FT (carril 4): Filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con glutatión al 30mM. B) purificación de PH-OSH2. C) purificación de Fyve. D) purificación de PH-GRP1. E) purificación de PH-DOK5. F) purificación de PH-AKT.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

Dentro del desarrollo de herramientas para el estudio de los fosfoinosítidos nucleares y debido a que siete de los biosensores que se usaron en este trabajo son dominios PH de distintas proteínas, se decidió analizar el mecanismo por el que este dominio es capaz de unirse a los PIPs.

El dominio PH es una estructura de generalmente 140 aminoácidos, con estructuras primarias que varían mucho entre sí, pero con una estructura terciaria muy conservada y que presenta distintas especificidades y afinidades por los PIPs. De este trabajo se derivó el artículo: AROMATIC AMINO ACIDS AND THEIR RELEVANCE IN THE SPECIFICITY OF THE PH DOMAIN.

Se usó el dominio PH-PLC- δ 1 ya que se cuentan con varios mutantes del mismo, tales como el dominio PH-R40A (Yagisawa *et al.*, 1994) y los dominios generados en el laboratorio: PH-K30A, PH-W36F y PH-W36Y. Se usaron diversas técnicas moleculares y bioinformáticas para determinar si la especificidad de los dominios de unión a PIPs, particularmente los dominios PH, solo depende de los aminoácidos con cargas.

Se encontró que no solo las cargas positivas de los residuos de aminoácidos del dominio PH-PLC- δ 1, sino también los residuos aromáticos, en este caso el triptófano, son indispensables para la unión a PIPs y parece tener una función relevante en las diferentes especificidades que presentan los dominios PH.

Este artículo fue publicado en el 2017 en la revista Journal of Molecular recognition. Su DOI es: 10.1002/jmr.2649.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

4.1 AROMATIC AMINO ACIDS AND THEIR RELEVANCE IN THE SPECIFICITY OF THE PH DOMAIN

Ja Morales¹ | M. Sobol² | L.C. Rodríguez - Zapata³ | P. Hozak² | E. Castano¹

¹Unidad de Bioquímica y Biología molecular de plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatan, Mexico. ²Department of Biology of the Cell Nucleus, Institute of Molecular Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic v. v.i, Prague, Czech Republic. ³Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatan, Mexico. ¹Correspondence. E Castano, Unidad de Bioquímica y Biología molecular de plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatan, Mexico. Email: enriquec@cicy.mx.

Funding information: Institute of Molecular Genetics (IMG), Grant/Award Number: CZ.RVO:68378050; HFSP, Grant/Award Number: RGP0017/2013; TACR, Grant/Award Number: TE01020118; GACR, Grant/Award Number: GAP305/11/2232, GA16 - 03346S, and GA15 - 08738S GA15 - 08738S, GA16 - 03346S and GAP305/11/2232; fomix, Grant/Award Number: 247355.; BIOCEV (Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University), Grant/Award Number: CZ.1.05/1.1.00/02.0109; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 176598; European Regional Development Fund, IMG, Grant/Award Number: RVO:68378050; BIOCEV - Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University, Grant/Award Number: CZ.1.05/1.1.00/02.0109; HFSP, Grant/Award Number: RGP0017/2013; Technologicka Agentura Ceske Republiky (TACR); CONACYT, Grant/Award Number: TE01020118 and 176598.

Abstract

Phosphoinositides are phosphatidylinositol derived, well known to be second messengers in various cell-signaling pathways as well as in processes such as cell differentiation, cellular stress response, gene transcription, and chromatin remodeling. The pleckstrin homology domain of phospholipase C - delta 1 is responsible for recognizing and binding to PI(4,5)P₂ and for this reason has been widely used to study this phosphoinositide as a biosensor when it is conjugated to a fluorescent tag. In this work, we modified the primary structure of pleckstrin homology domain by site - specific mutagenesis to change the specificity for phosphoinositides. We obtained 3 mutants: K30A, W36F, and W36Y with different specificity to phosphoinositides. Mutant domain K30A recognized PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, phosphatidic acid (PA), and weakly PI(3,5)P₂. Mutant domain W36F

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

recognized all the phosphoinositides studied and the PA. Finally, mutant domain W36Y seemed to interact with PA and all the other phosphoinositides studied, except PI(3)P.

The changes in recognition argue against a simple charge and nonpolar region model for these interactions and more in favor of a specific docking region with a specific recognition site. We conducted *in silico* modeling that explains the mechanisms behind the observed changes and showed that aromatic amino acids appear to play more important role, than previously thought, in the specificity of phospholipids' binding domains.

KEYWORDS

PH domain, phosphatidic acid, phosphoinositides.

INTRODUCTION

The use of biosensors is a powerful tool for the study of particular molecules in cells, because they are capable of recognizing specific ligands *in vivo* (Balla). Biosensors are used to detect phospholipids (PIPs), which derive from phosphatidylinositol (PI). Phospholipids are involved in many signal transduction events as well as in a stress response, cytoskeletal dynamics, cell migration and polarity, vesicular trafficking, pre-mRNA maturation, gene expression, and chromatin remodeling (Echard, 2012) (Hammond y Balla, 2015) (Hille, 2012) (Maffucci, 2012).

Biosensors are usually the domains of particular proteins, which are capable to recognize the lipid polar heads. This interaction is thought to occur due to the high density of negative charges of the phosphate (PO_4^{3-}) groups with compatible charges of the protein domains (Heilmann y Heilmann, 2013).

The most common domains used to recognize PIPs are the Fab 1, YOTB, Vac 1, and EEA1 zinc finger domain; the four-point-one, ezrin, radixin, moesin domain plant homeodomain; pox domain; and the post-synaptic density protein-95/disk large/zonula occludens-1 domains.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

Common characteristics of all the domains are the presence of positively charged amino acids and at least 1 aromatic amino acid, which is usually tyrosine or histidine (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007). Some of the domains share a similar fold, but the PIPs they recognize are different. It has been suggested that domains with little affinity and/or specificity for PIPs have steric effects that allow different PIPs to bind. Many of these domains are identified in proteins related to cell signaling, cytoskeletal remodeling, vesicular trafficking, and cell proliferation and death, such as protein kinase B, phosphatase and tensin homolog, phospholipase D, phospholipase C, caspase 3, inhibitor of growth protein, and trithorax-homolog protein 1ATX1. (Di Paolo y De Camilli, 2006) (Cauvin y Echard, 2015). The most studied and the most currently used PIP biosensor is the pleckstrin homology (PH) domain of the enzyme phospholipase C-delta 1 (PLC δ 1).

Pleckstrin homology domain was originally described as a novel protein motif of about 100 amino acids, repeated twice in the Pleckstrin protein, the main substrate of protein kinase C (Haslam *et al.*, 1993) (Lemmon, 2008). This domain has been identified in more than 100 proteins, many of them are involved in the signal transduction processes (Lemmon *et al.*, 1996) (Maffucci y Falasca, 2001) through the PH domain interaction with PIPs.

The basic structure of the PH domain is a β sandwich composing of 2 β sheets with 7 β strands (β 1- β 7), forming an angle of almost 90°. β 1 and β 2 strands are joined by a loop called VL1, the strands β 3 and β 4 are connected by the loop VL2, and β 6 and β 7 strands are linked by the loop VL3. VL1 and VL2 loops are responsible for ligand binding, and the C-terminus has the amphipathic alpha helix (Lemmon y Ferguson, 2000) (Tanio y Nishimura, 2013).

Pleckstrin homology domains show remarkable variations in their sequences, affinities, and specificities, which is why many attempts to classify them according to their sequences were inconclusive. Currently, the most widely accepted classification of PH domains is based on their degree of specificity (Drøbak *et al.*, 2000).

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

The PLC δ 1 PH domain is characterized by the presence of 2 additional α -helices: in the N-terminus and in the loop β 5- β 6; none of them have a direct contact with the ligand (Ferguson *et al.*, 1995).

The PH domain of PLC δ 1 binds both to IP3 and PI(4,5)P2 with high affinity (Yagisawa *et al.*, 1998) (Cifuentes *et al.*, 1994), while the conformation of short α -helix (residues 82 to 87) can influence the affinity of the PLC δ 1 PH domain for IP3.

PIPs recognition sites contain residues with positive charges, which are responsible for interacting with the negative charges of the phosphate groups of PIPs (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007) (Hyvönen *et al.*, 1995). However, although serine and aromatic residues constitute these binding sites, their importance for the specificity of PIPs-binding domains remains poorly understood or ignored.

There are several drawbacks of the use of biosensors, in particular related to their capability to bind more than one specific target as well as the intrinsic background from nonspecific binding. For example, PH domain from Akt1 is widely used as a biosensor for both PI(3,4)P2 and PI(3,4,5)P3, but it has different affinity to these PIPs (Idevall-Hagren y De Camilli). Besides, one should consider the differences in the background interactions between various domains. The best way to diminish this effect is to change the affinity of particular biosensors to a given PIP or the affinity of a given biosensor to PIPs (Balla *et al.*, 2000).

In this study, we are focused on the understanding of the interactions of different PIPs with the PLC δ 1 PH domain. We chose this approach to eliminate the possible effects of different backgrounds from various domains as well as to be able to alter specific targets by particular mutations. We have used the computational modeling of the PH domain with the altered structure of the pocket, which is responsible for the interactions between PIPs and the PH domain. The structural changes of the pocket result in the altered specificity of the PH domain to the various PIPs, while the basic charges, which interact with the phosphates groups of the lipid heads, are unchanged.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | PH domain alignment

Ten different PH domains amino acid sequences alignment was performed in MEGA 6 platform. Followings PH domain sequences registered in NCBI database were aligned using MUSCLE (multiple sequence alignment by log-expectation) using its default parameters, looking for conserved residues. The sequences used are gi|1943485, gi|14249340, gi|19115964, gi|1079040, ref/XP_859460.1, gi|417490, ref/AAA93481.2, gb|ACA05825.1, gi|730329, gi|54539.

2.2 | *In silico* mutation and analysis

We used the structure of the PH domain deposited in the Protein Data Bank with the PDB ID 1IMA.17 *In silico* single point mutations in PH-domain binding site residues K30, W36 and R40 were made using SWISS PDB Viewer mutation tool. For the mutant domain K30A construction, we selected the residue K30; after this, we choose the mutate tool in the menu, and we choose an alanine for which we replace it. Later, we applied energy minimization calculation using GROMOS 96 software (that is in the SWISS PDB viewer) for the optimal amino acid orientation. After these, only the 6 AA, which conforms the binding site (K30, K32, W36, R40, E54, and S55), was selected using the control panel, and the rest was deleted using the build menu, and the file was stored in PDB format. The same was made for the mutants W36Y, W36F, and R40A.

Binding site surface, hydrogen bonds and van der Waals radius were calculated with their respective tools in the software and performed using its default setting, and each measured parameter was stored in its respective file. We selected in the display menu, show only the H-bonds for each individual residue.

2.3 | Plasmid and site direct mutagenesis

GST-PLC δ 1PH domain wild-type sequence cloned in plasmid pGST3 and mutant GST PH domain sequence R40A (pGST3-R40A) were a gift from Dr Hitoshi Yagisawa.² Wild type PH-domain DNA sequence was mutated using whole plasmid site direct

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

mutagenesis. (Laible y Boonrod, 2009) The following primers were designed to perform the mutations:

For K30A: fw 5'-CCAGCTTCTGC GTGTGAAGTCCA-3'; rv 5'TGGACTTCACACGCAGAAGCTGG-3'. For W36F: fw 5'GTCCAGCTCGTTTCGTAGGGAAC-3'; rv 5'-GTTCCCTACGAAACGAGCTGGAC-3'. For W36Y: fw 5'GTCCAGCTCGTACCGTAGGGAAC-3';rv5'GTTCCCTACGGTACGAGCTGGAC-3'.

We used a PCR with 30 rounds, denaturalization temperature was 94°C, anneal temperature to 60°C, and the extension temperature was 72°C. Platinum Pfx polymerase (thermofisher) was used. To degrade WT sequence, we used DPN1 enzyme (New England Biolabs) for 1 hour directly in the PCR tubes. The mutant plasmids were named pGST3-R30A, pGST3-W36F, and pGST3-W36Y. We used 5 µl to transform bacterial cells.

2.4 | Recombinant peptides expression and purification

All of the recombinant peptides were expressed in *E. coli* (DE3)-pLysS (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The transformation of both strains was performed by the heat shock method. Expression was induced with 1-isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.1 in LB medium for 2 hours at 37°C and 200 rpm. Bacterial cells were centrifuged at 3000 rcf and 4°C. The pellet was resuspended and sonicated. After this, we centrifuged at 10 000 rcf and 4°C. Soluble fraction was recovered for its further purification.

Purification of the peptides was achieved using a column with glutathione sepharose 4B resin, subsequently; domains were recovered from said matrix under mild elution with glutatión 10 mM to preserve the antigenicity and functionality of the peptides. Purified elution's from each mutant were normalized and loaded in a 12% SDS-PAG and stained with coomassie stained.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

2.5 | Western blot assay

We used 50 ng of the normalized domains and check for western blot comparison. Each elution was loaded in a 12% SDS PAGE. Subsequently, the proteins were transfer to a nitrocellulose membrane that was blocked with PBS- Tween 20 (1%) and 3% of BSA at room temper- ature. Later was made an incubation with anti PH domain rabbit antibody (1/5000) for 2 hours at room temperature and a third with secondary antibody (1/4000) 1 hour at room temperature, with 3 washes between incubations and revealed with chemoluminescence (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent).

2.6 | Fatblot assays

To test the affinity of each domain to different PIPs, the purified domains were tested on PIP Strips (Echelon Biosciences Inc, California) with 100 pM of different PIPs, including the 7 PIPs. Strips were blocked with PBS- Tween 20 (1%) and 3% of BSA or 1 hour at room temperature, then three 10- minute washes with PBS- T were made.

After, strips were incubated first with 0.5 µg/ml of each domain over night at 4°C.

Subsequently, we used the same protocol for incubations with the primary and secondary antibodies in the western blot assay.

3 | RESULTS

Based on the amino acid sequence of the PLCδ1 PH domain from *Rattus norvegicus* (the domain nucleotide sequence has 426 nucleotide bases), NCBI database yielded a total of 100 similar sequences to the PLCδ1 PH domain. Nine of them were selected with a lower percent- age of similarity, but a confirmed affinity for PIPs (see Section 2). We analyzed the amino acids directly involved in the binding of PLCδ1-PH domain to PIPs (PMID 8521504). These amino acids are lysines 30 (K30) and 32 (K32), tryptophan 36 (W36), arginine in position 40 (R40), glutamate 54 (E54), and serine 55 (S55) (Figure 1A). Two glycines are conserved in all sequences. 70%, while tryptophans 52 and 121 are conserved in 80% of the sequences (Figure 1A). One can observe a match between some of the amino acids conserved in the alignment and those involved in the

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

recognition of phosphoinositides. These same amino acids are conserved in 50 or higher percentage except for tryptophan 36 and serine 55 (Figure 1B). We replaced lysine 30 by alanine and tryptophan 36 by phenylalanine or tyrosine (Figure 1C).

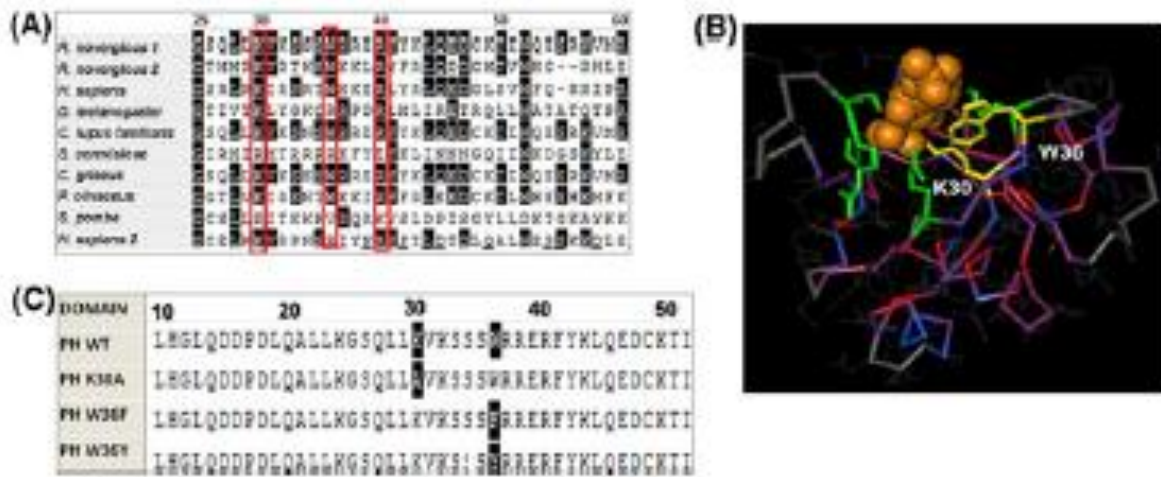


Figure 4.1 Selection of residues for site direct mutagenesis. A, Sequence alignment of distinct PH domains made by the method MUSCLE. Sites conserved by 50% or more are in black. Red boxes indicate amino acids selected for mutagenesis. B, Representation of the tertiary structure of PH domain. Residues highlighted in green are the amino acids essential for the recognition of PI(4,5)P₂ by the PH domain. Yellow amino acids have been selected for the mutagenesis in this study. The color scale from gray to red shows the percentage of conservation for each amino acid residue, with the gray showing less conserved amino acids and the red showing those preserved in 100% of the sequences. The red ones have been used to compare a sequence alignment. Orange molecule IP₃ is in orange and has been used to determine the interaction of phosphate groups. C, Sequence alignment with the residues 9 to 51 of the wild type (WT) and mutant (K30A, W36F, and W36Y) PH domains. Nucleotide sequences were obtained after sequencing to confirm amino acid changes, aligned and translated into their respective amino acid sequences in the program MUSCLE. Residues in black are those changed relative to the wild type PH domain.

Purified recombinant domains were analyzed by PAGE. Only bands corresponding to PH domain, both wild type and mutants, with a molecular weight of 46 kDa were observed in each gel (Figure 2A, lines 1-5), confirming the purification of the domains. To determine the functionality of the antibodies against the PH domain, we used Western blotting and revealed the bands corresponding to the PH domains of the appropriate size (Figure 2B).

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

Fat blots were performed to check whether the mutant PH domains differed in the specificity compared to the wild type domain (Figures 2C, lines 1-5). Wild-type domain binds strongly to PI(4,5)P2 and more weakly to PI(5)P, PI(3,4)P2, and PI(3,4,5)P3 (Figure 2C, line 1). Pleckstrin homology domain with a mutation R40A did not recognize any phosphoinositide (Figure 2C, line 2). In the case of K30A mutant, the fat blot showed that it was capable of binding with a similar specificity to PI(4,5)P2, PI(3,4,5)P3, and PA (Figure 2C, line 3). W36Y mutant appeared to interact with the PA, PI(4)P, PI(3,4)P2, and PI(3,5)P2, while its binding to PI(5)P, PI(4,5)P2, and PI(3,4,5)P3 is much stronger (Figure 2C, line 4). W36F mutant bound all phosphoinositides, although the signal was less intense for PIPs monophosphates as compared to PIPs bisphosphates and PIP triphosphate. It also interacted with PA (Figure 2C, line 5).

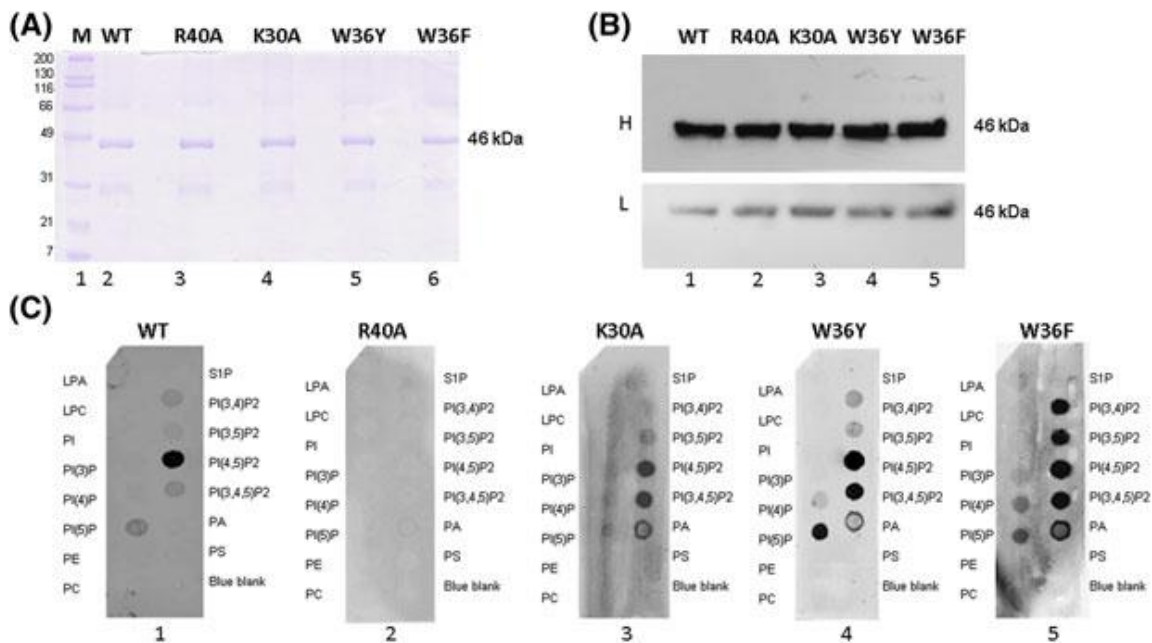


Figure 4.2 Purification of the wild type and mutated PH domains and determination of their specificities. A, Electrophoresis in 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) of the purified wild type PH domain (line 1) and the mutated PH domains: R40A (line 2), K30A (line 3), W36Y (line 4), and W36F (line 5). B, Immunodetection of the wild type (line 1) and mutant (lines 2–5) PH domains as stated on the figure. H and L represent a high and low exposure in the film for quantitative comparison. C, determination of the specificities of the domains by fat blot assay. Line 1, fat blot of wild type PH domain. It recognized PI(5)P, PI(4,5)P2, PI(3,4)P2, and PI(3,4,5)P3. Line 2, fat blot of

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

the mutated PH R40A domain. It did not recognize any of the PIPs present in the PIP strip. Line 3, fat blot of the mutated PH K30A domain. It bound with a similar specificity to PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, and PA. Line 4, fat blot of the mutated PH W36Y domain. It interacted with the PA, PI(4)P, PI(3,4)P₂, and PI(3,5)P₂, while its binding to PI(5)P, PI(4,5)P₂, and PI(3,4,5)P₃ is much stronger. Line 5, fat blot of the mutated PH W36F domain. The domain interacted with all phosphoinositides; the signal was less intense for PIPs monophosphates as compared to PIPs bisphosphates and PIP triphosphate; it also interacted with PA.

To explain the different PIP specificities showed in fat blots, we measured 3 parameters for each domain. The first was the surfaces and cavities in the binding site of the domains. Surface of the wild type PH domain (Figure 3A) near to the fifth PO₄³⁻ of IP₃ differs from the respective area of the R40A mutant (Figure 3B), which seemed to be reduced in this position. A minimal difference appeared to occur in the total surface of the mutant K30A (Figure 3C); however, we observed a slight reduction of the surface very close to the fourth and fifth PO₄³⁻. W36Y and W36F mutants showed significant changes in their surfaces (Figure 3D,E). These changes appeared in the center of the binding site and near the first PO₄³⁻. Van der Waals radius was calculated to see steric impediments and charge differences. Compared with wild type domain (Figure 3F), a loss of a positive charge in the residue 40 in the R40A mutant (Figure 3G) and a predominant presence of a negative charge from E54 near to a negative charge of the fifth PO₄³⁻ of PI(3,4,5)P₃ were observed. A loss of a positive charge in the mutant K30A and a predominance of negative charges were observed; however, it seemed to cause less drastic changes in a charge, a size, and a form of the binding site as compared to the wild type domain (Figure 3H). Mutant W36Y showed a bigger binding site (Figure 3I) and an additional negative charge, corresponding to the hydroxyl group of tyrosine, unlike to mutant W36F, which was otherwise similar to the mutant W36Y (Figures 3J).

Hydrogen bonds (H-bonds) were calculated for each wild type and mutant domains. Wild type R40 could form 2 H-bonds with the fifth PO₄³⁻ of the substrate IP₃ (Figure 3K). Mutant residue A40 was not able to form any H-bond with substrate (Figure 3L). Residue K30 formed 2 H-bonds with the fourth PO₄³⁻ and 1 H-bond with the fifth PO₄³⁻ in the substrate as well as 2 additional H-bonds with E54. Mutant A30 formed only H-bonds with E54 (Figure 3M). Wild type W36 formed 1 H-bond with the fourth PO₄³⁻ in the substrate

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

and 1 H-bond with K32. Both mutant residues Y36 (Figure 3N) and F36 (Figure 3O) maintained only their H-bonds with K32.

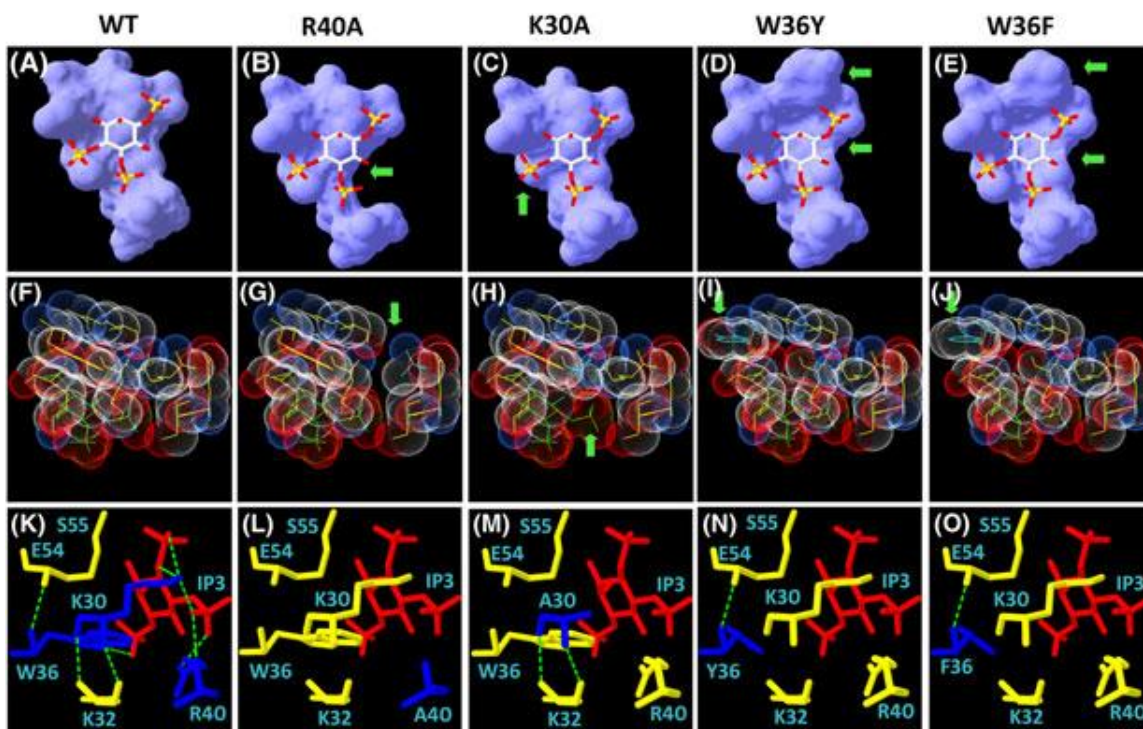


Figure 4.3 Surface changes in PIP recognition site of wt and mutants PH domains. After in silico mutations performed in Swiss-PDBV software. Calculation of molecular surface of the binding site of each domain was performed of both surfaces is shown. A, wt molecular surface; B, R40A PH domains surface; C, K30A PH surface; D, W36Y PH surface E, W36F surface. Van der Waals radius of each residue in wild type and mutant domains. F to J, a first view of van der Waals radius of residues. The residues in the binding site are showed in yellow. Mutagenic residues are in blue. IP3 molecule is highlighted in green. Positive charges are highlighted in strong blue; the negatives are in red, and neutrals are in white. K to O, H-bonds presents in the binding pocket of wt and mutant domains. Residues in the binding site are showed in yellow, except the selected residue for mutagenesis that are showed in blue. H-bonds are showed in green dotted lines. IP3 molecule is colored with red. K, wt Hbonds; L, R40A H-bonds; M, K30A H-bonds; N, W36Y H-bonds; O, W36F H-bonds. Main differences were highlighted with red arrows.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

4 | DISCUSSION

The alignment performed for this and previous work (Tanio y Nishimura, 2013) (Ferguson *et al.*, 1995) (Yagisawa *et al.*, 1994) (Yagisawa *et al.*, 1998) (Tanio y Nishimura, 2012) suggests that amino acids K30, W36, and R40 are indispensable for the binding of PIPs at the PH domain of PLC δ 1. These studies have also studied alanine effect but have been confined mostly to the evaluation of the domain affinity to PI(4,5)P2 without any attempt to explain the mechanisms, which control these changes, otherwise attributed only to the charge effects (Tanio y Nishimura, 2013) (Ferguson *et al.*, 1995) (Ferguson *et al.*, 2000) (Guo *et al.*, 2003) (Hirata *et al.*, 1998) (Lemmon, 2003) (Tuzi *et al.*, 2003). To explore the mechanisms in details and fill up the gaps, the mutations of a basic (K30) and an aromatic (W36) residues were conducted in this study.

The substitution of lysine 30 in the PLC δ 1 PH domain resulted in the specificity of the mutant K30A to PI(4,5)P2, PI(3,4,5)P3, and PA. The residue K30 appears to be necessary for recognition of the PO 4^{3-} group at carbon 3 of the inositol ring, which would explain the apparent changes in the K30A mutant specificity (Tanio y Nishimura, 2013). Unlike lysine, alanine has no charge and is a nonpolar amino acid (Betts y Russell, 2003). As mentioned, the charge plays a fundamental role in the domains binding of PIPs; because of this, we expected a total disruption with any PIP interaction, and however, only the specificity of the mutant domain was observed.

Additionally, the molecular weight of these amino acids is very different: alanine has 89.09 Da, while lysine has 146.19 Da. It seems that because of both factors, a charge and a molecular weight, the mutant K30A requires a higher negative charge to recognize phosphoinositides, preferring those phosphorylated at the third position of the inositol ring. Unlike the mutant R40A, which loses the H-bonds with the substrate, the mutant K30A maintains its capability to bind PIPs; however, it seems that the residue W36 could be enough to hold the fourth PO 4^{3-} of the substrate at the binding site.

It is known (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007) that the PH domain recognition sites for the phosphoinositides are composed of the residues with positive charges, which are responsible for the binding of the negative charges of the phosphoinositides PO 4^{3-}

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

groups. Besides, in the majority of the analyzed domains, there is at least one aromatic residue like tryptophan. W36F mutant was able to bind to the seven species of phosphoinositides more intensively than the W36Y mutant. Tryptophan 36 is involved in the recognition of the PO_4^{3-} at the fifth position of the inositol ring of PI(4,5)P2 in conjunction with arginine 40 (Ferguson *et al.*, 1995) (Yagisawa *et al.*, 1998).

Tryptophan is the amino acid of higher molecular weight (204.23 Da) and is considered to replace a smaller but chemically similar amino acid like phenylalanine, which may cause the increase of the binding pocket and a decrease in the discrimination of the PIPs. This could cause steric interference, which contributes to a correct orientation of the PO_4^{3-} groups of PI(4,5)P2 at the binding site of the wild type PH domain and finally favors to the binding of PI(4,5)P2 against other phosphoinositides (Kavran *et al.*, 1998). Perhaps, because of this effect, the W36F mutant seems to be able to bind to a greater number of PIPs than phenylalanine. Moreover, the negative charge of the hydroxyl group of tyrosine could repulse the fourth PO_4^{3-} . The observed differences in the specificity may also be due to the changes in the tertiary structure of the domain or the domain conformational changes, which allow the interactions with a larger number of PIPs or contribute to the greater binding forces. In support of this, some authors have suggested the importance of allosteric interactions, which cause the changes in the affinity of the PH domain (Tanio y Nishimura, 2012) (Tuzi *et al.*, 2003) (Yan *et al.*, 2005).

5 | CONCLUSIONS

We showed evidence that support the idea that aromatic amino acids plays a pivotal role in the specificity of the PH domain, forming binding pockets with different sizes and shapes, contributing with the electro- static interaction, discriminating certain PIPs, and favoring interaction with others. The mutant domain K30A recognized PI(4,5)P2, PI(3,5) P2, and weakly PI(3,4,5)P3, whereas the mutant PH domain W36F was bound to the 7 phosphoinositides, as well as phosphatidic acid. The mutant PH domain W36Y appears to bind phosphatidic acid and to all phosphoinositides with the exception of PI(3)P. The binding is more intense in case of PI(5)P, PI(4,5)P2, and PI(3,4,5)P3. These observations go against the notion that a mutation in positively charged amino acids would cause a disruption in the interaction between PH domain and PIPs. This would

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL DOMINIO PH POR PIPS

help to design better lipid biosensors that allow for more accurate results and easier to interpret. However, it is necessary to investigate the role that posttranslational modifications could play, eg, phosphorylations, in the regulation of PIP binding proteins in their specificity, since cells must have mechanisms that make their proteins specific to a particular PIP, increasing its affinity for it.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to Pavel Kříž and Wilma Gonzalez for their technical help. We would like to thank for the financial support CONACYT project 176598, GACR (GAP305/11/2232, GA1603346S, and GA15-08738S), Technologicka Agentura Ceske Republiky (TACR) (TE01020118), HFSP (RGP0017/2013), project “BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University” (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the European Regional Development Fund, Institute of Molecular Genetics (IMG) (CV.RVO:68378050).

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En plantas los conocimientos sobre fosfoinosítidos y muerte celular son escasos sobre todo en comparación con lo que se puede encontrar en células humanas, debido a su implicación distintos tipos de cáncer y otras enfermedades (Di Paolo y De Camilli, 2006) (Wen *et al.*, 2011) (Boss y Im, 2012) (Waugh, 2015). La literatura sobre los diferentes tipos de estrés y los mecanismos de tolerancia de las plantas es mucho mayor en este sentido (Zonia y Munnik, 2006; Ruelland *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2017) .

Las especies de *Brassica* particularmente, *B. oleracea* han servido como una importante fuente de conocimiento sobre el estrés y la muerte celular, incluso encontrando en ellas, las primeras evidencias del papel de ciertas moléculas, e.g., Fiby p53 en estos eventos.

Igualmente, los PIPs actúan en estrés en dos frentes; primero como precursores de segundos mensajeros en la detección de estrés y la activación de mecanismos de tolerancia al estrés, incluyendo la detección y respuesta al estrés biótico y abiótico (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2015; Ruelland *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015) (Kalachova *et al.*, 2016); segundo, interactuando directamente con las proteínas, modulando su actividad (Mellman *et al.*, 2008; Ndamukong *et al.*, 2010; Sobol *et al.*, 2018; Yildirim *et al.*, 2013). Por consiguiente, pensamos que están involucrados en la muerte celular, no solo como precursores de segundos mensajeros, sino actuando en la formación de complejos proteína-proteína o proteína-ADN y ARN, por consiguiente, siendo parte esencial en la organización del núcleo durante distintas etapas del ciclo celular y en eventos como la respuesta a estrés y la MCR donde el núcleo debe sufrir una reestructuración como parte de dichos procesos.

Inducción de MCR en *B. oleracea*.

Las inflorescencias de *B. oleracea*, poseen núcleos transcripcionalmente muy activos, por los que poseen un mayor tamaño y esto ha sido útil en otros trabajos de microscopía. Debido a esto, creímos conveniente utilizar coliflores como nuestro modelo de estudio (Loza-Muller *et al.*, 2015).

Se utilizó calor, NaCl, sorbitol, H₂O₂ y glifosato para inducir muerte celular en las inflorescencias de coliflor y posteriormente se extrajo ADN genómico y se observaron sus

DISCUSIÓN GENERAL

núcleos teñidos con DAPI.

Los tratamientos con los diferentes tipos de estrés produjeron morfologías nucleares y patrones de degradación del ADN genómico distintos (Figura 3.3). Esto puede significar que estos tratamientos activan diferentes vías de señalización, lo que pudiera explicar por qué para algunos tratamientos se necesita un mayor tiempo para ver un cambio en la forma de los núcleos o una mayor o menor sensibilidad a cada estrés aplicado. Por ejemplo, aunque con el tratamiento con H₂O₂, se puede observar una degradación de ADN típica de MCR dada por patrones en forma de escalera, se ha reportado el mismo patrón con el tratamiento con calor después de 72 horas de un tratamiento de 45 °C en células de tabaco BY-2 (Vacca *et al.*, 2004).

Se ha observado en otros trabajos que el estrés abiótico causa la condensación del núcleo, lo que se puede observar en los tratamientos aplicados (figura 3.3) como un DAPI más brillante en los tratamientos aplicados, a excepción de los tratamientos con sorbitol y H₂O₂ (Katsuhara, 1997; Koukalová *et al.*, 1997; Tewari *et al.*, 2013).

Aunque debido a su condición de organismos sésiles, las plantas desarrollan múltiples estrategias para detectar y combatir múltiples tensiones al mismo tiempo (Fujita *et al.*, 2006) (Atkinson y Urwin, 2012), sintetizando varias moléculas como proteínas, aminoácidos (aa), ácidos grasos y fosfolípidos para iniciar un proceso adaptativo para mantener la homeostasis (Mittler, 2002) (Wang *et al.*, 2003) (Petrov *et al.*, 2015); está claro que la respuesta al estrés de la planta es una red interconectada, que facilita producir una defensa eficiente y rápida contra las amenazas ambientales y bióticas mediadas por hormonas vegetales y especies de oxígeno reactivo (ROS) (Baxter *et al.*, 2014) (Petrov *et al.*, 2015) (Verma *et al.*, 2016).

Sin embargo, también se ha podido observar que, aunque los mecanismos de detección y respuesta a estrés pueden ser comunes a diferentes estreses, también pueden ser particulares para uno u otro. De esta manera se ha visto que concentraciones específicas de calcio (Ca²⁺), en tiempos precisos pueden activar respuestas para un tipo específico de estrés *in vitro* (Knight y Knight, 2001). Así mismo, se ha podido detectar la expresión tejido-específica de los factores de transcripción DREB2A y DREB2B. Estos se expresan

DISCUSIÓN GENERAL

en la raíz de *Arabidopsis* únicamente por estrés salino, mientras que por estrés por sequía se expresa en las hojas (Nakashima *et al.*, 2000).

También es interesante el hecho de que diferentes estreses producen diferentes efectos en el nucléolo de las células animales. Por ejemplo, el estrés por calor puede causar la disrupción del nucléolo y cuerpos cajales más pequeños en *Xenopus*, lo que no ocurre con el estrés por frío, donde no hay efecto sobre el nucléolo, pero si produce un aumento en el tamaño de los cuerpos cajales; mientras que la radiación UV provoca segregación nucleolar (Boulon *et al.*, 2010; Carmo-Fonseca *et al.*, 1993; Handwerger *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1996).

Se eligió el tratamiento por calor debido a que *B. oleracea* es sensible a las altas temperaturas. Por ejemplo, las Inflorescencias de *B. oleracea var. italica* (brócoli), presenta una reducción de la floración después de un tratamiento de calor a 35 °C, los brotes redujeron su tamaño entre 50 y 75% en plantas tratadas y la morfología de las inflorescencias presentaron un desarrollo anormal (Angadi *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2015). Esto podría ser interesante ya que, las altas temperaturas causadas por el calentamiento global se conviertan en un factor limitante para la producción, por lo que la investigación sobre la tolerancia al estrés por calor será de gran importancia.

Además de lo anterior, también se eligió este tratamiento debido a que provocaba cambios en la morfología nuclear y nucleolar, lo que pudiera implicar la participación de Fib. También se observó un incremento de PIP₂ en el núcleo de células de tabaco, BY-2, durante un tratamiento de estrés por calor (Mishkind *et al.*, 2009). Igualmente se observaron la activación de proteínas con actividad de caspasas, un procesamiento del ADN genómico y de cambios en la morfología nuclear que sugieren la activación de una MCR de tipo apoptótica inducida por calor en plantas y animales (Matsushita *et al.*, 2016; Petrov *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2009; Vacca *et al.*, 2004; Vacca *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015).

Todas estas observaciones hicieron decantarnos por el estrés por calor, en detrimento de, sobre todo el estrés por H₂O₂, ya que este es un estrés secundario derivado de múltiples estreses primarios, que podría impedir observar otros eventos rio arriba de la detección de

DISCUSIÓN GENERAL

un estrés primario.

Desarrollo de herramientas para el estudio de los PIPs nucleares.

Se ha atribuido una gran cantidad de funciones a estas siete moléculas, incluidas algunas específicas del núcleo celular: procesamiento previo al ARNm, expresión génica, remodelación de la cromatina, proliferación y muerte celular (Di Paolo y De Camilli, 2006). Sin embargo, los mecanismos por los cuales los PIP están involucrados en estas funciones no están claros porque los enfoques metodológicos actuales no pueden diferenciar entre el metabolismo PIP y los cambios en las interacciones PIP-proteína (Lewis *et al.*, 2011).

En el caso de los biosensores derivados de los dominios de tipo PH, éstos reconocen más de un PIP aunque su afinidad podría ser más fuerte para uno o incluso uno de sus productos polares (por ejemplo, IP₃) (Balla *et al.*, 2000; Kavran *et al.*, 1998). De la misma manera, es posible que el biosensor no se una a un PIP particular debido a una interacción entre el PIP y las proteínas cercanas a una región celular específica (Balla, 2005).

Por ejemplo, el dominio PH de Akt1 se usa ampliamente como biosensor para PI (3,4) P₂ y PI (3,4,5) P₃. Ésto, junto con diferencias en la afinidad del PIP que pueden impedir la detección de bajas concentraciones del lípido, garantiza el uso de múltiples biosensores superpuestos para confirmar la presencia de un PIP específico (Balla *et al.*, 2000). Es por esto que se decidió profundizar en como el dominio PH de la PLC- δ 1 se une a los PIPs.

Los estudios previos se habían limitado principalmente a la evaluación de la afinidad del dominio a PI(4,5)P₂ sin ningún intento de explicar los mecanismos que controlan estos cambios, que de otro modo se atribuyen solo a los efectos de la carga (Ferguson *et al.*, 1995) (Guo *et al.*, 2003) (Hirata *et al.*, 1998) (Lemmon, 2003) (Tuzi *et al.*, 2003) (Tanio y Nishimura, 2013).

Ya que se sabe que los sitios de reconocimiento del dominio PH para los fosfoinosítidos se componen de los residuos con cargas positivas, que son responsables de la unión de las cargas negativas de los grupos PO₄³⁻ de fosfoinosítidos (Rosenhouse-Dantsker y

DISCUSIÓN GENERAL

Logothetis, 2007). Además, en la mayoría de los dominios analizados, hay al menos un residuo aromático como el triptófano.

Para explorar los mecanismos en detalle, en este estudio se realizaron las mutaciones de un residuo básico (K30) y uno aromático (W36), que además son necesarios para la unión del dominio PH a los PIPs.

Con esto, se mostró evidencias que apoyan la idea de que los aminoácidos aromáticos desempeñan un papel fundamental en la especificidad del dominio PH, formando focos de unión con diferentes tamaños y formas, contribuyendo con la interacción electrostática, discriminando ciertos PIP y favoreciendo la interacción con otros (una discusión más amplia al respecto se encuentra en el capítulo IV de éste trabajo).

De igual manera, otras técnicas empleadas para detectar PIPs tienen un problema en común: la dificultad para distinguir entre isómeros (Pettitt *et al.*, 2006; Várnai y Balla, 2006). Estas técnicas suelen ser la TLC y la HPLC (high performance liquid chromatography). En la primera se suele hacer una segunda dimensión para separar isómeros y se suele usar marcaje radiactivo, generalmente ^{32}P , en las que un isómero presenta un factor de retención apenas distinto del otro (Munnik y Zarza, 2013). En la segunda, ha sido necesario el uso de sistemas distintos e incluso de columnas diferentes para distinguir entre isómeros (Idevall-Hagren y De Camilli, 2015; Kiefer *et al.*, 2010; Nasuhoglu *et al.*, 2002).

En este trabajo intentamos desarrollar una técnica que nos permitiese utilizar estos biosensores para detectar PIPs en extracciones de fosfolípidos. Para esto realizamos una extracción de los fosfolípidos de las inflorescencias y una TLC en membrana de nitrocelulosa para después usar la inmunodetección. Sin embargo, nuestros resultados muestran una pobre resolución, debido probablemente a que las TLC se realizan en membranas de sílice que se impregnan con oxalato de potasio, lo que ayuda a mejorar la separación de los componentes de la extracción, pero debido a que no se contaba con este reactivo no se pudo probar si las membranas de nitrocelulosa soportaban este tratamiento previo y mejoraba así la separación.

DISCUSIÓN GENERAL

Como ya se ha dicho, se necesitan distintos biosensores para distinguir entre isómeros de PIPs (Balla *et al.*, 2000), sin embargo, para muchos grupos de investigación es más fácil tener acceso a ellos que a múltiples columnas, equipos de HPLC y marca radiactiva. Por lo que es importante desarrollar una técnica como esta, que podría ser usada, como un método capaz de detectar moléculas en el rango de los pg.

Se logró expresar y purificar el dominio PH-His, no así el dominio XY-E341A. Esto con el objetivo de determinar si los biosensores, al unirse a los PIPs a través de sus cabezas polares (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007), son capaces de reconocer una molécula de estos fosfolípidos que ya está unida a otra proteína (Várnai y Balla, 2006). Esto es necesario, porque se ha observado que, en células humanas durante la mitosis, es posible observar un incremento en la señal de anticuerpos con etiqueta fluorescentes contra PIP₂, pero no se observa ningún cambio en los niveles de este fosfolípido después de realizar una TLC. Esto sugiere que no es la síntesis de PIP₂ lo que provoca el aumento de la fluorescencia, sino PIP₂ que ha sido liberado de una unión previa a otra proteína (Castaño, no publicado). Tener un dominio con etiquetas diferentes, nos permitirá distinguirlas por sus masas moleculares en un ensayo de unión a PIP₂. Si no es posible, quiere decir que, con los biosensores usados en microscopía, solo somos capaces de observar ciertas moléculas de PIPs. El mismo principio se aplicaría al dominio XY-E341A, el cual es capaz de unirse a PIP₂ sin degradarlo, debido a su mutación (Okada *et al.*, 2005).

En el sentido de mejorar la capacidad de distinguir las moléculas de PIP₂, se realizó el marcaje fluorescente del dominio PH con el fluoróforo Alexa-488. De esta manera no se requería el uso de anticuerpos para visualizar PIP₂. Nuestros resultados sugieren que el marcaje se realizó de manera correcta, sin embargo, la distribución observada es distinta a lo reportado por otros autores en otras especies vegetales (Mishkind *et al.*, 2009; Rodriguez-Corona *et al.*, 2017), en los que se observan, estructuras granuladas en el núcleo y la envoltura nuclear. En cuanto a esto, la señal se asemeja más a lo reportado por Mishkind; sin embargo, esto ocurre después de un estrés y no en los testigos; además de que hay que tomar en cuenta que se trata de dominios expresados *in vivo* y no de células fijadas e incubadas con él. Esto puede indicar que pudiera tratarse de inespecificidad o autofluorescencia del tejido o del DAPI debido a la fotoconversión

DISCUSIÓN GENERAL

provocada por la luz UV y que provoca que emita señal en los canales verde y rojo (Jež *et al.*, 2013; Karg y Golic, 2018; Źurek-Biesiada *et al.*, 2013). Por lo tanto, es necesario realizar más experimentos probando con enzimas para digerir la pared celular para mejorar la señal del dominio y descartar la autofluorescencia o la fotoconversión de DAPI.

Finalmente, se lograron expresar todos los biosensores de PIPs y el biosensor de PA, Spo20, excepto los biosensores tubby, ENT3 y ENT5, por lo que es necesario encontrar las condiciones adecuadas para su expresión. Esto es necesario para contar con al menos dos biosensores para cada PIP, para asegurarnos que podemos observar la misma especie. Al respecto, se ha mencionado ya mucho sobre la necesidad de usar distintos biosensores (Balla, 2005; Balla *et al.*, 2000; Várnai y Balla, 2006), y además, recientemente se revisó de manera más profunda las diferencias en la distribución de las señales de biosensores de un mismo fosfoinosítido en el núcleo celular (Kalasova *et al.*, 2016). En dicho trabajo se puede observar que biosensores del mismo PIP pueden tener distribuciones diferentes incluso si se expresan *in vivo* o si se incuban con células fijadas. Esto se puede explicar por la especificidad de cada dominio y sugiere la capacidad de los biosensores discriminar entre fosfoinosítidos con las mismas cabezas polares pero distintas cadenas de ácidos grasos.

Los resultados de la inmunolocalización de Fib, sugieren que las inflorescencias de coliflor utilizadas en estos experimentos estaban estresadas, esto es posible debido al manejo que se les da en el supermercado. Fib debe estar localizada principalmente en el nucléolo en células sin estrés (Cerdido y Medina, 1995; Loza-Muller *et al.*, 2015; Rodriguez-Corona *et al.*, 2017), mientras que la localización mostrada en nuestros resultados, donde se observa en todo el núcleo y alrededor de él, es similar a la que se ha identificado en células estresadas (Canetta *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2017; Tomás *et al.*, 2013). Sin embargo, el tratamiento con temperatura si provoca un cambio significativo con respecto a el testigo, ubicándose la señal del anticuerpo completamente fuera del núcleo (Anexo, figura A.3) lo que también es común en células estresadas (Chen y von Mikecz, 2000; Tomás *et al.*, 2013).

La capacidad de Fib de unirse a PIPs (datos no publicados) aunado a la relación de esta con el estrés por calor y la muerte celular (Amin *et al.*, 2007; Ruchalski *et al.*, 2006)

DISCUSIÓN GENERAL

(Tomás *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2007), la vuelven un candidato ideal para ser usado como biosensor en este trabajo y refuerzan la elección del calor como tratamiento para inducir muerte celular en estudios posteriores.

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Se sometieron inflorescencias de *B. oleracea* a diferentes tipos de estrés y en base al análisis de la morfología nuclear y del ADN genómico, así como los datos disponibles en la literatura, se decidió utilizar el estrés por calor.

Se expresaron y purificaron los biosensores de PIPs: PH-plc δ 1, PH-OSH2, Fyve, PH-GRP1, PH-DOK5 y PH-AKT y del biosensor de PA, Spo20. Además, se clonaron los dominios PH y XY-E341A y se logró expresar y purificar el dominio PH-His.

Se establecieron las bases para desarrollar un protocolo de detección de PIPs en TLC con el uso de biosensores.

Con los mutantes del dominio PH-plc δ 1 se aportó conocimiento sobre cómo se lleva a cabo el reconocimiento de los biosensores de los PIPs. Con el uso de los dominios PH-His y XY-E341A se pretende ahondar más en el estudio de los biosensores.

No se logró probar los biosensores en las inflorescencias; sin embargo, las herramientas desarrolladas permitirán en el corto plazo realizar la detección de los PIPs y determinar sus cambios durante el estrés.

Todas estas herramientas permitirán profundizar en el papel de los PIPs en el estrés y la muerte celular en plantas, así como de su función en el mantenimiento y la remodelación de la arquitectura nuclear en distintos eventos, a través de su interacción con proteínas e incluso el ADN y ARN.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Generar una línea de suspensiones celulares de *B. oleracea* para probar en un sistema con un mayor control de las condiciones ideales de las muestras biológicas para realizar los tratamientos de estrés por calor, así como de los ensayos de microscopía.

Realizar la detección de PIPs en núcleos de *B. oleracea*.

Determinar si el dominio PH-PLC δ 1, reconoce a todas las moléculas de PIP₂ o solo aquellas que no están unidas a otras proteínas.

Cuantificar los PIPs nucleares y de la membrana plasmática durante el estrés por calor y la MCR inducida por calor y determinar los cambios en las células sin y con tratamiento y determinar si estos cambios se relacionan con lo observado con los biosensores en la microscopía confocal.

Utilizar perlas de agarosa con PIPs específicos inmovilizados en esta matriz, una vez que se determine cuáles son los fosfoinosítidos cuya distribución cambia por efecto del estrés y de la MCR. Estas perlas se usarían con la extracción de proteínas nucleares de *B. oleracea* bajo condiciones de control y de estrés para determinar qué proteínas interactúan con PIPs durante el estrés y la MCR.

Realizar la búsqueda de proteínas de plantas con dominios que se unan a PIPs para disponer de biosensores que sean capaces de unirse a los PIPs bajo las condiciones celulares propias de las plantas.

Determinar si proteínas con actividad de caspasas participan en la MCR inducida por calor en *B. oleracea*.

Determinar si los fosfoinosítidos de las plantas pueden interactuar con las proteínas de actividad de caspasas, tal como se ha reportado que sucede con las caspasas de humanos y su interacción con PIP₂ y PIP₃.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abd-El-Haliem, A. M., Vossen, J. H., van Zeijl, A., Dezhsetan, S., Testerink, C., Seidl, M. F., . . . Joosten, M. H. A. J. (2016). Biochemical characterization of the tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) family and its role in plant immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9, Part B), 1365-1378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.017>
- Akhter, S., Uddin, M. N., Jeong, I. S., Kim, D. W., Liu, X.-M., y Bahk, J. D. (2016). Role of *Arabidopsis* AtPI4Ky3, a type II phosphoinositide 4-kinase, in abiotic stress responses and floral transition. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 215-230. doi: 10.1111/pbi.12376
- Amin, M. A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., y Fukui, K. (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 320-326. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.092>
- Andersson, M. X., Kourtchenko, O., Dangl, J. L., Mackey, D., y Ellerström, M. (2006). Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 47(6), 947-959. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02844.x
- Angadi, S. V., Cutforth, H. W., Miller, P. R., McConkey, B. G., Entz, M. H., Brandt, S. A., y Volkmar, K. M. (2000). Response of three Brassica species to high temperature stress during reproductive growth. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(4), 693-701. doi: 10.4141/P99-152
- Anne, P., Rodnay, S., Mathieu, R.-G., Magdalena, M. J., Christa, T., Jerome, J., . . . Veronique, G. (2012). A novel class of PTEN protein in *Arabidopsis* displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *Biochemical Journal*, 441(1), 161-171.
- Antignani, V., Klocko, A. L., Bak, G., Chandrasekaran, S. D., Dunivin, T., y Nielsen, E. (2015). Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4K β 1/ β 2 Phosphatidylinositol-4 Kinases by the Small GTPase RabA4B Plays Important Roles during Salicylic Acid-Mediated Plant Defense Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(1), 243-261. doi: 10.1105/tpc.114.134262
- Ashkenazi, A., y Salvesen, G. (2014). Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 337-356. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013226
- Ashraf, M., y Mehmood, S. (1990). Response of four Brassica species to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 30(1), 93-100. doi: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(90\)90013-T](https://doi.org/10.1016/0098-8472(90)90013-T)

REFERENCIAS

- Atkinson, N. J., y Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523-3543. doi: 10.1093/jxb/ers100
- Balla, T. (2005). Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2093-2104. doi: 10.1242/jcs.02387
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiological Reviews*, 93(3), 1019-1137.
- Balla, T., Bondeva, T., y Várnai, P. (2000). How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(7), 238-241. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01500-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01500-5)
- Baxter, A., Mittler, R., y Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229-1240. doi: 10.1093/jxb/ert375
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., y Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 135-147. doi: 10.1038/nrm3737
- Betts, M. J., y Russell, R. B. (2003). Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions *Bioinformatics for Geneticists* (pp. 289-316): John Wiley & Sons, Ltd.
- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H. G., y Campagne, M. M. L. (1997). A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction*, 10(4), 200-208. doi: 10.1007/s004970050088
- Bone, R., Frank, L., Springer, J. P., Pollack, S. J., Osborne, S., Atack, J. R., . . . Ragan, C. I. (1994). Structural Analysis of Inositol Monophosphatase Complexes with Substrates. *Biochemistry*, 33(32), 9460-9467. doi: 10.1021/bi00198a011
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G. E., y Gallois, P. (2008). What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 491-499. doi: 10.1093/jxb/erm352
- Boss, W. F., y Im, Y. J. (2012). Phosphoinositide Signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 63(1), 409-429. doi: doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103840
- Boss, W. F., y Massel, M. O. (1985). Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 132(3), 1018-1023. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)91908-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(85)91908-4)
- Bostock, R. M., Pye, M. F., y Roubtsova, T. V. (2014). Predisposition in Plant Disease: Exploiting the Nexus in Abiotic and Biotic Stress Perception and Response. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 517-549. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172902

REFERENCIAS

- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F.-M., y Lamond, A. I. (2010). The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell*, 40(2), 216-227. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.024
- Brady, C. A., y Attardi, L. D. (2010). p53 at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(15), 2527.
- Brambilla, G., Mattioli, F., y Martelli, A. (2010). Genotoxic and carcinogenic effects of gastrointestinal drugs. *Mutagenesis*, 25(4), 315-326. doi: 10.1093/mutage/geq025
- Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., . . . Talianky, M. (2008). A Plant Virus Movement Protein Forms Ringlike Complexes with the Major Nucleolar Protein, Fibrillarin, In Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 932-937. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.039>
- Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J., y Lamond, A. I. (1993). Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *The Journal of Cell Biology*, 120(4), 841.
- Carpaneto, A., Boccaccio, A., Lagostena, L., Di Zanni, E., y Scholz-Starke, J. (2017). The signaling lipid phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate targets plant CLC-a anion/H+ exchange activity. *EMBO reports*, 18(7), 1100-1107. doi: 10.15252/embr.201643814
- Cauvin, C., y Echard, A. (2015). Phosphoinositides: Lipids with informative heads and mastermind functions in cell division. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 832-843. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.013>
- Cerdido, A., y Medina, F. J. (1995). Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, 103(9), 625-634. doi: 10.1007/bf00357689
- Cifuentes, M. E., Delaney, T., y Rebecchi, M. J. (1994). D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate inhibits binding of phospholipase C-delta 1 to bilayer membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 1945-1948.
- Contento, A. L., Kim, S.-J., y Bassham, D. C. (2004). Transcriptome Profiling of the Response of *Arabidopsis* Suspension Culture Cells to Suc Starvation. *Plant Physiology*, 135(4), 2330.
- Cordewener, J. H. G., Hause, G., Gorgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H. J. M., . . . Pechan, P. (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta*, 196(4), 747-755. doi: 10.1007/BF01106770
- Coupe, S. A., Sinclair, B. K., Watson, L. M., Heyes, J. A., y Eason, J. R. (2003).

REFERENCIAS

- Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *J Exp Bot*, 54(384), 1045-1056.
- Coupe, S. A., Watson, L. M., Ryan, D. J., Pinkney, T. T., y Eason, J. R. (2004). Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 59-68. doi: 10.1093/jxb/erh018
- Chen, M., y von Mikecz, A. (2000). Specific Inhibition of rRNA Transcription and Dynamic Relocation of Fibrillarin Induced by Mercury. *Experimental Cell Research*, 259(1), 225-238. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4923>
- Chichkova, N. V., Tuzhikov, A. I., Taliansky, M., y Vartapetian, A. B. (2012). Plant phytaspases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 77-84. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01560.x
- Das, S., Hussain, A., Bock, C., Keller, W. A., y Georges, F. (2005). Cloning of *Brassica napus* phospholipase C2 (BnPLC2), phosphatidylinositol 3-kinase (BnVPS34) and phosphatidylinositol synthase1 (BnPtdIns S1)—comparative analysis of the effect of abiotic stresses on the expression of phosphatidylinositol signal transduction-related genes in *B. napus*. *Planta*, 220(5), 777-784. doi: 10.1007/s00425-004-1389-0
- Deak, M., Casamayor, A., Currie, R. A., Downes, C. P., y Alessi, D. R. (1999). Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Letters*, 451(3), 220-226. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00556-6
- del Pozo, O., y Lam, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology*, 8(20), 1129-1132. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70469-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70469-5)
- Demarco, I. A., Periasamy, A., Booker, C. F., y Day, R. N. (2006). Monitoring dynamic protein interactions with photoquenching FRET. *Nature methods*, 3(7), 519-524. doi: 10.1038/nmeth889
- Desclos, M., Dubousset, L., Etienne, P., Le Caherec, F., Satoh, H., Bonnefoy, J., . . . Avice, J.-C. (2008). A Proteomic Profiling Approach to Reveal a Novel Role of Brassica napus Drought 22 kD/Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein in Young Leaves during Nitrogen Remobilization Induced by Stressful Conditions. *Plant Physiology*, 147(4), 1830.
- DeWald, D. B., Torabinejad, J., Jones, C. A., Shope, J. C., Cangelosi, A. R., Thompson, J. E., . . . Hama, H. (2001). Rapid Accumulation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Correlates with Calcium Mobilization in Salt-Stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(2), 759-769.

REFERENCIAS

- Di Paolo, G., y De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651-657.
- Dieck, C. B., Boss, W. F., y Perera, I. Y. (2012). A Role for Phosphoinositides in Regulating Plant Nuclear Functions. *Frontiers in Plant Science*, 3, 50. doi: 10.3389/fpls.2012.00050
- Dove, S. K., Cooke, F. T., Douglas, M. R., Sayers, L. G., Parker, P. J., y Michell, R. H. (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature*, 390(6656), 187-192.
- Drøbak, B. K., Brewin, N. J., y Hernandez, L. E. (2000). Extraction, Separation, and Analysis of Plant Phosphoinositides and Complex Glycolipids. In G. A. Tucker & J. A. Roberts (Eds.), *Plant Hormone Protocols* (pp. 157-174). Totowa, NJ: Humana Press.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V., y Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13), 1050-1062. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>
- Eason, J. R., Ryan, D. J., Watson, L. M., Hedderley, D., Christey, M. C., Braun, R. H., y Coupe, S. A. (2005). Suppression of the cysteine protease, aleurain, delays floret senescence in Brassica oleracea. *Plant Molecular Biology*, 57(5), 645-657. doi: 10.1007/s11103-005-0999-7
- Echard, A. (2012). Phosphoinositides and cytokinesis: The “PIP” of the iceberg. *Cytoskeleton*, 69(11), 893-912. doi: 10.1002/cm.21067
- El Kasmi, F., y Nishimura, M. T. (2016). Structural insights into plant NLR immune receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), 12619.
- Fabijanski, S., Altosaar, I., y Arnison, P. G. (1987). Heat Shock Response of Brassica oleracea L. (Broccoli). *Journal of Plant Physiology*, 128(1), 29-38. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80179-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80179-7)
- Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G., Fournier, E., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., y Lemmon, M. A. (2000). Structural Basis for Discrimination of 3-Phosphoinositides by Pleckstrin Homology Domains. *Molecular Cell*, 6(2), 373-384. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00037-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00037-X)
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., y Sigler, P. B. (1995). Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell*, 83(6), 1037-1046. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90219-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90219-8)
- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., Brukhin, V. B., Daniel, G., Zhivotovsky, B., y von Arnold, S. (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of*

REFERENCIAS

- Cell Science*, 113(24), 4399-4411.
- Fuchs, Y., y Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147(4), 742-758. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 436-442. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., . . . Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22(1), 58-73. doi: 10.1038/cdd.2014.137
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., y Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14(7), 1237-1243.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., . . . Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107-120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., y A., B.-S. S. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493-501.
- Golstein, P., y Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
- Gonorazky, G., Laxalt, A. M., Testerink, C., Munnik, T., y De La Canal, L. (2008). Phosphatidylinositol 4-phosphate accumulates extracellularly upon xylanase treatment in tomato cell suspensions. *Plant, Cell & Environment*, 31(8), 1051-1062. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01818.x
- Good, A. G., y Zaplachinski, S. T. (1994). The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in Brassica napus. *Physiologia Plantarum*, 90(1), 9-14. doi: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb02185.x
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2016). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), pdb.prot093344. doi: 10.1101/pdb.prot093344
- Guo, J., Wenk, M. R., Pellegrini, L., Onofri, F., Benfenati, F., y De Camilli, P. (2003). Phosphatidylinositol 4-kinase type II α is responsible for the phosphatidylinositol 4-

REFERENCIAS

- kinase activity associated with synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3995-4000. doi: 10.1073/pnas.0230488100
- Gupta, R., Ting, J. T. L., Sokolov, L. N., Johnson, S. A., y Luan, S. (2002). A Tumor Suppressor Homolog, AtPTEN1, Is Essential for Pollen Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(10), 2495-2507. doi: 10.1105/tpc.005702
- Hammond, G. R. V., y Balla, T. (2015). Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 746-758. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.013>
- Handwerger, K. E., Wu, Z., an, Murphy, C., y Gall, J. G. (2002). Heat shock induces mini-Cajal bodies in the Xenopus; germinal vesicle. *Journal of Cell Science*, 115(10), 2011.
- Haslam, R. J., Koide, H. B., y Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature*, 363(6427), 309-310.
- Heilmann, M., y Heilmann, I. (2013). Arranged marriage in lipid signalling? The limited choices of PtdIns(4,5)P2 in finding the right partner. *Plant Biology*, 15(5), 789-797. doi: 10.1111/plb.12025
- Hille, B. (2012). Diversity of phosphoinositide signaling. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 6(2), 113-119. doi: 10.1134/S1990747812010059
- Hirata, M., Kanematsu, T., Takeuchi, H., y Yagisawa, H. (1998). Pleckstrin Homology Domain as an Inositol Compound Binding Module. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 76(3), 255-263. doi: 10.1254/jjp.76.255
- Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T., y Shinozaki, K. (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3903-3907.
- Hou, Q., Ufer, G., y Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 1029-1048. doi: 10.1111/pce.12666
- Hyvönen, M., Macias, M. J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M., y Wilmanns, M. (1995). Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *The EMBO Journal*, 14(19), 4676-4685.
- Idevall-Hagren, O., y De Camilli, P. (2015). Detection and manipulation of phosphoinositides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 736-745. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.008>
- Iriti, M., y Faoro, F. (2003). Benzothiadiazole (BTH) Induces Cell-Death Independent

REFERENCIAS

- Resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, 151(3), 171-180. doi: 10.1046/j.1439-0434.2003.00700.x
- Jež, M., Bas, T., Veber, M., Košir, A., Dominko, T., Page, R., y Rožman, P. (2013). The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(1), 195-204. doi: 10.1007/s00418-012-1039-8
- Joerger, A. C., y Fersht, A. R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 375-404. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014710
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. J., . . . Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554. doi: http://www.nature.com/nature/journal/v410/n6828/suppinfo/410549a0_S1.html
- Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L. C., y Williams, B. (2017). The Life and Death of a Plant Cell. *Annu Rev Plant Biol*, 68(1), 375-404. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111655
- Kalachova, T., Puga-Freitas, R., Kravets, V., Soubigou-Taconnat, L., Repellin, A., Balzergue, S., . . . Ruelland, E. (2016). The inhibition of basal phosphoinositide-dependent phospholipase C activity in *Arabidopsis* suspension cells by abscisic or salicylic acid acts as a signalling hub accounting for an important overlap in transcriptome remodelling induced by these hormones. *Environmental and Experimental Botany*, 123, 37-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.003>
- Kalasova, I., Fáberová, V., Kalendová, A., Yildirim, S., Uličná, L., Venit, T., y Hozák, P. (2016). Tools for visualization of phosphoinositides in the cell nucleus. *Histochemistry and Cell Biology*, 145(4), 485-496. doi: 10.1007/s00418-016-1409-8
- Kale, S. D., Gu, B., Capelluto, D. G. S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., . . . Tyler, B. M. (2010). External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell*, 142(2), 284-295. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.008>
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., . . . Farber, E. (2002). Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). *International Journal of Oncology* 21(1), 165-170.
- Karali, D., Oxley, D., Runions, J., Ktistakis, N., y Farmaki, T. (2012). The *Arabidopsis thaliana* Immunophilin ROF1 Directly Interacts with PI(3)P and PI(3,5)P(2) and Affects Germination under Osmotic Stress. *PLoS ONE*, 7(11), e48241. doi: 10.1371/journal.pone.0048241

REFERENCIAS

- Karg, T. J., y Golic, K. G. (2018). Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation. *Chromosoma*, 127(2), 235-245. doi: 10.1007/s00412-017-0654-5
- Katsuhara, M. (1997). Apoptosis-Like Cell Death in Barley Roots under Salt Stress. *Plant and Cell Physiology*, 38(9), 1091-1093.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., y Lemmon, M. A. (1998). Specificity and Promiscuity in Phosphoinositide Binding by Pleckstrin Homology Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30497-30508. doi: 10.1074/jbc.273.46.30497
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., y Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Khandelwal, A., Kumar, A., Banerjee, M., y Garg, G. K. (2002). Effect of alternaria pathotoxin(s) on expression of p53-like apoptotic protein in calli and leaves of Brassica campestris. *Indian J Exp Biol*, 40(1), 89-94.
- Kiefer, S., Rogger, J., Melone, A., Mertz, A. C., Koryakina, A., Hamburger, M., y Küenzi, P. (2010). Separation and detection of all phosphoinositide isomers by ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 552-558. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.03.029>
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Brown, J. W. S., y Taliansky, M. (2004). Involvement of the nucleolus in plant virus systemic infection. *Biochemical Society Transactions*, 32(4), 557.
- Knight, H., y Knight, M. R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 6(6), 262-267. doi: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01946-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01946-X)
- Kodiha, M., Chu, A., Lazrak, O., y Stochaj, U. (2005). Stress inhibits nucleocytoplasmic shuttling of heat shock protein hsc70. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289(4), C1034-C1041. doi: 10.1152/ajpcell.00590.2004
- Koukalová, B. e., Kovarčík, A., Fajkus, J. í., y Šíroký, J. í. (1997). Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters*, 414(2), 289-292. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01008-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01008-9)
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., . . . Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vicencio, J. M., Kepp, O., Tasdemir, E., y Maiuri, M. C. (2008). To Die or Not to Die: That is the Autophagic Question. *Current Molecular Medicine*,

REFERENCIAS

- 8(2), 78-91.
- Laible, M., y Boonrod, K. (2009). Homemade Site Directed Mutagenesis of Whole Plasmids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(27), 1135. doi: 10.3791/1135
- Laster, S. M., Wood, J. G., y Gooding, L. R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *The Journal of Immunology*, 141(8), 2629-2634.
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide Recognition Domains. *Traffic*, 4(4), 201-213. doi: 10.1034/j.1600-0854.2004.00071.x
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 99-111.
- Lemmon, M. A., y Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochemical Journal*, 350(Pt 1), 1-18.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., y Schlessinger, J. (1996). PH Domains: Diverse Sequences with a Common Fold Recruit Signaling Molecules to the Cell Surface. *Cell*, 85(5), 621-624. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81022-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81022-3)
- Levine, A. J., y Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer*, 9(10), 749-758. doi: 10.1038/nrc2723
- Lewis, A. E., Sommer, L., Arntzen, M. Ø., Strahm, Y., Morrice, N. A., Divecha, N., y D'Santos, C. S. (2011). Identification of Nuclear Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Interacting Proteins by Neomycin Extraction. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(2). doi: 10.1074/mcp.M110.003376
- Li, Z., Zhang, Y., Jiang, Z., Jin, X., Zhang, K., Wang, X., . . . Li, D. (2017). Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*. doi: 10.1111/mpp.12612
- Lin, H.-H., Lin, K.-H., Chen, S.-C., Shen, Y.-H., y Lo, H.-F. (2015). Proteomic analysis of broccoli (*Brassica oleracea*) under high temperature and waterlogging stresses. *Botanical Studies*, 56(1), 18. doi: 10.1186/s40529-015-0098-2
- Liu, Y., Liang, S., y Tartakoff, A. M. (1996). Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear protein import and poly(A)+ RNA export. *The EMBO Journal*, 15(23), 6750-6757.
- Love, A. J., Yu, C., Petukhova, N. V., Kalinina, N. O., Chen, J., y Taliansky, M. E. (2016). Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses. *RNA Biology*, 00-00. doi: 10.1080/15476286.2016.1243650
- Loza-Muller, L., Rodríguez-Corona, U., Sobol, M., Rodríguez-Zapata, L. C., Hozak, P., y Castano, E. (2015). Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active

REFERENCIAS

- promoters in Brassica oleracea. *Frontiers in Plant Science*, 6, 976. doi: 10.3389/fpls.2015.00976
- Lu, S., Chen, L., Tao, K., Sun, N., Wu, Y., Lu, X., . . . Dou, D. (2013). Intracellular and Extracellular Phosphatidylinositol 3-Phosphate Produced by Phytophthora Species Is Important for Infection. *Molecular Plant*, 6(5), 1592-1604. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst047>
- Ma, H., Song, T., Wang, T., y Wang, S. (2016). Influence of Human p53 on Plant Development. *PLoS ONE*, 11(9), e0162840. doi: 10.1371/journal.pone.0162840
- Maffucci, T. (2012). An Introduction to Phosphoinositides. In M. Falasca (Ed.), *Phosphoinositides and Disease* (Vol. 362, pp. 1-42): Springer Netherlands.
- Maffucci, T., y Falasca, M. (2001). Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide–protein co-operative mechanism. *FEBS Letters*, 506(3), 173-179. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02909-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02909-X)
- Marcel, V., Ghayad, Sandra E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.-P., Solano-González, E., . . . Diaz, J.-J. (2013). p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell*, 24(3), 318-330. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.013>
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., y Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735
- <http://www.nature.com/nrm/journal/v15/n2/abs/nrm3735.html#supplementary-information>
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., y Mostov, K. (2007). PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell*, 128(2), 383-397. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.051>
- Matsushita, K., Miyake, H., Chiba, K., y Fujisawa, M. (2016). Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis. *Andrologia*, 48(1), 11-19. doi: 10.1111/and.12404
- Meijer, H. J., Berrie, C. P., Iurisci, C., Divecha, N., Musgrave, A., y Munnik, T. (2001). Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochemical Journal*, 360(Pt 2), 491-498.
- Meijer, H. J. G., Divecha, N., van den Ende, H., Musgrave, A., y Munnik, T. (1999). Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidyl-D-inositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta*, 208(2), 294-298. doi: 10.1007/s004250050561

REFERENCIAS

- Meijer, H. J. G., y Munnik, T. (2003). Phospholipid-Based Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol*, 54(1), 265-306. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134748
- Mejillano, M., Yamamoto, M., Rozelle, A. L., Sun, H.-Q., Wang, X., y Yin, H. L. (2001). Regulation of Apoptosis by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Inhibition of Caspases, and Caspase Inactivation of Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1865-1872. doi: 10.1074/jbc.M007271200
- Mellman, D. L., Gonzales, M. L., Song, C., Barlow, C. A., Wang, P., Kendzierski, C., y Anderson, R. A. (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature*, 451(7181), 1013-1017. doi: http://www.nature.com/nature/journal/v451/n7181/suppinfo/nature06666_S1.html
- Mishkind, M., Vermeer, J. E. M., Darwish, E., y Munnik, T. (2009). Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP2 accumulation at the plasma membrane and nucleus. *The Plant Journal*, 60(1), 10-21. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03933.x
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15-19. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>
- Munnik, T. (2014). PI-PLC: Phosphoinositide-Phospholipase C in Plant Signaling. In X. Wang (Ed.), *Phospholipases in Plant Signaling* (pp. 27-54). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Munnik, T., de Vrije, T., Irvine, R. F., y Musgrave, A. (1996). Identification of Diacylglycerol Pyrophosphate as a Novel Metabolic Product of Phosphatidic Acid during G-protein Activation in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15708-15715. doi: 10.1074/jbc.271.26.15708
- Munnik, T., y Nielsen, E. (2011). Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), 489-497. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.06.007>
- Munnik, T., y Zarza, X. (2013). Analyzing Plant Signaling Phospholipids Through ³²Pi-Labeling and TLC. In T. Munnik & I. Heilmann (Eds.), *Plant Lipid Signaling Protocols* (pp. 3-15). Totowa, NJ: Humana Press.
- Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*, 42(4), 657-665. doi: 10.1023/A:1006321900483
- Nasuhoglu, C., Feng, S., Mao, J., Yamamoto, M., Yin, H. L., Earnest, S., . . . Hilgemann, D. W. (2002). Nonradioactive Analysis of Phosphatidylinositides and Other Anionic

REFERENCIAS

- Phospholipids by Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography with Suppressed Conductivity Detection. *Analytical Biochemistry*, 301(2), 243-254. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.2001.5489>
- Ndamukong, I., Jones, D. R., Lapko, H., Divecha, N., y Avramova, Z. (2010). Phosphatidylinositol 5-Phosphate Links Dehydration Stress to the Activity of *ARABIDOPSIS* TRITHORAX-LIKE Factor ATX1. *PLoS ONE*, 5(10), e13396. doi: 10.1371/journal.pone.0013396
- Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D., y Cáceres, J. F. (2003). Fibrillarin Is Essential for Early Development and Required for Accumulation of an Intron-Encoded Small Nucleolar RNA in the Mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8519-8527. doi: 10.1128/MCB.23.23.8519-8527.2003
- Nokhrina, K., Ray, H., Bock, C., y Georges, F. (2014). Metabolomic shifts in Brassica napus lines with enhanced BnPLC2 expression impact their response to low temperature stress and plant pathogens. *GM Crops & Food*, 5(2), 120-131. doi: 10.4161/gmcr.28942
- Okada, M., Ishimoto, T., Naito, Y., Hirata, H., y Yagisawa, H. (2005). Phospholipase C δ 1 associates with importin β 1 and translocates into the nucleus in a Ca²⁺-dependent manner. *FEBS Letters*, 579(22), 4949-4954. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.082
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., y Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487-498. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., y Schöfl, F. (2002). Heat Stress- and Heat Shock Transcription Factor-Dependent Expression and Activity of Ascorbate Peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2), 838-853. doi: 10.1104/pp.001362
- Pechan, P. M., y Keller, W. A. (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in Brassica napus. *Physiologia Plantarum*, 74(2), 377-384. doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00646.x
- Perwez Hussain, S., y Harris, C. C. (2006). p53 Biological Network: At the Crossroads of the Cellular-Stress Response Pathway and Molecular Carcinogenesis. *Journal of Nippon Medical School*, 73(2), 54-64. doi: 10.1272/jnms.73.54
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., y Gechev, T. S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(69). doi: 10.3389/fpls.2015.00069
- Pettitt, T. R., Dove, S. K., Lubben, A., Calaminus, S. D. J., y Wakelam, M. J. O. (2006). Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1588-1596. doi: 10.1194/jlr.D600004-JLR200

REFERENCIAS

- Pical, C., Westergren, T., Dove, S. K., Larsson, C., y Sommarin, M. (1999). Salinity and Hyperosmotic Stress Induce Rapid Increases in Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate, Diacylglycerol Pyrophosphate, and Phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 38232-38240. doi: 10.1074/jbc.274.53.38232
- Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., y Cossart, P. (2015). Phosphoinositides and host-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 911-918. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.011>
- Qu, G.-Q., Liu, X., Zhang, Y.-L., Yao, D., Ma, Q.-M., Yang, M.-Y., . . . Luo, Y.-B. (2009). Evidence for programmed cell death and activation of specific caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response. *Planta*, 229(6), 1269-1279. doi: 10.1007/s00425-009-0908-4
- Robaglia, C., Thomas, M., y Meyer, C. (2012). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 301-307. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.012>
- Rodriguez-Corona, U., Pereira-Santana, A., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., y Castano, E. (2017). Novel Ribonuclease Activity Differs between Fibrillarins from *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 8(1878). doi: 10.3389/fpls.2017.01878
- Rodríguez, V. M., Soengas, P., Alonso-Villaverde, V., Sotelo, T., Cartea, M. E., y Velasco, P. (2015). Effect of temperature stress on the early vegetative development of Brassica oleracea L. *BMC Plant Biology*, 15(1), 145. doi: 10.1186/s12870-015-0535-0
- Rosenhouse-Dantsker, A., y Logothetis, D. E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 455(1), 45-53. doi: 10.1007/s00424-007-0291-6
- Ruchalski, K., Mao, H., Li, Z., Wang, Z., Gillers, S., Wang, Y., . . . Borkan, S. C. (2006). Distinct hsp70 Domains Mediate Apoptosis-inducing Factor Release and Nuclear Accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(12), 7873-7880. doi: 10.1074/jbc.M513728200
- Ruelland, E., Kravets, V., Derevyanchuk, M., Martinec, J., Zachowski, A., y Pokotylo, I. (2015). Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*, 114(Supplement C), 129-143. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.009>
- Runkel, F., Hintze, M., Griesing, S., Michels, M., Blanck, B., Fukami, K., . . . Franz, T. (2012). Alopecia in a Viable Phospholipase C Delta 1 and Phospholipase C Delta 3 Double Mutant. *PLoS ONE*, 7(6), e39203. doi: 10.1371/journal.pone.0039203

REFERENCIAS

- Sauer, M., Paciorek, T., Benková, E., y Friml, J. (2006). Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *Nature Protocols*, 1, 98. doi: 10.1038/nprot.2006.15
- Scott, R. C., Schuldiner, O., y Neufeld, T. P. (2004). Role and Regulation of Starvation-Induced Autophagy in the *Drosophila* Fat Body. *Developmental Cell*, 7(2), 167-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.009>
- Schweichel, J. U., y Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), 253-266. doi: 10.1002/tera.1420070306
- Shen, W. H., Balajee, A. S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P. P., y Yin, Y. (2007). Essential Role for Nuclear PTEN in Maintaining Chromosomal Integrity. *Cell*, 128(1), 157-170. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.042>
- Singh, A., Bhatnagar, N., Pandey, A., y Pandey, G. K. (2015). Plant phospholipase C family: Regulation and functional role in lipid signaling. *Cell Calcium*, 58(2), 139-146. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.04.003>
- Sobol, M., Krausová, A., Yildirim, S., Kalasová, I., Fáberová, V., Vrkošlav, V., . . . Hozak, P. (2018). Nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate islets contribute to efficient RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Science*.
- Song, F., y Goodman, R. M. (2002). Molecular cloning and characterization of a rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene, OsPI-PLC1, that is activated in systemic acquired resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(1), 31-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.2002.0414>
- Song, M. F., y Han, Y. Z. (2008). Molecular cloning and characterization of a phosphoinositide-specific phospholipase C from *Torenia fournieri*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(3), 385-389. doi: 10.1134/s1021443708030151
- Steffens, B., y Sauter, M. (2009). Epidermal Cell Death in Rice Is Confined to Cells with a Distinct Molecular Identity and Is Mediated by Ethylene and H₂O₂ through an Autoamplified Signal Pathway. *The Plant Cell*, 21(1), 184-196. doi: 10.1105/tpc.108.061887
- Taj, G., Kumar, A., Bansal, K. C., y Garg, G. K. (2004). Introgression of osmotin gene for creation of resistance against *Alternaria* blight by perturbation of cell cycle machinery. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(2), 291-298.
- Tanio, M., y Nishimura, K. (2012). Analysis of the phospholipase C- δ 1 pleckstrin homology domain using native polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 431(2), 106-114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.09.012>
- Tanio, M., y Nishimura, K. (2013). Intramolecular allosteric interaction in the phospholipase C- δ 1 pleckstrin homology domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(6), 1034-1043. doi:

REFERENCIAS

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.034>

- Telmer, C. A., Newcomb, W., y Simmonds, D. H. (1995). Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma*, 185(1), 106-112. doi: 10.1007/BF01272758
- Tewari, R. K., Bachmann, G., y Hadacek, F. (2015). Iron in complex with the alleged phytosiderophore 8-hydroxyquinoline induces functional iron deficiency and non-autolytic programmed cell death in rapeseed plants. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 151-160. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.07.016>
- Tewari, R. K., Hadacek, F., Sassmann, S., y Lang, I. (2013). Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 91(0), 74-83. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.006>
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., y Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72(3), 443-457. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90120-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90120-F)
- Tomás, D., Brazão, J., Viegas, W., y Silva, M. (2013). Differential Effects of High-Temperature Stress on Nuclear Topology and Transcription of Repetitive Noncoding and Coding Rye Sequences. *Cytogenetic and Genome Research*, 139(2), 119-127. doi: 10.1159/000343754
- Tuzi, S., Uekama, N., Okada, M., Yamaguchi, S., Saitô, H., y Yagisawa, H. (2003). Structure and Dynamics of the Phospholipase C- δ 1 Pleckstrin Homology Domain Located at the Lipid Bilayer Surface. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28019-28025. doi: 10.1074/jbc.M300101200
- Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T., y Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 163(3), 515-523. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00159-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00159-0)
- Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., y De Gara, L. (2004). Production of Reactive Oxygen Species, Alteration of Cytosolic Ascorbate Peroxidase, and Impairment of Mitochondrial Metabolism Are Early Events in Heat Shock-Induced Programmed Cell Death in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *Plant Physiology*, 134(3), 1100-1112. doi: 10.1104/pp.103.035956
- Vacca, R. A., Valenti, D., Bobba, A., de Pinto, M. C., Merafina, R. S., De Gara, L., . . . Marra, E. (2007). Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco Bright-Yellow 2 cells. *FEBS Letters*, 581(5), 917-922. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.071>

REFERENCIAS

- van Doorn, W. G. (2011). Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4749-4761. doi: 10.1093/jxb/err196
- van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., . . . Bozhkov, P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ*, 18(8), 1241-1246.
- Van Hautegeem, T., Waters, A. J., Goodrich, J., y Nowack, M. K. (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science*, 20(2), 102-113. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.003>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., y Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(10), 700-714. doi: http://www.nature.com/nrm/journal/v11/n10/suppinfo/nrm2970_S1.html
- Várnai, P., y Balla, T. (2006). Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 957-967. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.03.019>
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., . . . Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 187(9), 1477-1485.
- Verma, V., Ravindran, P., y Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16, 86. doi: 10.1186/s12870-016-0771-y
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 42(1), 579-620.
- Vossen, J. H., Abd-El-Halim, A., Fradin, E. F., Berg, G. C. M. V. D., Ekengren, S. K., Meijer, H. J. G., . . . Joosten, M. H. A. J. (2010). Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. *The Plant Journal*, 62(2), 224-239. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04136.x
- Wan, L., Xia, Q., Qiu, X., y Selvaraj, G. (2002). Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. *The Plant Journal*, 30(1), 1-10. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01262.x
- Wang, P., Zhao, L., Hou, H., Zhang, H., Huang, Y., Wang, Y., . . . Li, L. (2015). Epigenetic Changes Are Associated with Programmed Cell Death Induced by Heat Stress in Seedling Leaves of *Zea mays*. *Plant and Cell Physiology*. doi: 10.1093/pcp/pcv023
- Wang, W., Vinocur, B., y Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and

REFERENCIAS

- extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14. doi: 10.1007/s00425-003-1105-5
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., y Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-252. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang, Y.-H., Hariharan, A., Bastianello, G., Toyama, Y., Shivashankar, G. V., Foiani, M., y Sheetz, M. P. (2017). DNA damage causes rapid accumulation of phosphoinositides for ATR signaling. *Nature Communications*, 8(1), 2118. doi: 10.1038/s41467-017-01805-9
- Watanabe, M., Setoguchi, D., Uehara, K., Ohtsuka, W., y Watanabe, Y. (2002a). Apoptosis-like cell death of Brassica napus leaf protoplasts. *New Phytologist*, 156(3), 417-426. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00536.x
- Watanabe, M., Setoguchi, D., Uehara, K., Ohtsuka, W., y Watanabe, Y. (2002b). Apoptosis-like cell death of Brassica napus leaf protoplasts. *New Phytologist*, 156(3), 417-426. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00536.x
- Waugh, M. G. (2015). PIPs in neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(8), 1066-1082. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.002>
- Wen, P. J., Osborne, S. L., y Meunier, F. A. (2011). Dynamic control of neuroexocytosis by phosphoinositides in health and disease. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 52-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.08.001>
- Xia, K., Wang, B., Zhang, J., Li, Y., Yang, H., y Ren, D. (2017). Arabidopsis phosphoinositide-specific phospholipase C 4 negatively regulates seedling salt tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 40(8), 1317-1331. doi: 10.1111/pce.12918
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., . . . Shirasu, K. (2011). Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(35), 14682-14687. doi: 10.1073/pnas.1106002108
- Yagisawa, H., Hirata, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Ozaki, S., Sakuma, K., . . . Hirata, H. (1994). Expression and characterization of an inositol 1,4,5-trisphosphate binding domain of phosphatidylinositol-specific phospholipase C-delta 1. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 20179-20188.
- Yagisawa, H., Sakuma, K., Paterson, H. F., Cheung, R., Allen, V., Hirata, H., . . . Katan, M. (1998). Replacements of Single Basic Amino Acids in the Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C- δ 1 Alter the Ligand Binding, Phospholipase Activity, and Interaction with the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 417-424. doi: 10.1074/jbc.273.1.417

REFERENCIAS

- Yan, J., Wen, W., Xu, W., Long, J.-f., Adams, M. E., Froehner, S. C., y Zhang, M. (2005). Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of α -synthrophin. *The EMBO Journal*, 24(23), 3985-3995. doi: 10.1038/sj.emboj.7600858
- Yildirim, S., Castano, E., Sobol, M., Philimonenko, V. V., Dzajak, R., Venit, T., y Hozák, P. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *Journal of Cell Science*, 126(12), 2730-2739. doi: 10.1242/jcs.123661
- Yokawa, K., y Baluška, F. (2016). The TOR Complex: An Emergency Switch for Root Behavior. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), 14-18. doi: 10.1093/pcp/pcv191
- Young, L., W Wilen, R., y C Bonham-Smith, P. (2004). *High temperature stress of Brassica napus during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production* (Vol. 55).
- Yuan, X., Kuramitsu, Y., Furumoto, H., Zhang, X., Hayashi, E., Fujimoto, M., y Nakamura, K. (2007). Nuclear protein profiling of Jurkat cells during heat stress-induced apoptosis by 2-DE and MS/MS. *ELECTROPHORESIS*, 28(12), 2018-2026. doi: 10.1002/elps.200600821
- Zhai, S., Gao, Q., Liu, X., Sui, Z., y Zhang, J. (2013). Overexpression of a Zea mays phospholipase C1 gene enhances drought tolerance in tobacco in part by maintaining stability in the membrane lipid composition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115(2), 253-262. doi: 10.1007/s11240-013-0358-3
- Zhang, Y., Li, S., Zhou, L.-Z., Fox, E., Pao, J., Sun, W., . . . McCormick, S. (2011). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* PTEN caused accumulation of autophagic bodies in pollen tubes by disrupting phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics. *The Plant Journal*, 68(6), 1081-1092. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04761.x
- Zonia, L., y Munnik, T. (2006). Cracking the Green Paradigm: Functional Coding of Phosphoinositide Signals in Plant Stress Responses. In A. L. Majumder & B. B. Biswas (Eds.), *Biology of Inositols and Phosphoinositides: Subcellular Biochemistry* (pp. 207-237). Boston, MA: Springer US.
- Żurek-Biesiada, D., Kędracka-Krok, S., y Dobrucki, J. W. (2013). UV-activated conversion of Hoechst 33258, DAPI, and Vybrant DyeCycle fluorescent dyes into blue-excited, green-emitting protonated forms. *Cytometry Part A*, 83A(5), 441-451. doi: 10.1002/cyto.a.22260
- Ocri-genomics.org. (2016). Bolbase - B.oleracea genomics database. [online] disponible ent: <http://www.ocri-genomics.org/bolbase/> (recuperado el 31 Oct. de 2016).

ANEXOS

ANEXOS

En esta sección se incluyen dos artículos de revisión. El primero de ellos está enfocado a el uso del género *Brassica* como un modelo para el estudio del estrés y de la muerte celular regulada en plantas. La segunda es una revisión del papel de los PIPs en la respuesta a estrés en plantas.

A.1 *Brassica* as a model to study stress and cell death

JA Morales¹, W.A. LC Rodriguez-Zapata², J Ramón-Ugalde³ and Castano E¹.

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Mexico, ²Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Mexico, ³ Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO). Instituto Tecnológico de Conkal (ITC)

Keywords: brassica, stress, cell death, apoptosis, stress tolerance

Revisión publicada en la revista: Journal of Molecular Genetics con el DOI: 10.31038/JMG.1000103.

Abstract

Many plants of Brassicaceae family are some of most important crops worldwide, including *Brassica oleracea*, *B. napus* and *B. juncea*. Currently the genome has been sequenced and freely accessible. This is one of the advantages in that, molecular markers specific for this species can be generated. The easy cultivation and accessibility world wide as well as the size and life cycle make this species a good models to study stress and cell death. Several studies of tolerance and response to different types of stress and cell death have been carried out in many species of the genus.

As a sessile organism, many plants have resolved to improve on strategies focused on detecting and resisting many types of stress. Understanding of these strategies and how to add them to sensitive plants have become a necessity in a world with more disadvantage conditions like: extreme temperatures, nutrients starvation, plagues and diseases. The capability of manipulate, enhance, in some cases retard or abolish these processes could help to improves cultivar production.

ANEXOS

Introduction

As a sessile organism plants take advantage of different strategies that are focused on detecting and resisting many types of stress. Understanding of these strategies have become necessary due to increasingly disadvantage conditions: extreme temperatures, nutrients starvation, plagues and diseases. The capability of manipulate, enhance, overtake or in some cases, retard or abolish these processes could help to improves cultivar production.

Cell death is a consequence of either cell stress or involved in the lifecycle of the organism, and there is a close relationship of these two events. Moreover, the possibility of manipulating cell death in crops can be a way in which tolerance to crop stress can be improved or even accelerate or delay their maturation.

Brassicaceae family members are some of most important crops worldwide and have become a good model for study of different aspects of plant biology specially stress and cell death. Thanks to new powerful techniques such as proteomics and metabolomics, and a major number of complete genomes publication, it is possible to deepen in particular molecules related with stress and cell death or view a wide perspective of complex events.

Stress and cell death (RCD)

All organisms, including plants, are constantly suffering from changing environmental conditions and pathogen attacks which alters cellular homeostasis, causing damage in membranes and proteins structures, in first instance plants sense stress and producing and activating signal transduction pathways, this activates different mechanism under transcription control and try to repair damages (Wang et al., 2003). Due to its condition as sessile organisms, plants develops multiple strategies to sense and contend against multiple stresses at the same time (Fujita et al., 2006, Atkinson and Urwin, 2012). They synthesize various molecules as proteins, amino acids (aa), fatty acids and phospholipids to initiate an adaptive process for maintain homeostasis (Wang et al., 2003, Petrov et al., 2015, Mittler, 2002).

ANEXOS

Now is clear that plant stress response is an interconnected network, which facilitates to produce an efficient and fast defense against environmental and biotic menaces mediated by plant hormones and reactive oxygen species (ROS) (Baxter et al., 2014, Petrov et al., 2015, Verma et al., 2016)

Stress triggers a higher production of ROS which acts as a signal for the activation of stress response pathways, but when these defense mechanisms are not enough, the stress can result in cell death. Two mutually exclusive models are proposed to explain cell death triggers by stress. The conversion model propose the cessation of inhibitory signals of death after an homeostasis perturbation in a point in time and then it start to occurs promoting signals, being the time more brief according to perturbation intensity. The competition model postulates that inhibitory and promoting signals coexist at the same time and the predomination of one of them depends of time and intensity of the perturbation and the successful of the adaptive response (Galluzzi et al., 2015).

Cell death (CD) is part of the normal development and maturation cycles in living beings and part of many response patterns of tissues to external agents (Kanduc et al., 2002). CD is necessary for plants and animals to develop correctly, for example; during metamorphosis of amphibians and insects, the morphogenesis of organs, and cell turnover required CD of certain cells in order for development to take place. Also abnormal function of CD, as in an occurrence of multiple diseases, including developmental disorders in plants and animals, as well as degenerative diseases and cancer in humans.

CD can be classified as accidental cell death (ACD) and regulated cell death (RCD). RCD can be a programmed cell death (PCD) when it is part of the development cycle of an organism (see figure A.1). The ACD is a passive process that occurs when the intensity of a physical, chemical or mechanical stimulus is so great that cellular integrity deteriorates uncontrollably.

ANEXOS

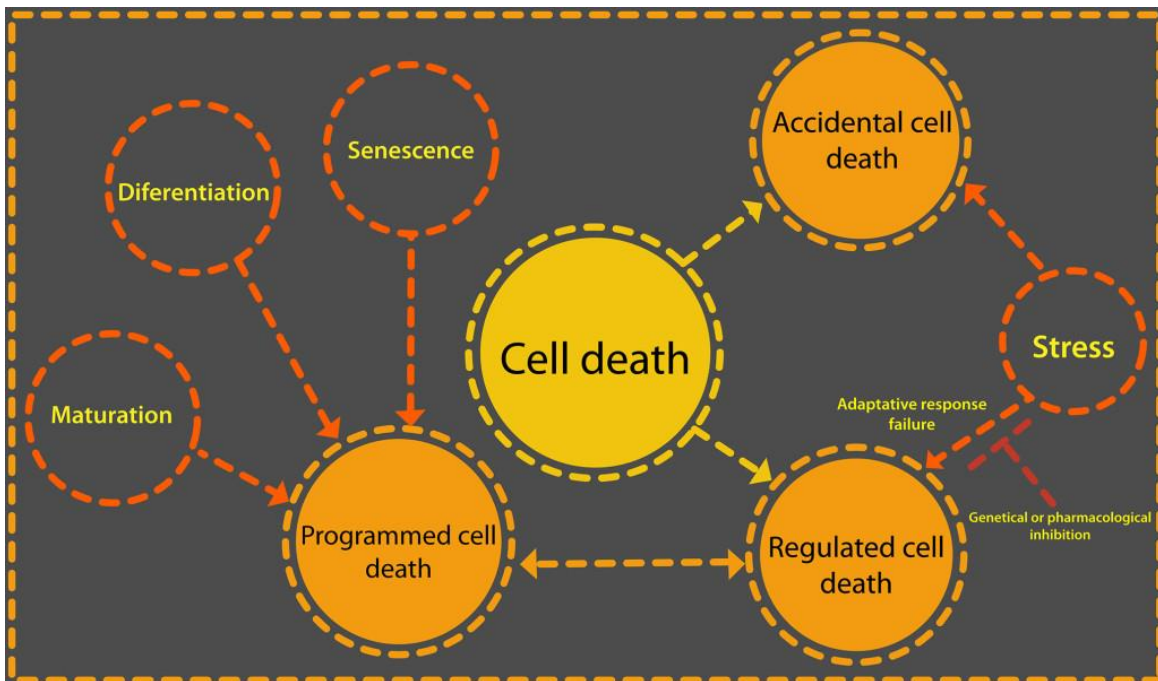


Figure A.1. Cell death can be due to a failure of the adaptive response to a stimulus or be part of the normal development of an organism. There are two categories of cell death: accidental and regulated. What triggers one or the other is the intensity of an external stimulus or develop. When regulated cell death is part of the normal life cycle of a cell or tissue then it is a programmed cell death. Only regulated cell death could be delayed or stopped through iRNA or protein inhibitors such as Z-VAD-FMK, a caspase inhibitor.

RCD is an active process by which specific cells can pose a threat to a complete organism are eliminated. For this reason in the RCD, the molecular signaling pathways that govern the different forms of it are ordered and are strictly controlled (Ashkenazi and Salvesen, 2014).

RCD is caused by external stimuli, that's means stress, but with a lower intensity. In the first instance, the adaptive response of the organism tries to restore homeostasis, but when this cannot be achieved, a specific genetic machinery is activated that directs this type of cell death, as long as the external stimulus is not excessive. RCD can be influenced by specific pharmacological or genetic means (Kroemer et al., 2009). By making use of specific inhibitors, such as iRNA, caspase inhibitors like Z-VAD-fmk or cyclosporin A and sanglifehrin A, for each particular manifestation of MCR, the events that

ANEXOS

control the death of the cells can be stopped or delayed.

Cell death can be part of a cell development program and it is then that we talk about PCD (Galluzzi et al., 2015). This term refers to the physiological cases of cell death that occur as part of the embryogenic or post embryogenic development in the formation of tissues and organs. Some of these organs and tissues are embryonic suspensors, xylem tracheary elements, root and lateral roots (Van Hautegeem et al., 2015). PCD also occurs to maintain the homeostasis of a tissue, referring in this case to the balance between death and cell proliferation (Galluzzi et al., 2012, Van Hautegeem et al., 2015).

Tools to the study of stress and cell death in brassica species

Currently there are many techniques to study a great variety of biological phenomena, including cell death and stress. These techniques let us learn about a single gene or molecule, including protein, lipids, amino acids, among others or see a wide net of molecules interacting at the same time.

New bioinformatics software allows us to take advantage of the information from genes related with stress and cell death, such as BLAST and MEGA, which contains MUSCLE and CLUSTAL or RAxML to perform evolutionary studies between brassica species. Use proteomics, transcriptomic or metabolomics approaches to make new models or refine those that already exist using bioinformatics tools such as Cutadapt, Trinity and N50 to perform transcriptomic, AMIX, SIMCA, METABOANALIZER for metabolomics and MASCOT, SEQUEST for proteomic analysis.

Many databases are currently available with invaluable information of the main brassica species: *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus* and *B. juncea* (table 1). In these data bases is possible to find molecular markers, genomes, expression sequence tags (EST), metabolic pathways and sequence specific searching tools as well as information about specific genes and the kind of evidence supplied (while bioinformatics level to protein level).

This information gives us an excellent point of departure to start the study of specific molecules to look for interactors, novel functions, confirm the homology with others, discover specific mechanisms of each specie, define molecular markers of resistance that

ANEXOS

help breeders to select the best plants or possible targets of genetic enhancement.

Stress in brassica species

Abiotic stress and attacks pests and pathogens represents big challenge for agriculture, because plants spend a large part of their resources coping with these threats, decreasing their performance in the field. Current estimates indicate that arable land will be reduce by >50% for most major crop plants and current climate prediction models indicate that average surface temperatures will rise by 3–5 C in the next 50–100 years (Atkinson and Urwin, 2012).

Although arabidopsis is the model plant par excellence due to the large amount of mutants and wealth of genetic data available. However, many species of brassica have been used to study stress and CD process, especially in the study of heat stress, because of its sensitivity to heat *e.g.*, temperature is one of the most important parameters for the development of the florets in *B.oleracea*.

In some cases, heat stress benefits plant culture. In *B napus* microspore *in vitro* embryogenesis is produced by the application of a treatment of 32°C for eight hours (Pechan and Keller, 1988, Telmer et al., 1995) or an additional treatment of two hours to 41°C in late bicellular pollen to increase yield(Binarova et al., 1997). Coupled with this, HSP70 over expression and its nuclear translocation during heat treatment s suggest which this protein is necessary for embryogenesis induction (Cordewener et al., 1995).

In most cases, heat stress reduce crops yield, causing morphological changes such as abnormal leave shapes due to changes in cell microtubules and microfilaments; injuring or killing plants. In *B napus* heat stress, reduce flower fertility. Under a treatment of four hours at 35 °C for one and two weeks after flowering ten days), experiments shows a similar number of flowers in control and the two stress periods (six thousand). However, the number of fruits shows a drastical reduction (50%) in one week of stress compared with control, following by a recovery. This recovery let to obtain similar number of fruit in both control and plants with one week of treatment (3.000 silique) and plants under two weeks of heat stress didn't show recovery. The number of seed and fresh weight, in both stress conditions shows a reduction in 66% and 75% respectively with a light recovery

ANEXOS

after treatments in a 50% compared with control. At the same time germination was reduced in stressed plants (germination rates of 17.5%) in contrast with control plants (germination rates of 59.2%) (Young et al., 2004).

Other study shows that *B. rapa* and *B. juncea* are sensible too to heat stress, affecting the reproductive development and yield, showing which the first of them are the most sensitive (Angadi et al., 2000). Under a treatment of 35 °C, *B. rapa* and *B. juncea*, reproductive organs was injured, mainly resulted in the reduction of seeds in 80 and 40% respectively in early flowers.

Inflorescences of *B. oleracea* var. *italica* (broccoli), presents reduction in flowering after a treatment of heat to 35 °C. Buds reduced its size in 50 to 75% in treated plants and the damage caused to buds is bigger in young inflorescences (straight stage) than mature (crown stage) (Young et al., 2004).

Kale variety of *B. oleracea* seedlings under heat stress (32 °C) shows abnormal leave shape, presenting elongation of them and a reduction of fresh weight of a 30% percent, at the same time stomal conductance increase and its size was reduced due its heat stress susceptibility (Rodríguez et al., 2015).

Due to global warming, high temperatures are expected to become a limiting factor for production, so research on tolerance to heat stress will be of great importance (Uchida et al., 2002, Wang et al., 2015). Plants have a higher number of transcription factors related to tolerance to heat stress, than those found in animal cells; this is probably due to the plants, unlike them; they are not able to move to another place to mitigate the high temperatures (Panchuk et al., 2002).

A way to know if stress response proteins are also produced in brassicas was shown by Fabijanski and colaborators. Comparing the differential expression of proteins in plants without and with stress using sulfur 35 (³⁵S) and later comparing the differential proteins found with 1D and 2D gel electrophoresis, with those already known in other models such as tobacco. The tipical proteins synthetized by plants in heat and other abiotic stresses are heat shock proteins (hsp) , maintaining proteins correct conformations and prevent the aggregation of non-native proteins (Wang et al., 2004). Fourteen of this are found in

ANEXOS

broccoli leaves. After a treatment of 37 °C, in the first two hours a presence of a differential protein expression compared with plants treated with 20 °C, mainly 90 KDa, 88 KDa, 86 KDa, 74 KDa, 69 KDa, 66 KDa, 47 KDa, 43 KDa, 42 KDa, 27 KDa, 23 KDa, 21 KDa, 19 KDa and 18 KDa. Molecular mass proteins. After two hours, there seems to be a reduction in their synthesis, however this is maintained two hours after (Fabijanski et al., 1987).

A similar way to give identity to a protein is to use antibodies that recognize homologous proteins already characterized to confirm, through the specific interaction of the antibody with the protein and the expression during the condition to be evaluated, in this case, stress, identity and participation of the protein in the condition. A study realized by Avice group answer the question if the 19-kD trypsin inhibitor (TI) protein is related with the Water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) BnD22 from *B. napus* previously detected in leaves.

Using young leaves during leaf nitrogen (N) starvation methyl jasmonate (MeJA) treatments and proteomic technique, this work confirmed the relation between both proteins. Partial sequences from two differential spots in stress and normal conditions, identified by Electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry (ESI-LC MS/MS) were identical to peptides previously identified by the same method and a search in databases revealed that both also presented 100% homology to BnD22. Prior this, immunoblot analysis and image analysis software shows that BnD22 and 19-kD (TI) are two isoforms of the same protein, and BnD22 is induced 12-fold by MeJA (Desclos et al., 2008).

Proteomic approaches is also useful to find out novel proteins that plants are expressed under stress. Following the same strategy, using two contrasting conditions, but now with two broccoli cultivars, one heat-tolerant TSS-AVRDC-2 and one heat-susceptible B-75, under heat stress and waterlogging. Plants were divided into four 20 °C without waterlogging (as control) 20 °C with waterlogging; 40 °C without waterlogging, and 40 °C with waterlogging. With this method, was identified 15 and 16 pivotal proteins in stress tolerance from TSS-AVRDC-2 and B-75 respectively, giving the work a deeper biological context also using physiological parameters such as chlorophyll content and stomal conductance in which the resistant cultivar was better (Lin et al., 2015). By combining all the data, it can be explained that this resistance is due to a better metabolic behavior, in

ANEXOS

which the ROS levels produced are controlled more efficiently

Other species, such as *B. juncea*, *B. napus*, *B. carinata* and *B. campestris*, accustomed to tropical climates, have been studied to better understand the tolerance to stress by drought. Using six parameters including water content, epicuticular wax, chlorophyll content, leaf water potential, osmotic potential and content of protein, authors comparing the stress tolerance of both species. *B. napus* was the one that best supports these conditions and *B. carinata* was the most sensitive. Although, all the four species decreases in most of parameters, *B. napus* presents a better production of biomass respect to the others. This behavior also occurs with respect to the chlorophyll content. For all species, except *B. campestris*, chlorophyll in control condition was 3 fold higher than in stress treatments, for *B. campestris* clori (Ashraf and Mehmood, 1990).

B. napus was used again to evaluate the synthesis of aa as a mechanism of drought stress tolerance. Since the increased of solutes to decreased osmotic potential and diminish water loss. This specie was exposed to dehydration to measure changes in the concentration of aa, with an overall increase of 5-9 folds during the four days of treatment. It was later observed that aa levels decreased almost to the initial levels prior to stress. Likewise, through to the use of radioactively labeled methionine with sulfur 35 (^{35}S) an increase in protein synthesis was observed on the second day of treatment, to later return to the first day levels. Finally, it was determined that the increase in the amount of aa was due to the synthesis of alanine, aspartate and asparagine precursors, pyruvate and glutamate and not to the enzymatic activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, two enzymes involved in aa synthesis (Good and Zaplachinski, 1994).

Phosphoinositide pathway during stress response in *Brassica*

B. napus served as a model to study the signaling pathways activated in response to drought, salt and cold stress. A work mainly focused in phosphoinositide signaling pathway controlled by the enzyme phospholipase C (PLC) which hydrolyzes phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP_2) to generate diacylglycerol (DAG) and inositol 1,3,5-trisphosphate (IP_3) two second messengers in the cell (Runkel et al., 2012) found the relationship between PLC and the tolerance to abiotic stress as well as the particular differences in

ANEXOS

each stress.

By cloning of the genes PLC-2, phosphatidylinositol 3-Kinase (VPS34) and a phosphatidylinositol synthase (PtdInsS1), as well as relative expression of a phosphatidylinositol 4-kinase (PtdIns 4-K) and phosphatidylinositol -4-phosphate 5-kinase (PtdIns4P-5-K) shows which in cold stress the expression of PLC-2 increased, PtdInsS1 decreased and while the levels of the other genes remains without changes. Under salt stress expression of VPS34 increases, suggesting an important role for other phosphoinositide, phosphatidylinositol 3 phosphate PI(3)P in the tolerance of this stress, activating an alternative pathway different from the PLC-2, however a slight increase of PLC-2 could be observed. In the same work, plant growth in drought stress exhibit a major number of transcripts of all evaluated genes (Das et al., 2005).

B.napus was used to evaluate the changes at the metabolic level produced by the overexpression of plc. Since PLC produces an increase in tolerance to abiotic stress, researchers runs a profile of various metabolites in cold stress. 12 metabolites presents significant changes, 9 increased, many of them aa, highlighting β -alanine (1.5 folds); there was also an increase in spermidine (2.5 fold) and a lipid, linoleate (1.66 fold). A very important change in sucrose levels, in which there was an almost 5-fold increase during stress. In plants that over expressed the enzyme could be seen a better recovery after stress. Also, since it is known that biotic and abiotic stress share some signaling pathways (Atkinson and Urwin, 2012), using the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* to test biotic tolerance, authors reports minor severity of symptoms in plants with enhanced expression of PLC-2, however this tolerance appears to be partial(Nokhrina et al., 2014).

Cell death in *Brassica* species

RCD is divided morphologically into apoptosis, autophagic cell death and necrosis. Apoptosis for many years was considered synonymous with the RCD. During apoptosis occurs fragmentation of the nucleus and formation of apoptotic bodies, phagocytosis and degradation of these bodies by other cells (Kerr et al., 1972).

Autophagic cell death is a mechanism conserved in eukaryotes by which organisms degrade and recycle cellular components(Duprez et al., 2009). The organelles are

ANEXOS

sequestered by double membrane vacuoles called autophagosomes and then degraded by various hydrolases (Galluzzi et al., 2007).

Necrosis was considered for many years, synonymous with accidental cell death, since it was believed that there was no way to regulate it (Kanduc et al., 2002). The necrosis is defined in negative terms, that is, all that death whose morphology does not correspond to autophagy or apoptosis is considered necrosis. However, there is generally a gain in cell volume (oncosis), swelling of the organelles, rupture of the plasma membrane and the consequent loss of intracellular content (Golstein and Kroemer, 2007, Berghe et al., 2014).

Cell death in plants is a phenomenon little studied if compared with animals, where, because of the importance of cell death in various types of cancer have been established more appropriate criteria for the classification and study of CD.

An attempt to establish a morphological classification proposes two categories: autolytic and non-autolytic cell death. The main difference between the two deaths is that in the autolytic death a rapid clearance of the tonoplast occurs, due to the degradation of cellular components through various hydrolases. Hydrolases are released into a large vacuole that occupies most of the volume of the cytoplasm and which is formed by vacuoles of smaller size (very similar to the autophagic cell death), until finally the tonoplast is broken. In non-autolytic type death, the clearance occurs after the tonoplast rupture (van Doorn et al., 2011, van Doorn, 2011).

Brassica species it is a model widely used to study cell death processes. In several species of the genre, RCD studies were carried out induced by various abiotic stresses such as cold, mechanical or heavy metal stress.

B. oleracea was used to study regulated cell death. The expression of genes related to apoptotic cell death induced by post-harvest management (refrigeration) has been identified, for example, of proteins like serine palmitoyltransferases (BoSPT1) and proteins with caspase 3 activity (Cas3) (Coupe et al., 2003, Coupe et al., 2004).

In *B. napus* similar nuclear fragmentation due to MCR was associated with recalcitrance to the regeneration of whole plants in protoplast cultures of *B. napus* leaves. The MCR

ANEXOS

induction was attributed to the stress caused by the protoplast isolation process (Watanabe et al., 2002b).

The lack of iron in protoplast cultures of *B. napus* induced non-autolytic death. The lack of iron caused the generation of reactive oxygen species (ROS) and the activation of a protein with cas3 activity. Also condensation of chromatin and fragmentation of the nucleus was observed (Tewari et al., 2013, Tewari et al., 2015).

Other cysteine-proteases (CysP) was related with similar observation in *B. napus* during PCD in seed development (Wan et al., 2002). Northern blot analysis of temporal of the CysP, BnCysP1 in *B. napus*, shows the expression of said gene from the tenth to the sixteenth day after flowering and confirmed later by western blot. Not only that, but, the synthesis of BnCysP1 occurs in the inner tegument during PCD confirmed by the observation of DNA degradation with a TUNEL assay (1992).

In *B. oleracea* was also found that a CysP, BoCP5 was responsible for florets senescence (Eason et al., 2005). In this work authors compared broccoli lines, wild type (wt) and transgenics, transformed with antisense construct for BoCP5 under the control of a senescence-induced promoter. During harvest-induced senescence in broccoli floret BoCP5 is induced and synthesized 6 h after harvest. In wt line in which mRNA, protein and protease activity was detected in higher levels. Finally, three transgenic lines shows less florets senescence (more greener) than wt within 72 and 96 h after harvest.

Is very interesting to note that especially *B. oleracea* and *B. napus* are excellent models to explore the molecular and biochemical similarities between the RCD in plants and animals. In addition they are also suitable models to perform with them different microscopy techniques to characterize biochemistry, molecular and morphologically the RCD in plants. For example, it is clear that different stresses cause morphological changes in the nucleus when the CD is produced. However, it must be studied if these changes are similar in terms of signaling pathways that activate to cause these changes.

In of *B. oleracea* florets for example, whose nucleuses have a larger size because they are very active, several confocal microscopy studies have been carried out (Loza-Muller et al., 2015). A simple analysis using different stress inducers shows how the nucleus

ANEXOS

changes its shape differentially in each treatment (figure a.2). This may mean that it activates different mechanisms or moon greater or less sensitivity to each stress.

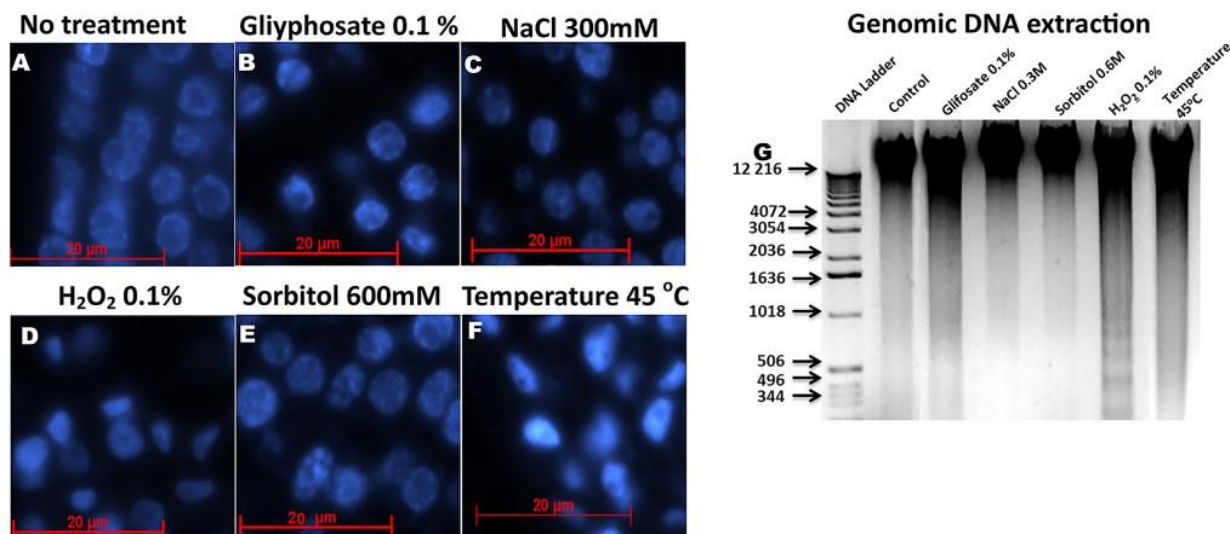


Figure A.2. Histological slices of *Brassica oleracea* inflorescences stained with DAPI observed with a fluorescence microscope. A): Control, without stress treatment. B): Nuclei of *B. oleracea* treated with 0.1% glyphosate. C): Nuclei of *B. oleracea* treated with 300 mM NaCl. D): Nuclei of *B. oleracea* treated with 0.1% H₂O₂. E): Nuclei of *B. oleracea* treated with 600 mM of sorbitol. F): Nuclei of *B. oleracea* treated at 45 oC. all treatments was applied for six hours, except for H₂O₂ for 26 hours. G): DNA extraction of in fluoresces after stress. Each lane contains 1 mg of DNA. Nuclear morphology of stressed samples differs from control, especially in C-F. In sorbitol treatments observed a clearly nuclear fragmentation, less in NaCl stress, whereas in D and F a major condensation is observed.

p53 protein in Brassica species

Protein p53 acts like a link between cell proliferation, stress and cell death. Is a transcription factor induced in many stress signals response such as oxidative stress, cold and heat stress, nutrition deprivation, apoptosis, phagocytosis, apoptosis and cell cycle arrest (Perwez Hussain and Harris, 2006, Levine and Oren, 2009, Brady and Attardi, 2010) . also is named as genome guardian due its implication in DNA repair caused e.g. uv radiation and genotoxic drugs such as Danthron, Lansoprazole and Phenolphthalein (Brambilla et al., 2010), in human cells, mutation in p53 gene results in many types of

ANEXOS

cancer (Brady and Attardi, 2010, Marcel et al., 2013, Joerger and Fersht, 2016).

One way of p53 to inhibit tumor formation is by the negative regulation of fibrillarin (fib), a nucleolar protein with methyltransferase activity, which processes ribosomal RNA (rRNA) maturation and assemble of ribosomes (Cerdido and Medina, 1995, Newton et al., 2003, Amin et al., 2007, Loza-Muller et al., 2015, Rodriguez-Corona et al., 2017) , and has been related with virus movement and systemic infection in plants (Canetta et al., 2008, Li et al., 2017). Partial silencing of p53 in immortalized human mammary epithelial cells (HME) produces overexpression of Fib, leading to translation fidelity diminution, showing by the bypass of added stop codon addition in rRNA and amino acid misincorporation enhance and changing rRNA methylation pattern (Marcel et al., 2013). In *Brassica oleracea* fibrillarin alters its localization during heat stress as seen in Figure A.3.

ANEXOS

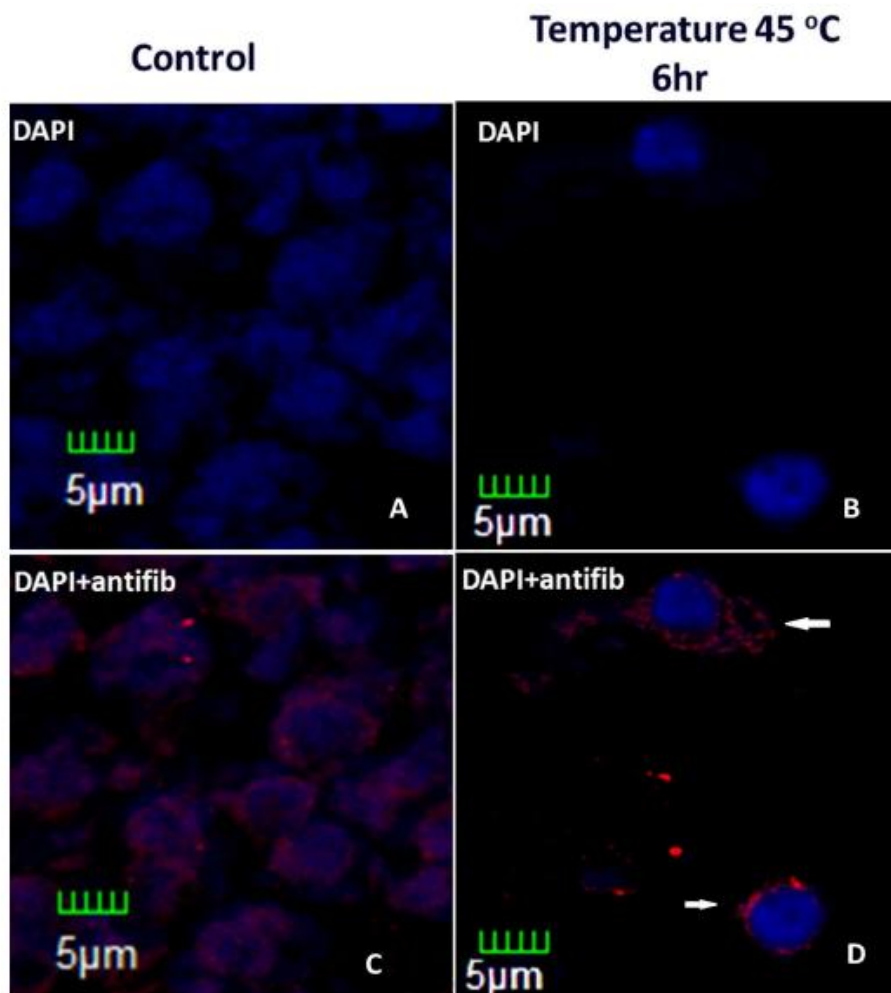


Figure A.3. Histological slices of *Brassica oleracea* inflorescences under heat stress. Control (Expression of human p53 in *Arabidopsis thaliana* induce early senescence and exhibited fasciated phenotype (fused or distorted organs along a plant stem) including thick stems causing by elevated homologous DNA recombination, also shows more secondary inflorescences (twice compared with wt plants) and clustered siliques. NPR1-1 INDUCIBLE 1 (SNI1) a p53 inhibitor in plants, not present in human cells, expressed in in human osteosarcoma U2OS cancer cells, reduce homologous recombination in DNA damage cells by UV radiation and hydroxyurea treatments to induce DNA repair (Ma et al., 2016).

In brassica, p53 has been detected during *Alternaria* pathotoxin- and nutritional depletion

ANEXOS

treatments using human p53 antibodies (Khandelwal et al., 2002). In proliferating callus, the amount of p53 is less than decaying callus (induced by nutrient starvation) and pathotoxin treated callus in 2.2 fold and 1.88 fold respectively. Similar results shows p53 in leaves. Senescent and Pathotoxin-treated presents twice the concentration observed in healthy leaves.

Transformed *B. juncea* calli with osmotin gene, a pathogenesis related protein, presents tolerance against *Alternaria* toxin compared with wt calli. This tolerance correlates with lower levels of p53 protein. With 0.5 and 1.0 units of toxin treatment, non-transformed calli levels of p⁵³ increase 1.85 and 3.3-fold compared with control conditions (no toxin) whilst the levels increase 1.41 and 1.89-fold in transformed calli. This observation seems to be result of a delay in PCD triggers by hypersensitive response (HR)(Taj et al., 2004) .

P53 is very interesting, although there are only these two examples, very similar to the possible role of p53 in stress and cell death, although in other organisms the link between different metabolic and signaling pathways. In this way, p53 covers almost all the phenomena present in plants, from the metabolic state, to RCD.

Many interaction partners needs to be confirmed in most pathways, including apoptosis, p53 signaling pathway and senesce. This is confirmed by the fact that in databases such as KEGG there are no those that are specific to plant species, and the evidence of the presence of homologous proteins generally reaches a purely bioinformatic level.

Conclusion

Brassica species have served as an important source of knowledge regarding stress and cell death, even finding in them, the first evidences of the role of certain molecules, e.g. p53 in these events.

All these discoveries have been carried out using "classic" and "modern" techniques, which has provided a broad background that serves as a firm basis for new discoveries in these fields of research. Much remains to be contributed to them, since most of the efforts in these issues are aimed at human health and for this reason represent a great opportunity for future research.

ANEXOS

Abbreviations

aa:	amino acids
ACD:	Accidental cell death
CD:	Cell death
CysP:	cysteine protease
Fib:	fibrillarlin
MeJa:	methyl jasmonate
PCD:	Programmed cell death
PLC:	phospholipase C
ROS:	Reactive oxygen species
rRNA:	ribosomal RNA
RCD:	Regulated cell death
WT:	wild type

ANEXOS

A.2 The effect of plant stress on phosphoinositides

JA Morales¹., W.A. Gonzalez-Kantun¹, L.C. Rodriguez-Zapata², J. Ramón-Ugalde³ and E. Castano *¹.

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México, 2Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México, 3 Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO). Instituto Tecnológico de Conkal (ITC)

Keywords: *Arabidopsis*, stress, phosphoinositides, stress tolerance

*Corresponding author: Enrique Castano; address: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. E-mail: enriquec@cicy.mx.

Revisión actualmente sometida y bajo revisión por la revista: Cell Biochemistry & Function

Abstract

Phosphoinositides are very versatile molecules with a plethora of functions such as cytokinesis, chemotaxis, cell survive and cell death. Its functions depend on the proteins with which they interact. Thus, when interacting with phospholipases, phosphatases or kinases, they can be precursors of second messengers in different signaling pathways or be second messengers by themselves, by direct interaction with other proteins to modulate it functions trough changing its localization, activity or enhancing its synthesis rate. Because they are more abundant in animal cells and their importance in diseases such as cancer has taken priority their study in plants functions has not evolved to the same extent. However, several studies have shown its importance for plant cells viability and environmental response. This review focuses on the response to abiotic and biotic stress, showing its implication in the plants survival in different stages of their

ANEXOS

development.

Introduction

Due to its condition of sessile organisms, plants develop multiple strategies to sense environmental changes and deal with adverse weather conditions. Many times these strategies have some evolutionary common origin in order to deal with and respond to these conditions (Fujita et al., 2006, Atkinson and Urwin, 2012).

The synthesizes of multiple molecules to sense stress and maintain their homeostasis are in most cases, reactive oxygen species (ROS), hormones, kinases, transcription factors, amino acids, fatty acids and phospholipids like phosphoinositides (Petrov et al., 2015, Wang et al., 2003, Munnik and Nielsen, 2011). Phosphoinositides (PIPs) can serve as second messenger's precursors or second messengers themselves in different signal networks. PIPs derivate from phosphatidylinositol which could be reversible phosphorylated in its inositol ring in positions 3', 4' and 5' to generate 7 different phosphoinositides; three monophosphate, three bisphosphate and one trisphosphate: PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ (Echard, 2012).

While in mammals, PIPs represent almost 1% of total plasma membrane lipids, of which PI(4,5)P₂ is the most abundant followed by PI(4)P in plants PIPs represent far less than 1% and there is a reverse case scenario as PI(4)P appears to be the main PIP followed by PI(4,5)P₂ (Munnik and Nielsen, 2011, Hou et al., 2016, Balla, 2013).

PI(4)P and PI(4,5)P₂, are called the phosphoinositide system, which was detected for the first time in 1985 in plants utilizing carrot suspension cultures and separating the lipids by thin layer chromatography of ³H radiolabeled phospholipids (Boss and Massel, 1985).

ANEXOS

PI(3)P was isolated from *Spirodela polyrhiza* L, radiolabeled with ^3H and ^{32}P and isolated by HPLC, opening the possibility of the existence of the PI3K kinase signaling pathway in plants. Later in 1997, PI(3,5)P₂ was found again in carrot suspension cells under osmotic stress with NaCl, in a medium with [^3H]inositol-labelled showed that PI(3,5)P₂, but not PI(3,4)P₂ could be found in plants and may have been mistaken in previous works (Dove et al., 1997). This mistake could be attributed to the very low abundance of phosphoinositides, making hard to achieve efficient extraction couple with the difficulty to distinguish between structural isomers of PIP and PIP₂ (Drøbak et al., 2000, Pettitt et al., 2006, Kiefer et al., 2010).

Finally, PI(5)P was identified in 2001 in experiments that involved plants of *Arabidopsis thaliana* under water stress (Meijer et al., 2001). Until now PI(3,4)P₂ and PI(3,4,5)P₃ have not been found in plants, however, it is possible that specific conditions need to be met to detect this species of phospholipids or that these PIP species have a rapid turnover with very low amount produced in the cells (Boss and Im, 2012, Hou et al., 2016). For example, AtPIP5K1 kinase is able to synthesize PI(3,4)P₂ from PI(3)P and PI(3,4,5)P₃ and AtPTEN1 binds to PI(3,4,5)P₃ in vitro but in vivo binds with PI(3)P and PA (Zhang et al., 2011, Anne et al., 2012).

A homolog of PTEN in *Arabidopsis*, AtPTEN1 is capable of dephosphorylating PIP₃ *in vitro*, this activity was 16% higher than HsPTEN. The experiments involved disruption of the phosphatase activity by a mutation C152S-AtPTEN1 also the expression pattern of AtPTEN1 gene occurs in flowers anthers and pollen once the buds turn white until opened flowers develop. Furthermore, iRNA silencing of PTEN promotes pollen cell death. Cell death analysis carried out with different stains including DAPI, tinopal and propidium

ANEXOS

iodide, which reveals nuclear degradation and membrane rupture. Finally, electron microscopy show abnormal shape among pollen grains with different invaginations, disruption and gaps in the structure. However, in this work, authors didn't determinate if PTEN binds to PIP3 or another PIP *in vivo* (Gupta et al., 2002). More recently PI(3)P interaction with PTEN and over-expression of this phosphatase was shown to alter growth of pollen tubes by disruption of PI(3)P dynamics. *In vitro* fatblot assay with heterologous expressed GST-PTEN, shows PTEN binds only to PIP isomers, and this binding is stronger to PI(3)P. Overexpression of PTEN causes accumulation of autophagic bodies in pollen tubes leading to sterility. However, both, overexpression of VPS34, a kinase witch produce PI(3)P by phosphorylation of inositol ring of phosphatidylinositol (PI) and exogenous PI(3)P could revert PTEN overexpression symptoms (Zhang et al., 2011).

In 2012, two novel PTEN proteins from *Arabidopsis* were reported *atPTEN2a* and *atPTEN2b*. The relative mRNA abundance of both proteins genes increases in presence of NaCl 50mM after 24 hours in 15 days old seedlings, and the maximum increment observed with 100mM of NaCl. mRNA of *atPTEN2a* level is 2 fold higher than *atPTEN2b* at this NaCl concentration and 3 fold higher than the control condition. Higher concentration of NaCl (150 or 200mM) decrease the amount mRNA is produced. Mannitol treatment shows an increment of *atPTEN2a* mRNA, and *atPTEN2a* mRNA levels was higher than *atPTEN2b* by 3 fold and maximum expression was overserved with 150 mM mannitol concentration. Detection of both proteins by western blot assay shows that *atPTEN2b* presence is 6fold times that of *atPTEN2a* in control conditions, in leaves and roots. In roots *atPTEN2a* increase during mannitol treatment to the same level as *atPTEN2b* level after 48 hours (Anne et al., 2012) . *AtPTEN2a* seems to play role in salt and osmotic stress by controlling PIPs levels.

ANEXOS

PTEN hydrolysis *in vitro* assay with malachite green reveal that *at*PTEN2a could dephosphorylate PI(3)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ in this order of activity, while *at*PTEN2b can dephosphorylate only PI(3)P₅. Interesting, *at*PTEN2a binds *in vitro* (fatblot assay) only with phosphatidic acid (PA) (Anne et al., 2012).

As we have seen, many works report capability of Enzymes to use PI(3,4)P₂ and PIP₃, only *in vitro*, no *in vivo* proof was achieved and currently class I PI3Ks witch synthetize PIP₃ from PI(4,5)P₂ (Meijer and Munnik, 2003).

One particular observation is that many of the detected PIPs are only under particular stress conditions including heat, hydric, and osmotic stress. This shows the relevance of these molecules in the plant stress response as seen in figure A.4. Therefore, today many examples of function of PIPs focused only in plant stress response and tolerance.

ANEXOS

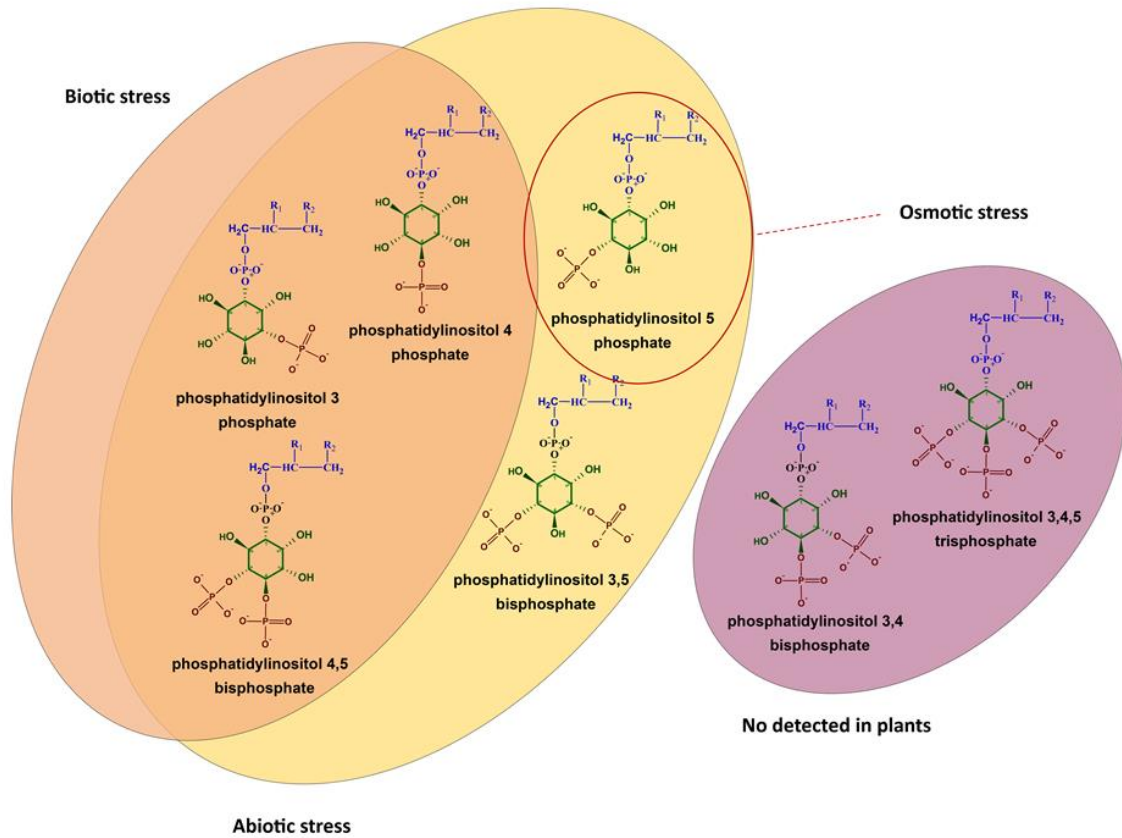


Figure A.4 Phosphoinositides in plant stress. Five of seven PIPs were found in plants (yellow ellipse). PIP3 and PI(3,4)P2 have not been detected yet (purple ellipse). All detected PIPs are related with abiotic stress. PI(3)P, PI(4)P and PI(4,5)P2 are related with biotic stress (orange ellipse). PI(5)P has been implicated in secondary osmotic stress (red contoured ellipse).

PIPs in abiotic stress

Phosphoinositides plays a pivotal role in plant stress responses; as demonstrated earlier in the 90's when also new PIPs species, not only PI(4) and PI(4,5)P2, were detected in plants, only in abiotic stress, mainly osmotic and hydric stress.

PI(4,5)P2 is one of the most studied phosphoinositide in plant systems because it is the IP3 precursor, a key regulator for cellular Ca^{2+} and diacylglycerol (DAG) that is generated

ANEXOS

during the catalytic action of a phosphoinositide by a specific phospholipase C (PLC). PI(4,5)P₂ increased during salt and osmotic stress in leaves and roots, also, its synthesis is related with the increase of IP₃ and mobilization of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum and vacuoles to cytosol activating or deactivating protein targets together with phosphorylation events (Pical et al., 1999, DeWald et al., 2001, Munnik, 2014).

The characterization of a PLC gene in *A. thaliana* cAtPLC1, is expressed in salt, cold and dehydration stresses, it is also induced by abscisic acid. The purified recombinant PLC encoded by this gene has been tested to hydrolyze PI(4,5)P₂ into DAG and IP₃ *in vitro* and this activity is Ca²⁺ dependent. Under salt stress, cAtPLC1 is expressed in shoot, leaf and root, and this expression starts the first hour and achieves the maximum expression level in the fifth hour (Hirayama et al., 1995).

PLC is able to confer salt tolerance in rice. OsPLC1 RNA increased in salt stress and mutant plants with no detectable levels of expression of OsPLC1 was sensitive to salt stress and reduced survival of the plants after the stress was added, while overexpression of PLC enhance the number of survival plants. OsPLC1 is capable to hydrolyze PI(4,5)P₂ and PI(4)P, however, it has a higher affinity to PI(4)P. *In vivo*, the amount of PI(4)P and fluorescence levels of a biosensor for this PIP decreased significantly, whereas DAG increased in salt.

Studies in tobacco during drought stress by overexpressing *Zea mays* phospholipase C1 (ZmPLC1) with PI(4,5)P₂ like substrate (Zhai et al., 2013) and PLC2 in *Torenia fournieri* (Song and Han, 2008). T τ PLC2 is expressed in root, leaf and stem and its expression is induced by plant growth regulators: 3-indoleacetic acid (IAA), gibberellic acid (GA), 6-benzylaminopurine (BA) and abscisic acid (ABA); salt (250 and 300 mM of NaCl) and

ANEXOS

drought stress in leaves (Song and Han, 2008)

In BY-2 tobacco cells PI(4,5)P₂ increased during heat stress. This PIP is accumulated mainly in the nucleus and nuclear envelope in cells during stress and at the same time it decrease from the membrane, due to an increase in the activity of the PLD enzyme, in addition to an increase levels of PA (Mishkind et al., 2009). This observation triggers the question about the role of PI(4,5)P₂ in tobacco cell nucleus. It raises the possibility that it fulfills a role similar to that observed in HeLa cell during osmotic stress; in which it regulates the activity of the poly(A) polymerase STAR-PAP, that is responsible for the maturation of the mRNA responsible for the response to this type of stress (Mellman et al., 2008).

PIPs are necessary to sense nutritional state in eukaryotes, including plants. Like PI(4,5)P₂ seems to be necessary under sucrose starvation. In *Arabidopsis* suspension cell a change in transcription levels of a putative phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase occurs when sucrose starvation takes place. The increased mRNA levels of the enzyme change 3-5 folds respectively within 24-48 hrs (Contento et al., 2004). This may be regulated by TOR (target of rapamycin) a kinase that controls growth based in the energy status (Robaglia et al., 2012) (Yokawa and Baluška, 2016) and is itself regulated by PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1). A PDK1 homolog in *Arabidopsis* interacts *in vitro* with PI(3)P, PI(3,4,5)P₃ and PI(3,4)P₂ through its PH domain (Deak et al., 1999).

PI(3,5)P₂ discovered under osmotic stress conditions (Meijer et al., 1999) and related with the regulation of the vacuolar acidic pH through its interaction with the transporter “chloride channel a” (CLC-a). Inhibiting the anion/H⁺ antiport activity rather than stimulating the

ANEXOS

activity of vacuolar H⁺ ATPases, regulating a reduction in vacuolar volume to content with the water deficiency and promoting stomal closure (Carpaneto et al., 2017).

PI(3,5)P₂ and PI(3)P interacts with ROF1 in *Arabidopsis*, a FKBP-immunophilin related with the response to salt and osmotic stress, in fat-blots and PIP affinity chromatography, (Karali et al., 2012). In that work, authors observe a cytoplasmic localization of ROF1 in resting cells but observed a redistribution to the plasma membrane during osmotic stress and an enrichment of ROF1 in PIPs chromatography. Even more, using mutants and PI3K inhibitors like wortmannin and LY294002 reduce germination efficiency under salinity stress.

PI(5)P was identify as a new plant phosphoinositide monophosphate in plants when was observed during hyperosmotic stress, suggesting their involvement in osmotic stress signaling (Meijer et al., 2001). In 2010 was demonstrated a link between PI(5)P and the activity of the ATX1 chromatin modifying protein that trimethylate histone H3, in response to dehydration stress. Dehydration leads to an increase in PI(5)P in *Arabidopsis* by the activity of a myotubularine homolog (AtMTM1), This enzyme is capable to generate PI(5)P from PI(3,5)P₂ and is induced under dehydration. This increase retains the ATX1 enzyme in the nuclear membrane, thereby preventing the methylation of histone H3 (Ndamukong et al., 2010).

Recently, AtPI4K γ 3 a member of PI4K kinase characterized increases its expression under salt stress, including a greater stress tolerance when it was overexpressed and shows a nuclear localization. However, kinase activity in vitro was not detected, but AtPI4K γ 3 is able to bind to three phosphoinositides monophosphate and auto phosphorylation activity. Is possible that phosphoinositides could regulate the nuclear localization of this kinase o

ANEXOS

even modulate its auto phosphorylation via an increment in the level of one PIP (Akhter et al., 2016).

In transgenic cultures of *Brassica napus*, a characterization of PLC2, Pins3-Kinase (VPS34) and a phosphatidylinositol sythase (PtdIns S1) shows in cold stress the expression of PLC2 increased while, the levels of VPS34 and PtdIns S1 remains without changes. Under salt stress is the expression of VPS34 which increases, suggesting an important role for PI(3)P in the tolerance of this stress. In the same work, plant growth in drought stress exhibit a major number of transcripts of both, PLC2 and VPS34 (Das et al., 2005).

PIPs in biotic stress

There are a few examples of PIPs functions during plant biotic stress response and tolerance, however, since biotic and abiotic stress have common signaling pathways (Atkinson and Urwin, 2012, Bostock et al., 2014) is not surprising to find some similar response in both stresses, this is the case of PLC. Transgenic *Brassica napus* plants with overexpression of PLC2 that uses PI(4,5)P₂ as a substrate to generate second messengers IP₃ and DAG, shows tolerance to both, biotic and abiotic stress. Testing with the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, there is a reduced severity of symptoms in plants with enhanced PLC2 expression. However this tolerance appears to be partial (Nokhrina et al., 2014). This observations are supported by similar results in rice plants infected with *Magnaporthe grisea* that caused a rapid expression of PLC1 in resistant lines compared with susceptible lines that showed lower level of the enzyme(Song and Goodman, 2002).

ANEXOS

Also in tobacco suspension cells, PLC3 and PLC1 are necessary to activate hypersensitive response by internalization of Avr4 immune receptor, whose response is blocked by U73122, a PLC inhibitor (Abd-El-Haliem et al., 2016). Immune receptors are present in both, plant and animals. They are defined as nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs). These receptors detect pathogens and activate defense response (El Kasmi and Nishimura, 2016). Avr4 is necessary for external alkalization of media, an early step in stress response in which activation of this protein required (Abd-El-Haliem et al., 2016).

Seedlings of rice treated with Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic (BTH), a SA analog, capable to induce acquired resistance in plants such as rice, cauliflower, cotton, wheat and *Arabidopsis* (Iriti and Faoro, 2003); presents a major OsPCL1 level expression after exposition to *P. syringae*. OsPCL1 mRNA levels increased with 0.3 μ M to 3000 μ M of BTH from the first day, until the seventh, a new treatment with *P. syringae* shows 2 folds level expression of this enzyme in leaves compared with seedlings without BTH treatment. Resistant rice seedlings exposed to *M. grisea* exhibits higher levels of OsPCL1 since the first 6 hours compared with susceptible seedlings (Song and Goodman, 2002).

Thus, PIP-PLC pathway response is activated by bacterial pathogens. During bacterial infection, bAvrRpm1- and AvrRpt2 resistance proteins activated by PLC and PLD. PLC hydrolyzed PI4P and PI(4,5P)₂ to produce IP₂ and IP₃ to release intracellular CA²⁺ and PA by the action of a DAGK, triggers production of ROS and, in some case, producing cell death, regulating the hypersensitive response (HR) (Andersson et al., 2006, Hirayama et al., 1995, Vossen et al., 2010).

Extracellular PI(4)P is an important molecule the plant-pathogen interaction. Increased

ANEXOS

PI(4)P correlates with xylanase treatment in tobacco suspension cells, which is used by fungi against plants to degraded the cell wall. This PIP triggers itself the same response that xylanase, inducing ROS production like defense response and leading to cell death in tomato suspension cells (Gonorazky et al., 2008).

PI4P binds directly with a pathogenesis related protein witch it is a negative regulator of defense genes dependent of salicylic acid (SA); PUB13. PUB13 interacts directly with RabA4B and it has localized in trans-golgi network (TNG) & golgi. Once recruited by RabA4B it could form a complex with the PI4-kinases PI4K β 1 and PI4K β 2 to repress SA-dependent gene expression and defense response in *Arabidopsis*; this is demonstrated because mutants of both, PUB13 and PI4K β 1/ PI4K β 2 show similar smaller phenotypes and an enhanced bacterial infection resistance compared with wild type *Arabidopsis* plants. These results are due to activation of the expression of resistance genes related with SA. In addition to this, PU13 interacts *in vitro* with al PIPs, however, PI(4)P is located mainly in Golgi membrane therefore PIP is the main candidate to bind to PUB13 *in vivo*, maybe being a pivotal molecule to recruit and form this complex (Antignani et al., 2015).

External PI(3)P plays a very important role in pathogen internalization in plant cells (which also occurs in animal cells). Oomycetes and fungi produce many proteins with RXLR motif in their N-terminal extremes witch could modulate virulence and plant immune response or programed cell death, e.g., AVR3a *Phytophthora infestans* protein in potato (Yaeno et al., 2011). These motif leads this effectors inside the cells via PI(3)P joining and endocytosis mediated by lipid rafts. Mutations in effector proteins with RXLR motif cause its accumulation outside the cell since they are not capable to internalize. This motif fused with GFP allow the fluorescent protein to enter the cells. *In vitro*, RLXR interacts with

ANEXOS

PI(3)P and the use of inhibitors 1,3IP2 and 1,4IP2 (500 μ M) prevent the entrance of proteins. Oomycetes' proteins need external PI(3)P to recognize host cells, once bound to the extracellular side of plasmatic membrane through the PIP, they are phagocytosed invading the cell (Kale et al., 2010). In plants, both, expression of PI(3)P biosensors, use of PI3K Inhibitor LY294002 and PI3 kinase silencing in transformed *Phytophthora sojae* reduce the infection. These results were accompanied by the observation of the secretion of PI3 Kinase by the oomycete, thus causing an increment in extracellular PI(3)P levels in *N. benthamiana* (Lu et al., 2013).

Far away from the external side of plasmatic membrane, fibrillarins (Fib), a nucleolar protein involved in rRNA processing (Cerdido and Medina, 1995), has been related with virus movement and systemic infection (Kim et al., 2004, Canetta et al., 2008, Li et al., 2017). Recently, an interaction between Fibrillarins and PIPs in *Arabidopsis thaliana* was described (Rodriguez-Corona et al., 2017). AtFib1 and AtFib2 shows differential PIP specificity, suggesting that, PIPs could modulate Fib ribonuclease activity. It is possible that Fib and viral proteins interaction depends of PIPs.

Both fibrillarins differ in their GAR domain, at not only primary structure level, but also tertiary, changing in its special orientation. While AtFib1 interacts *in vitro* strongly with PI(4)P and weakly with PI(3)P, PI(5)P and PI(3,5)P2; AtFib2 shows a similar interaction level with all PIPs and PA. Interesting, GAR seems to be the domain responsible for the union to PIPs (Rodriguez-Corona et al., 2017) and its necessary for viral protein interaction. ORF3 protein from groundnut rosette virus can't interact with Fibrillarins mutants lacking of GAR domain (Canetta et al., 2008).

ANEXOS

Conclusions

PIPs act in stress in two fronts, first like precursors of second messenger in the sensing of stress and activation of mechanisms of stress tolerance (figure A.5), the mayor example of the first case is PI(4,5)P₂ and PI(4)P as substrates of PLC in biotic and abiotic stress sensing and response. Second, recruiting and/or modifying protein activity in stress tolerance *per se*. e.g., PI(5)P acting like a key regulator of water stress through the chromatin remodeler ATX1 or PI(3)P and PI(3,5)P₂ regulating stromal closure or PI4P probably acting like a glue to form RAbA4b, PI4Kβ1/ PI4Kβ2 and PUB13.

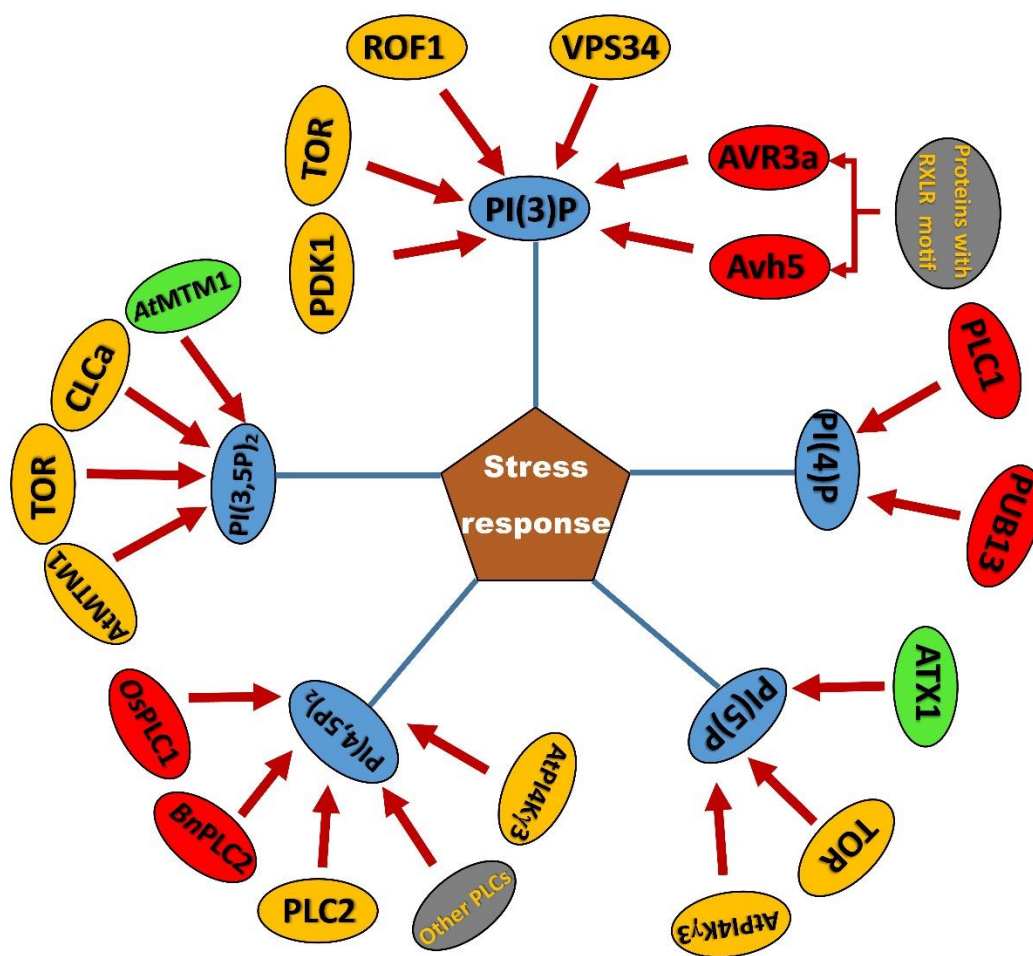


Figure A.5. Stress related protein with PIP interaction. Many proteins interact with PIPs during stress. More abundant are PLC isoenzymes. Abiotic stress related proteins are shown in yellow. Biotic stress related proteins are shown in red, in green osmotic stress related proteins. It is necessary to deepen the knowledge of new proteins with interaction to PIPs related to tolerance to stress to a better understand of the mechanisms of these responses.