

## FUNCIONES DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN PLANTAS: EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y MÁS ALLÁ.

**Gavilanes Ruíz, M.<sup>1</sup>, Saucedo García, M.<sup>1</sup>, Carmona Salazar, L.<sup>1</sup>, Gutiérrez Nájera, N.<sup>2</sup>, Vázquez Vázquez, C.<sup>1</sup>, Rodríguez Mejía, P.<sup>1</sup>, Martínez-Noyola, L.<sup>1</sup>, Palacios Bahena, S.<sup>1</sup>, El-Hafidi, M.<sup>3</sup>, González de la Vara, L. E.<sup>4</sup>, Enríquez Arredondo, C.<sup>1</sup>, Cruz García, F.<sup>1</sup> y Plasencia, J.<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Dpto. de Bioquímica, Conj. E. Fac. de Química, UNAM. Cd. Universitaria, México. 04510, D. F. México. <sup>2</sup> Unidad de Proteómica Médica, Subdirección de Investigación Básica. Inst. Nal. de Medicina Genómica. Periférico Sur No. 4124. Torre Zafiro 2, Piso 5o. Col. Ex Rancho de Anzaldo Del. Álvaro Obregón. México. 01900, D. F. México. <sup>3</sup> Dpto. de Bioquímica, Inst. Nal. de Cardiología. Juan Badiano 1. Tlalpan. México. 14080, D. F. México. <sup>4</sup> Dpto. de Bioquímica, CINVESTAV Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, Ap. Post. 629 Irapuato. 36500, Guanajuato, México.

Tel: (525) 622 5275; Fax: (525) 622 5329; Correo-e: [gavilan@servidor.unam.mx](mailto:gavilan@servidor.unam.mx)

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas complejas y extraordinariamente diversas, cuyas estructuras van desde las más simples como las de las bases esfingoideas, también llamadas bases de cadena larga (LCB), pasando por las de las ceramidas y llegando a las de los esfingolípidos complejos. Las LCB son cadenas hidrocarbonadas largas con una región polar en donde se encuentran substituyentes OH (en el C<sub>1</sub>) y <sup>+</sup>NH<sub>3</sub> (en el C<sub>2</sub>). Cuando al grupo amino se acila un ácido graso mediante un enlace amida, se forma la ceramida. Tanto las LCB como los ácidos grasos varían en longitud, número y posición de insaturaciones e hidroxilaciones. Al OH del C<sub>1</sub> de las ceramidas se unen grupos polares tan diversos como carbohidratos o alcoholes fosforilados. La variedad en cada uno de los componentes de estos lípidos genera una gran riqueza combinatorial que se expresa en su heterogeneidad, estimándose más de 300 formas diferentes (Kolter et al., 2002, J Biol Chem 29:25859).

En células eucariontes, los esfingolípidos tienen dos funciones: la de conformar las bicapas lipídicas de las membranas junto con los glicerolípidos y esteroides y la de ser segundos mensajeros. En células vegetales, las evidencias experimentales directas que apoyan estas funciones son escasas y se han limitado a los siguientes casos: a) los esfingolípidos complejos como componentes típicos de dominios resistentes a la solubilización por detergente (DRM), sugiriendo su asociación a microdominios o balsas lipídicas en la membrana plasmática (MP) (Mongrand et al., 2004, J Biol Chem 279:36277; Shaollari et al., 2004, Physiol Plant 122:397; Borner et al., 2005, Plant Physiol 137:104) y b) las LCB (esfingosina y fitoesfingosina fosforiladas) como mediadores en una vía de transducción que conduce al cierre de estomas (Ng et al., 2001, Nature 410:596). Sin embargo, la gran abundancia y variedad de esfingolípidos reveladas recientemente por procedimientos que permiten la extracción de lípidos muy polares y cargados en plantas, sugieren una intensa participación en funciones celulares (Markham et al., 2006, J Biol Chem 281,22684).

El trabajo que se reseña en esta presentación está enfocado en la elucidación de la función de los esfingolípidos en las células vegetales. La estrategia seleccionada se basó en la manipulación de los niveles endógenos de estos lípidos usando a la micotoxina fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) que inhibe a la ceramida sintetasa o esfinganina *N*-aciltransferasa, una enzima que se encuentra en una posición intermedia en la secuencia de reacciones que integran la biosíntesis de esfingolípidos en el RE/AG (Retículo Endoplásmico/Aparato de Golgi). Por lo tanto, la inhibición de la enzima por la FB<sub>1</sub>, genera una acumulación de precursores (LCB) y una deficiencia de productos (ceramidas y esfingolípidos complejos). Tejidos vegetales como los de embriones de maíz y de hojas de frijol se expusieron a la toxina, se aislaron las MP

correspondientes y en ellas se determinaron actividades enzimáticas, composición de lípidos y propiedades membranales.

A una concentración de  $FB_1$  de 10  $\mu M$ , ésta no fue retenida en la MP, pero sí alcanzó su blanco en el RE. En esta condición, se pudo documentar en la MP un exceso de esfinganina (una LCB) de 10 veces y uno de 7 veces de fitoesfingosina (otra LCB) en la del RE, en comparación con los controles no expuestos a la  $FB_1$ . Las MP purificadas que presentaban esta acumulación de LCBs no exhibieron cambios ni en la composición ni en los niveles de los cuatro ácidos grasos más abundantes y sin embargo mostraron una disminución de 1.7 veces en la fluidez, lo cual es consistente con un cambio lateral de fase promovido por el exceso de la LCB y que se puede relacionar con el incremento observado del 63 % en la permeabilidad. Este último efecto podría también deberse a una formación de poros en la MP por la LCB, fenómeno que se ha descrito para la esfingosina (Contreras et al., 2006, *Biophys J* 90:4085).

Adicionalmente, tres de las enzimas de la MP: la Glucan sintetasa II, la NADPH oxidasa y la ATPasa de  $H^+$ , exhibieron inhibiciones en sus actividades del 25, 33 y 30 %, respectivamente. En el caso de la última, se demostró que la inhibición se debió a la baja en las ceramidas/esfingolípidos complejos y no al exceso de esfinganina o a la rigidización de la membrana. Estos datos indican que la actividad de estas enzimas puede afectarse por las especies de esfingolípidos presentes, lo cual coincide con el hecho de que estas tres proteínas se hayan reportado como residentes típicos de balsas lipídicas de la MP en plantas y cuya presencia se ha evaluado en términos del aislamiento de DRM.

Las DRM son fracciones extraídas de la MP que están enriquecidas en esfingolípidos, esteroides y glicerolípidos saturados. Con objeto de determinar si la  $FB_1$  y por tanto la perturbación en los niveles endógenos de esfingolípidos repercutía en la obtención de DRM, se aislaron preparaciones que, tras el tratamiento con la toxina, tuvieron rendimientos 15 veces por debajo de los valores de los controles y cuya ultraestructura reveló la presencia de formaciones más largas (50-100 nm) y menos abundantes (57 %) en comparación con los controles.

La localización subcelular de los esfingolípidos, al igual que la de los fosfoglicerolípidos es eminentemente membranal, sitio desde donde pueden ejercer sus funciones de segundos mensajeros, como sucede con los productos de la fragmentación de glicerolípidos. Por tanto, las LCB se pueden generar en la MP o en la del RE a partir del rompimiento de esfingolípidos complejos. Considerando lo anterior y los indicios en la literatura y en nuestro grupo que implican a los esfingolípidos en respuestas de defensa contra patógenos, se exploró la posibilidad de que las MAP cinasas, un tipo de cinasas muy ligadas a las respuestas contra patógenos, pudieran ser activadas por las LCBs. Se encontró que la adición de  $FB_1$  o de esfinganina a embriones de maíz u hojas de frijol indujo a una MAPK de 45 kDa que es homóloga a una MAPK típicamente activada por la presencia de patógenos en otras especies (Berberich et al., 1999, *Mol Gen Genet* 262:534; Asai et al., 2002, *Nature* 415: 977)

Los resultados anteriores indican que los esfingolípidos membranales pueden ser especies moleculares que modulan la actividad de enzimas, al constituir las matrices lipídicas en las que estas proteínas están reclutadas y desde donde pueden generar especies mensajeras que activan directa o indirectamente, cascadas de MAP cinasas que se encuentran más allá de la MP, desencadenando respuestas como las de defensa contra patógenos.

**Proyecto financiado por la Fac. de Química, UNAM (PAIP 6290-02); la DGAPA, UNAM (IN207806) y el CONACYT, México (40311-Q).**