

LAS BASES DE CADENA LARGA ACTIVAN A MAPKs DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA CONTRA PATÓGENOS EN PLANTAS

Saucedo García M., Cruz-García F., Plasencia J. y Gavilanes Ruíz M.

Departamento de Bioquímica, Conj. E, Facultad de Química, UNAM. Paseo de la Investigación Científica, Circuito Institutos, Cd. Universitaria, 04510, México D. F. Tel.: (55) 5622 5275; Fax: (55) 5622 5389, e-mail: julieta_anairam@yahoo.com.mx

La activación de ciertas MAPKs vegetales se ha asociado con la respuesta de defensa que implementan las plantas durante el ataque de patógenos avirulentos. Las especies mejor caracterizadas en este contexto son las dicotiledóneas *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* (Desikan *et al*, 2001, *Plant Physiol*, 126: 1579; Asai *et al*, 2002, *Nature*, 415: 977; Ren *et al*, 2002, *J Biol Chem*, 277: 559). En ambas especies se presenta la activación de dos MAPKs diferentes, que de acuerdo al análisis filogenético son ortólogas entre sí (AtMPK3/NtWIPK y AtMPK6/NtSIPK). Esta característica sugiere una relación estructura/función conservada en las cinasas de diferentes especies vegetales de respuesta al ataque de patógenos.

El trabajo presente se enfocó en el estudio de una MAPK, la cual es el último componente de las cascadas de cinasas de proteína activadas por mitógenos (Saucedo y Gavilanes, 2005, *REB*, 24:4). La MAPK es la única cinasa de Tyr que se ha identificado en tejidos vegetales y dado que tiene la particularidad de fosforilar a sus sustratos en los residuos de Ser o Thr localizados en regiones ricas en Pro, los ensayos de actividad se basan en la fosforilación de la proteína básica de mielina (MBP) en gel, ya que representa un sustrato artificial de gran afinidad y especificidad para las MAPKs.

Por otra parte, hay indicios en la literatura y en nuestro laboratorio, de que esfingolípidos como las bases de cadena larga (LCBs), están involucrados en las reacciones de defensa contra patógenos (Asai *et al*, 2000, *Plant Cell*, 12: 1823; Stone *et al*, 2000, *Plant Cell*, 12: 1811; Plasencia *et al*, 2005. Annual Meeting of the American Phytopathological Society. Austin, Texas; Gutiérrez-Nájera *et al*, 2005, XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Mérida, México).

En este proyecto, se exploró la posible asociación entre LCBs y MAPKs como uno de los vínculos que relaciona a los esfingolípidos con la evocación de reacciones de defensa. Para ello, se utilizó un sistema en el que se generó un aumento de LCBs endógenas utilizando fumonisina B₁ (FB₁). Esta toxina modifica los niveles endógenos de esfingolípidos o precursores de éstos, al inhibir de forma competitiva a la enzima catalizadora de la acilación de las LCBs (siendo la principal de éstas la esfinganina o SN), en la ruta biosintética de esfingolípidos. La inhibición resulta en una acumulación de LCBs y una baja de ceramida, la cual es el producto de la reacción y es además, el precursor directo de esfingolípidos complejos.

En este trabajo se utilizaron como especies sensibles a la FB₁, maíz y frijol, una monocotiledónea y una dicotiledónea, respectivamente. En ellas, la toxina produce una muerte celular programada (similar a la apoptosis), típica de las reacciones de defensa contra patógenos y conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR), y en las que además, se han detectado niveles endógenos de LCBs incrementados como resultado de la exposición con la toxina. Como estrategia alterna para el estudio de la relación esfingolípidos-MAPKs, las plantas fueron expuestas a SN exógena.

En ambas especies vegetales, se observó que la adición de FB₁ y de SN activó al menos dos diferentes cinasas que fosforilan selectivamente MBP y no caseína o histona. La activación de las cinasas de MBP presentó una curva trifásica en el intervalo de minutos a horas. La concentración más baja de FB₁ o SN que indujo esta activación fue 0.4 µM y la más alta probada y también activadora fue 40 µM. La reactividad a un

anticuerpo anti ERK (una MAPK de células animales) confirmó la identidad de una de las cinasas encontradas en las dos especies, como una MAPK.

Las MAPKs encontradas en maíz tienen una masa molecular aparente muy similar a la de dos MAPKs reportadas en hojas de maíz: 45 y 41 kDa. La de 45 kDa es la que presentó una activación más consistente y corresponde a una MAPK que responde también a estrés abiótico en nuestras condiciones. Ambas características corresponden a una MAPK que se ha descrito como ortóloga de la AtMPK6/NtSIPK (Berberich *et al*, Mol Gen Genet, 262: 534).

Con base en los reportes que han evidenciado que la NtSIPK activable por ácido salicílico (SA) es una MAPK que responde a patógenos y herida, expusimos los embriones de maíz a este compuesto para determinar si alguna de las MAPKs que habíamos detectado correspondía a una homóloga funcional de la NtSIPK, encontrando que la misma MAPK inducida por SN o FB₁, respondió al SA.

En el caso de frijol, no se había reportado la activación de alguna MAPK. Sin embargo, nuestros resultados indican que existen dos MAPKs con masas moleculares de 48 y 44 kDa inducidas por FB₁ o SN. La masa molecular, la reactividad a anticuerpos heterólogos y el patrón de fosforilación sugieren que estas MAPKs son homólogas a la AtMPK3/NtWIPK y a la AtMPK6/NtSIPK, pues ambas responden a herida y a SA con una temporalidad muy similar al de NtSIPK y NtWIPK que se ha reportado para hojas de *N. tabacum*.

Los resultados indican que las MAPKs que encontramos que se activan por LCBs en maíz y frijol, son las mismas que son inducidas por patógenos en otras especies. Ésto constituye la primera evidencia de que las MAPK de plantas pueden activarse por esfingolípidos y sugieren que la vía de transducción en cuestión está relacionada con la defensa contra patógenos, constituyendo una estrategia conservada en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Además, nuestros datos aportan evidencia experimental sobre uno de los posibles mecanismos a través del cual la FB₁ es capaz de producir HR y otras reacciones de defensa en plantas.

Este trabajo ha sido financiado por la Facultad de Química, UNAM (PAIP 6290-02) y DGAPA, UNAM (IN207806). MSG es becaria de CONACYT, México.