

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.

UNIDAD DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
ENZIMA FOSFOLIPASA C EN RAICES TRANSFORMADAS DE
*Catharanthus roseus***

TESIS QUE PRESENTA

Q.F.B. MARIA LUISA PIÑA CHABLE

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

MERIDA, YUCATAN, MEXICO

1999

DEDICO ESTA TESIS CON TODO CARIÑO:

A Dios por ser la luz que guía mis pasos

A mis padres:

José Luis y Layda, por su amor, comprensión y apoyo. Por estar a mi lado en todos los momentos de mi vida, por sus consejos y su confianza.

A mis hermanos:

A Isela, Karina, Alejandro y José Alberto, por ser mis mejores amigos, por compartir la vida y sus sueños conmigo. Por llenar mi vida de alegría y cariño.

A mis tíos:

Miguel y Socorro Piña, por su apoyo y generosidad. Por su ayuda para alcanzar mis metas.

A mi mamá académica:

Tere Hernández, por ser mi guía en el maravilloso mundo de la bioquímica, por su apoyo y comprensión.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (4119P-N9608), la International Foundation for Science (C/2236-1) y una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (116919) para María Luisa Piña Chable.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial:

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, al Dr. Víctor M. Loyola Vargas, a la Dra. Elisa Valenzuela, al Dr. Neftali Ochoa y al Dr. Armando Escamilla por sus excelentes sugerencias y la revisión crítica con que enriquecieron el presente escrito.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su apoyo incondicional, su interés en mi formación académica, por su dirección y asesoría en la realización del presente trabajo.

A las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., en especial a la Unidad de Biología Experimental por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la International Foundation for Science por el apoyo económico brindado durante la realización del presente trabajo.

ABREVIATURAS

AMPc.-	Adenosín monofosfato cíclico
BCA.-	Ácido bicinconínico
BSA.-	Albúmina sérica de bovino
DAG.-	1, 2-Diacilglicerol
EGTA.-	Etilenglicol-bis (β -aminoetil)-ácido tetraacético-N,N,N',N'-
GMPc.-	Guanosín monofosfato cíclico
IC ₅₀ .-	Concentración media inhibitoria
IP ₃ .-	Inositol 1, 4, 5, trifosfato
PH.-	Región de homología a Pleckstrina
PI.-	Fosfatidilinositol
PIP.-	Fosfatidilinositol 4, monofosfato
PIP ₂ .-	Fosfatidilinositol 4, 5, bifosfato
PI-PLC.-	Fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol
³ H-PIP ₂ .-	Fosfatidilinositol 4, 5, bifosfato tritiado
PKC.-	Proteína cinasa C
PLC.-	Fosfolipasa C
PMSF.-	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
SH2.-	Región de homología a Src 2
SH3.-	Región de homología a Src 3
Src.-	Sarcoma de Rous
TCA.-	Ácido tricloroacético

CONTENIDO

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
---------	---

ABSTRACT	3
----------	---

Introducción	5
--------------	---

Capítulo I	Antecedentes	7
------------	--------------	---

Aluminio	7
----------	---

Formas fitotóxicas de aluminio	7
--------------------------------	---

Síntomas de la toxicidad del aluminio	8
---------------------------------------	---

Toxicidad del aluminio a nivel celular	10
--	----

Mecanismo de fitotoxicidad del aluminio en el citoplasma	11
--	----

Interacciones del aluminio con el citoesqueleto	12
---	----

Interacciones con calmodulina	13
-------------------------------	----

Interacciones del aluminio con procesos de transducción de señales	13
---	----

Señales de transducción y segundos mensajeros	14
---	----

Fosfolipasa C (PLC) en animales	14
---------------------------------	----

Isoenzimas	15
------------	----

Características estructurales	16
-------------------------------	----

Mecanismos de activación	17
--------------------------	----

PLC en plantas	18
----------------	----

Interacción del aluminio con procesos de transducción de señales	19
---	----

PLC en <i>Catharanthus roseus</i>	20
-----------------------------------	----

Modelo experimental: <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	21
---	----

Conclusiones	22
--------------	----

Hipótesis	23
-----------	----

Objetivo general	23
------------------	----

Objetivos específicos	23
-----------------------	----

Capítulo II	Determinación de la concentración de Al^{3+} en el medio de cultivo de las raíces transformadas de <i>Catharanthus roseus</i>	29
Capítulo III	Phospholipase C activity from <i>Catharanthus roseus</i> transformed roots: Aluminum effect	38
Capítulo IV	Discusión general	60
Capítulo V	Conclusiones	62
	Perspectivas	63

RESUMEN

El aluminio es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre. Generalmente se encuentra en forma de aluminosilicatos y conforme el pH del suelo disminuye se solubiliza (Rengel, 1992). La toxicidad del aluminio ha sido reconocida como el factor limitante más importante para la producción agrícola en suelos ácidos (Haug, 1984). El síntoma principal de la toxicidad por aluminio es la inhibición del crecimiento de las raíces (Rengel, 1992). El aluminio se puede depositar en la pared celular, pero también es capaz de atravesar la membrana plasmática y entrar al citoplasma de las células (Lazof *et al.*, 1994). Aún no se conoce cuál es el mecanismo de toxicidad del Al; se ha propuesto que el Al interacciona con el citoesqueleto, con la calmodulina y con algunos de los mecanismos de transducción de señales (Kochian, 1995).

La enzima fosfolipasa C (PLC) es un elemento importante, pues participa en el mecanismo de transducción de señales en respuesta a estímulos específicos. Esta enzima hidroliza fosfolípidos de inositol para formar diacilglicerol y fosfatos de inositol. Esta familia se ha clasificado en 3 subfamilias: β , γ y δ (Rhee y Bae, 1997). En plantas se han detectado a la fecha varios genes que codifican para esta enzima (Hirayama *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1995; Hirayama *et al.*, 1997; Kopka *et al.*, 1998).

En este trabajo se estudió el efecto del Al sobre la actividad de la enzima PLC proveniente de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. También se realizaron estudios para conocer el efecto del Al sobre el crecimiento de estas raíces. Los resultados más relevantes fueron la inhibición de la actividad de la PLC en ensayos *in vitro*, con una IC_{50} de 0.1 mM; en ensayos *in vivo* esta misma concentración de Al inhibió la actividad enzimática en períodos cortos de incubación (0-4 h). La adición del $AlCl_3$ en una concentración de 1 mM al inicio del ciclo de cultivo, produjo una inhibición del crecimiento de las raíces transformadas de alrededor del 50% y también inhibió la actividad de la PLC durante todo el ciclo de cultivo. La adición del Al en diferentes días del ciclo de cultivo, mostró que este metal tuvo un efecto de inhibición del crecimiento en los

primeros 6 días del ciclo, su adición en días posteriores no afectó el crecimiento. El pH del medio de cultivo no afectó la actividad de la PLC y el crecimiento de las raíces.

El Al no inhibe la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno: Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (GDH- NAD^+); Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (GDH-NADH), la Glutamato sintasa (GOGAT-NADH) y la actividad de la 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A reductasa (HMGR), durante períodos cortos de incubación (1h).

Estos resultados sugieren que la PLC podría ser un blanco para la toxicidad por aluminio.

ABSTRACT

Aluminum is one of the most abundant element in the Earth's crust. Most of Al is present as aluminosilicates, but is solubilized when the pH of the soil is low (Rengel, 1992). Aluminum toxicity is recognized as the most important factor that limit agricultural production on acid soils (Haug, 1984). Al inhibits root growth (Rengel, 1992). Aluminum usually precipitates in the cell wall, but it can also cross the plasma membrane and is accumulated in the cell cytoplasm (Lazof *et al.*, 1994). A mechanism for Al toxicity has not been fully established; however, it has been proposed that it can interact with cytoskeleton, calmodulin and signal-transduction processes (Kochian, 1995).

PLC is an important element, since it plays a crucial role in the signal transduction cascade in response to specific stimulus. PLC hydrolyzes inositol phospholipids into diacylglycerol and inositol phosphates. This family has been classified in 3 subtypes: β , γ y δ (Rhee y Bae, 1997). In plants, several genes that codify for this enzyme have been cloned (Hirayama *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1995; Hirayama *et al.*, 1997; Kopka *et al.*, 1998).

The objectives of this study were: 1) to test the effect of Al on PLC activity from transformed roots of *Catharanthus roseus* and 2) to test the effect of Al on root growth. Aluminum inhibited PLC activity in both *in vitro*, and *in vivo* assays (IC_{50} 0.1 mM). *In vivo* Al inhibited PLC activity during short periods of time (0-4 h). Root growth of *Catharanthus roseus* was inhibited by 50% when 1 mM Al was added at day 0 of root culture. Whereas PLC activity was inhibited during the whole culture cycle. Likewise root growth was inhibited when Al was added in the first six days of culture. An inhibitory effect on PLC activity was observed. The pH of the culture medium did not affect PLC activity or root growth. Al did not inhibit activities of the enzymes involved in nitrogen metabolism (NAD⁺-GDH, NADH-GDH, NADH-GOGAT) and HMGR activity in the same conditions as it does inhibit PLC. These results suggest that PLC enzyme could be an target for aluminum toxicity.

INTRODUCCION

El aluminio es tóxico para las células y en el caso de las plantas es un factor importante que limita la producción de diversos cultivos en suelos ácidos (Haug, 1984). Se ha postulado que uno de los mecanismos de toxicidad del aluminio en la célula, es porque éste interfiere con alguna vía de transducción de señales, particularmente con la vía de los fosfoinosítidos, en la cual participa la enzima PLC (Haug *et al.*, 1994).

Las células no viven aisladas; en todos los organismos multicelulares, su sobrevivencia depende de una red muy elaborada de comunicaciones intra e intercelulares que coordinan el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo de la multitud de células que forman los diversos tejidos y órganos. Las uniones especializadas en la membrana plasmática de las células adyacentes les permite intercambiar moléculas pequeñas y coordinar sus respuestas metabólicas; otras uniones entre células adyacentes determinan la forma y rigidez de muchos tejidos (Lodish *et al.*, 1995). Cada célula ha sido programada durante su desarrollo para responder a un conjunto específico de señales que actúan en diferentes formas para regular el comportamiento de la célula y determinar si vive o muere o si prolifera o no.

La transducción de señales se produce cuando un estímulo es captado por una célula. Esta señal es transmitida (transducción) y se produce un cambio bioquímico (respuesta). Este proceso generalmente requiere el reconocimiento del estímulo por un receptor y la subsecuente generación de segundos mensajeros (Rhee y Bae, 1997). Este fenómeno genera diferentes vías o cascadas de señalización, en tanto que el intercambio de señales entre diferentes cascadas permite a la célula integrar la información de las múltiples señales que recibe (Alberts *et al.*, 1994). Estas señales celulares requieren moléculas de señalización extracelular y un equipo complementario de proteínas receptoras en cada una de ellas, con capacidad para unir y responder a dichas señales en forma programada y característica (Alberts *et al.*, 1994).

La membrana plasmática tiene una función muy importante en la célula debido a su permeabilidad selectiva, no sólo porque mantiene el contenido de la

célula, sino también permite la entrada y salida de moléculas. Las moléculas receptoras localizadas en la membrana plasmática captan las señales originadas en el ambiente externo. Existen dos grupos de proteínas de membrana: periféricas e integrales. Las proteínas periféricas se encuentran unidas a la bicapa lipídica, probablemente por interacciones electrostáticas; mientras que las proteínas integrales están contenidas en su totalidad o en parte en las membranas. Las proteínas integrales contienen grandes regiones hidrofóbicas y se encuentran inmersas en la bicapa lipídica. Las proteínas de membrana tienen diversas funciones, incluyendo una muy importante: la percepción de las señales extracelulares. Algunas proteínas de membrana son receptores para hormonas u otras moléculas que proporcionan a la célula información acerca de su ambiente (Lodish *et al.*, 1995).

En los últimos años ha habido un gran progreso en el entendimiento de los procesos por los cuales las células responden a señales extracelulares (Shi *et al.*, 1995). Los receptores de las membranas celulares perciben estas señales, directamente o a través de sistemas efectores y generan compuestos llamados segundos mensajeros, los cuales transmiten la señal al interior de la célula. Los segundos mensajeros más importantes son: el AMPc, el GMPc, los iones Ca^{2+} , el 1, 2-diacilglicerol (DAG) y el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) (Alberts *et al.*, 1994).

El DAG y el IP_3 son generados por la hidrólisis del fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP_2), un fosfolípido de membrana que es un componente importante de diversas vías de señales intracelulares. Esta hidrólisis es catalizada por la enzima fosfolipasa C (PLC) (Rhee y Bae, 1997). El DAG activa a una proteína cinasa C, y el IP_3 se une a proteínas en las membranas del retículo endoplásmico, produciendo la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares hacia el citosol (Lodish *et al.*, 1995).

Esta cascada de señales permiten a la célula comunicarse con el ambiente externo y favorecen su sobrevivencia. La interferencia con algunas de estas vías de transducción de señales pueden impedir el desarrollo adecuado de la célula.

En este trabajo se reportan los estudios realizados para investigar el efecto del aluminio sobre la actividad de la PLC, utilizando como modelo de estudio raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

CAPITULO I

Antecedentes

ALUMINIO

El aluminio es muy abundante en la corteza terrestre y representa aproximadamente el 8% de ésta. La concentración de aluminio en las soluciones minerales del suelo es usualmente menor a 1 mg L^{-1} ($\sim 37 \text{ }\mu\text{M}$) cuando los valores de pH del suelo son superiores a 5.5, pero aumenta conforme el pH del suelo disminuye (Marschner, 1995). La forma química del aluminio en solución determina su toxicidad para las plantas, las especies rizotóxicas incluyen al Al^{3+} , al $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, al $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y a la forma polimérica Al_{13} (Cocker *et al.*, 1998). Las especies del aluminio que se forman en solución son dependientes del pH (Foy, 1978). En 1918 se sugirió que el aluminio era el factor que ocasionaba la baja producción de los cultivos de *Hordeum vulgare* y *Secale cereale* en suelos ácidos (Hartwell y Pember, 1918). Desde este primer reporte el aluminio ha sido reconocido como el factor limitante más importante que afecta los cultivos de plantas en suelos ácidos del mundo. Este fenómeno afecta entre el 40% y el 70% de los suelos arables en el mundo (Haug, 1984). En México, un total de 13'128,300 Ha dedicadas a la silvicultura, a la ganadería y a la agricultura pueden ser afectadas en mayor o menor grado por la acidez del suelo (López *et al.*, 1994). Este es uno de los factores que limitan el desarrollo de las plantas en algunos suelos de los estados de Chiapas, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Puebla y Tabasco (Aguilar-Noh, 1991).

Formas fitotóxicas del aluminio

El Al se presenta en una gran variedad de complejos. Esto dificulta estudiar los procesos relacionados con el Al en las plantas (Kinraide, 1991). El aluminio (III), el cual se libera de los aluminosilicatos del suelo en condiciones ácidas, se produce en la

forma de aluminio hexahidratado ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ o Al^{3+} para una mayor conveniencia. Esta especie predomina en condiciones ácidas ($\text{pH} < 5$), conforme el pH aumenta se forman el $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ y el $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, mientras que cerca de un pH neutro se forma la fase sólida $\text{Al}(\text{OH})_3$ llamada gibsita. En condiciones alcalinas predomina el $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ o aluminato (Kinraide, 1990). El Al^{3+} se puede unir a diversos ligandos orgánicos e inorgánicos, tales como el PO_4^{3-} , el SO_4^{2-} , el F^- , los ácidos orgánicos, las proteínas y los lípidos (Delhaize y Ryan, 1995). Una especie polinuclear muy tóxica del Al es el $(\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{74}(\text{H}_2\text{O})_{12})^{7+}$ o Al_{13} , el cual se puede formar cuando las soluciones son parcialmente neutralizadas con bases fuertes, no se sabe si se forma de manera natural y si contribuye a la toxicidad en el suelo (Kinraide, 1991).

Una gran variedad de cationes trivalentes son tóxicos para las plantas, y dado que la toxicidad del aluminio está restringida a condiciones ácidas, se asume que el Al^{3+} es la mayor especie fitotóxica. Esto ha sido difícil de demostrar, pues casi todas las especies monoméricas mencionadas han sido consideradas tóxicas en un estudio u otro (Kinraide, 1991). Se ha observado que el Al_{13} y el Al^{3+} son rizotóxicos para el trigo (Parker y Kinraide, 1988) y los hidroxidos de aluminio (excluyendo el aluminato) son rizotóxicos para las dicotiledóneas (Kinraide y Parker, 1990). El aluminato y los complejos que forma el aluminio con el SO_4^{2-} , el F^- y los ácidos orgánicos no son rizotóxicos (Kinraide, 1990; Wright *et al.*, 1989; Hue *et al.*, 1986).

Síntomas de la toxicidad del aluminio

Los síntomas que se producen por el efecto tóxico del aluminio son muy similares a los que se observan cuando existen deficiencias de nutrientes en las plantas (De la Fuente *et al.*, 1997). La inhibición del crecimiento de la raíz es el síntoma principal y el más fácil de reconocer en la toxicidad por el Al. Se ha reportado que en un período de 2 a 6 h, después del inicio de la exposición al Al, se inhiben tanto la división celular como la elongación de la raíz (Takabatake y Shimmen, 1997).

Los síntomas que se producen debido a la toxicidad por el Al pueden dividirse de acuerdo a los períodos de tiempo en que se presentan y a los efectos que producen en la fisiología de la planta.

1.- Efectos a corto y largo plazo

Los efectos a corto plazo de la toxicidad por Al se observan en segundos o minutos y a largo plazo en horas o días después de su adición (Wissemeier *et al.*, 1987).

2.- Efectos sobre el crecimiento

Cuando se mantiene a las raíces en una solución nutritiva que contenga concentraciones micromolares de Al, se puede observar una inhibición en el crecimiento de éstas después de por los menos 60 min, pero generalmente se requieren 4-6 h de exposición al aluminio para observar una inhibición significativa de la mitosis de las células de la raíz y su elongación (Tepper *et al.*, 1989). Generalmente, la inhibición del crecimiento de la raíz tiene severas consecuencias sobre el desarrollo de la planta, resultando finalmente en una disminución en el crecimiento de los brotes, una disminución en la producción de las plantas cultivadas y baja calidad del producto agrícola final (Rengel, 1992).

3.- Efecto sobre la toma de nutrientes

Existe un gran número de reportes en los que se muestra que las raíces y brotes de plantas que se cultivan bajo condiciones de estrés por aluminio, durante períodos extensos de tiempo, tienen disminuidas sus concentraciones de cationes divalentes (especialmente calcio y magnesio) (Jentscke *et al.*, 1991). Sin embargo, se sabe que la absorción de los iones depende no únicamente de la capacidad del sistema para tomarlos, sino del tamaño de la superficie de absorción (Clarkson, 1985). Se ha medido en raíces tratadas con Al la absorción de Ca^{2+} y Mg^{2+} por unidad de área, y se ha observado que este metal reduce directamente la velocidad de la toma de esos nutrientes (Jan, 1991). Por lo tanto, esta concentración disminuida de nutrientes esenciales quizá sea resultado de ambos efectos, de la disminución en la velocidad de la toma de nutrientes y del crecimiento reducido de las raíces (disminución de la superficie de absorción).

4.- Efecto sobre canales de iones

Los iones Al tienen diferentes efectos sobre diversos canales iónicos, por ejemplo: a) inhiben a un canal de K^+ en la membrana plasmática de las células guarda de *Vicia faba* (Schoeder, 1988); b) bloquean a los canales de K^+ en la membrana plasmática de los pelos radiculares de *Zea mays* (Olivetti y Etherton, 1991); c) inhiben el cambio de voltaje de un canal selectivo para aniones, el cual es dependiente del voltaje; este canal se encuentra en la membrana externa mitocondrial de *Neurospora crassa* (Dill *et al.*, 1987). d) Inhiben también el flujo de Ca^{2+} a través de canales de la membrana plasmática de protoplastos de *Amaranthus tricolor* (Rengel y Elliot, 1992); e) activan a un canal selectivo para aniones que se encuentra en el plasmalema de protoplastos aislados de raíces de trigo (Ryan *et al.*, 1997).

TOXICIDAD DEL ALUMINIO A NIVEL CELULAR

Para entender las bases del mecanismo de la toxicidad del Al en las raíces, se requiere tener información acerca del daño que puede ocasionar a nivel de la membrana plasmática o del citosol. Con respecto a la forma Al^{3+} no hay un consenso sobre el sitio celular de su mecanismo de toxicidad. El Al puede unirse a componentes de la pared celular y precipitar; por lo que se esperaría que cruzara muy lentamente la membrana plasmática. Comúnmente la mayoría del Al en la raíz es extracelular y reside en la pared o el mucilago alrededor del ápice de la raíz (Clarkson, 1967). El hecho de que el Al inhiba el crecimiento de la raíz rápidamente y altere ciertos procesos fisiológicos (ej. flujo de Ca^{2+}) en cuestión de minutos (Huang *et al.*, 1992a), a pesar de su aparente lenta absorción, ha llevado a la hipótesis que sugiere que el daño inducido por el Al es en la pared celular; también se ha postulado que el sitio de la toxicidad del Al son los transportadores de iones o diversos eventos de transducción de señales iniciados en la membrana plasmática de la superficie de la raíz (Huang *et al.*, 1992b; Rengel, 1992). Tice y sus colaboradores (1992) usaron un método más directo para cuantificar el Al, tanto el que se encuentra en el espacio extracelular como el citoplasmico en cultivos de trigo resistentes y sensibles al aluminio. Estos investigadores encontraron que los extremos de las raíces de cultivos resistentes al

aluminio acumulaban menos metal en ambas regiones: la extracelular y la citoplasmica, cuando se comparaba con el genotipo susceptible que crecía en la misma solución.

Se ha reportado que un amplio rango de desordenes fisiológicos se producen en las primeras horas de la exposición de raíces intactas de plantas a concentraciones pequeñas de Al. Hasta hace algunos años, las técnicas para estudios microanalíticos no eran lo suficientemente sensibles como para detectar Al a nivel intracelular. Lazof y sus colaboradores (1994) demostraron que el aluminio sí entraba al citoplasma de la célula. Las concentraciones de Al^{3+} intracelular fueron de aproximadamente 70 nmol g^{-1} de peso fresco, en los primeros 30 min de exposición; posteriormente la acumulación fue haciéndose más lenta (Lazof *et al.*, 1994).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los efectos tóxicos del Al en la raíz, pueden involucrar la interacción directa entre el Al y los componentes celulares del citoplasma.

MECANISMOS DE FITOTOXICIDAD DEL ALUMINIO EN EL CITOPLASMA

La toxicidad del Al en el citosol se encuentra disminuida porque en el citoplasma existe un pH de aproximadamente 7.5, la mayor parte del Al monomérico podría existir como $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, que parece no ser tóxico para las células (Kinraide, 1990); también porque existen varios ligandos potenciales en el citoplasma y esto ocasionaría la formación de complejos no tóxicos. Se estima que el Al^{3+} libre en el citoplasma se encuentra en el rango nanomolar o picomolar (Kochian, 1995). Estudios recientes sugieren que concentraciones citoplásmicas de Al en el orden nanomolar o subnanomolar pueden ser tóxicas como resultado de la interacción de Al^{3+} con sitios regulados por Mg^{2+} . Esta posibilidad se da por las similitudes existentes en el tamaño del radio iónico entre el Mg^{2+} y el Al^{3+} , ya que en los sistemas biológicos es más probable que ocurra un desplazamiento del Mg^{2+} por Al^{3+} que las interacciones Al^{3+} - Ca^{2+} (Kochian, 1995). La inhibición por Al^{3+} de procesos dependientes de Mg^{2+} podría alterar un gran número de procesos celulares tales como: los eventos de transducción de señales, aquellos que involucran interacciones con el citoesqueleto y

procesos en los que se encuentran involucradas enzimas que catalizan las reacciones de transferencia de fosfatos.

Interacciones del aluminio con el citoesqueleto

Recientemente, se ha estudiado en raíces de maíz la interacción del Al con el citoesqueleto y se demostró que el sitio de toxicidad del Al se encuentra en la zona de elongación (Blancaflor *et al.*, 1998). En esta región de la raíz el Al produjo una reorganización de los microtúbulos en la corteza interna. La reorganización y la despolimerización de los microtúbulos de la corteza externa inducidos por auxina y por frío, respectivamente, fueron bloqueados cuando se realizó un pretratamiento de las raíces con Al. Estos resultados sugieren que el Al incrementa la estabilidad de los microtúbulos en estas células; este efecto estabilizador del Al en la corteza externa coincide con la inhibición del crecimiento. También se observó una reorientación de los microfilamentos en las raíces tratadas con Al, y el pretratamiento con este metal minimiza la fragmentación de los microfilamentos inducida por citocalasina B. Estos resultados muestran que existe una relación entre la toxicidad del Al y la reorganización y estabilización del citoesqueleto en las raíces de maíz (Blancaflor *et al.*, 1998).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en células animales, en los cuales se ha observado que los desordenes neurológicos inducidos por el Al^{3+} se encuentran asociados frecuentemente con defectos del citoesqueleto. Estos resultados demostraron que el Al^{3+} induce fuertemente el ensamble de tubulina en los microtúbulos e inhibe la subsecuente despolimerización inducida por Ca^{2+} (MacDonald *et al.*, 1987).

Los bajos niveles de Al^{3+} encontrados en el citoplasma de la célula podrían ser suficientes para romper la dinámica que existe entre la formación de los microtúbulos y su desensamblaje, lo cual podría resultar en disfunción celular.

Interacciones con calmodulina

Siegel y Haug (1983) sugirieron que un blanco primario para la toxicidad por Al podría ser la proteína que une Ca^{2+} , la calmodulina. La hipótesis está basada en un trabajo del laboratorio de Haug en el cual se examinó el efecto del Al^{3+} sobre la estructura de la calmodulina, utilizando diferentes técnicas, tales como la espectroscopía de dicroísmo circular, la fluorescencia y la resonancia magnética nuclear. Se llegó a la conclusión de que el Al^{3+} se une estequiométricamente a los sitios de unión a Ca^{2+} en la calmodulina con una afinidad 10 veces mayor que el mismo Ca^{2+} . La unión del Al^{3+} ocasionaba cambios conformacionales en la calmodulina dando como resultado una inhibición de su capacidad para regular otras proteínas. Sin embargo, años más tarde, You y Nelson (1991) repitieron los estudios de Siegel y Haug (1983) y no encontraron ningún efecto del Al^{3+} sobre la estructura de la calmodulina a pH 5.5 o 6.5, concluyendo que el aluminio no interactúa con la calmodulina a valores de pH relevantes a nivel fisiológico.

Interacciones del aluminio con procesos de transducción de señales

Hasta ahora solamente se han realizado extensas investigaciones en el campo médico, que han llevado a sugerir que el mecanismo celular de la toxicidad del Al podría involucrar interacciones entre este metal y los componentes de la vía de transducción de señales de los fosfoinosítidos. Esta vía ha sido bien caracterizada en células animales (Berridge, 1993) y empieza a ser entendida en plantas (De los Santos-Briones *et al*, 1997). No todos los componentes de la vía de los fosfoinosítidos han sido identificados en plantas, pero esta vía de transducción de señales existe en las células vegetales. El efecto del Al sobre la vía de los fosfoinosítidos en plantas podría ser objeto de futuras investigaciones.

SEÑALES DE TRANSDUCCION Y SEGUNDOS MENSAJEROS

Todos los organismos vivos reaccionan a señales de su medio ambiente para poder sobrevivir y adaptarse a sus condiciones de vida. En los organismos multicelulares es necesaria la comunicación intercelular; esta comunicación puede lograrse a través de un contacto directo célula-célula, a través de la unión de "moléculas señal" a la membrana plasmática de la célula, o en el caso de células animales a través de la formación de uniones "gap" cuando se trata de células vecinas (Loewenstein, 1987). Sin embargo, cuando se trata de células distantes, éstas se comunican a través de la secreción de mensajeros químicos. Algunas moléculas extracelulares, entre las que se incluyen las hormonas, los factores del crecimiento, los neurotransmisores y otros agonistas, se unen a receptores específicos que se localizan en la superficie externa de la célula. La unión agonista-receptor inicia la producción de segundos mensajeros.

Una gran cantidad de señales extracelulares son transmitidas a través de la membrana plasmática por una gran variedad de mecanismos que usan moléculas como segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros, una vez formados, inducen reacciones intracelulares que regulan una serie de procesos, tales como el metabolismo, la secreción, el crecimiento celular, etc., (Berridge, 1993). Los mecanismos de transducción en animales han sido ampliamente estudiados, mientras que los estudios en células vegetales apenas comienzan. Los segundos mensajeros más ampliamente estudiados a la fecha son el AMPc, el GMPc, los iones Ca^{2+} , el 1, 2-diacilglicerol (DAG) y el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) (Lodish *et al.*, 1995).

FOSFOLIPASA C (PLC) EN ANIMALES

El fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP_2) es un importante componente de diversas vías de señales intracelulares. Sirve como sustrato para la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual lo hidroliza y genera dos productos: el 1, 2-diacilglicerol (DAG) y el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) (Fig. 1). Ambos compuestos son de gran importancia como segundos mensajeros. El IP_3 es soluble en agua y difunde rápidamente a través del citosol,

mientras que el diacilglicerol es un lípido insoluble y permanece en la membrana (Gross *et al.*, 1993). El IP_3 produce un incremento transitorio en el calcio citosólico por apertura de canales de calcio; esta función la realiza por medio de su unión a receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico. El diacilglicerol activa a una proteína cinasa dependiente de calcio conocida como proteína cinasa C (Gross *et al.*, 1993). La proteína cinasa C fosforila residuos de serina o treonina de proteínas blanco específicas, regulando sus actividades catalíticas o estructurales. Esta función de hidrólisis y generación de segundos mensajeros convierte a la PLC en una enzima importante en la transducción de señales mediada por receptores (Berridge, 1993).

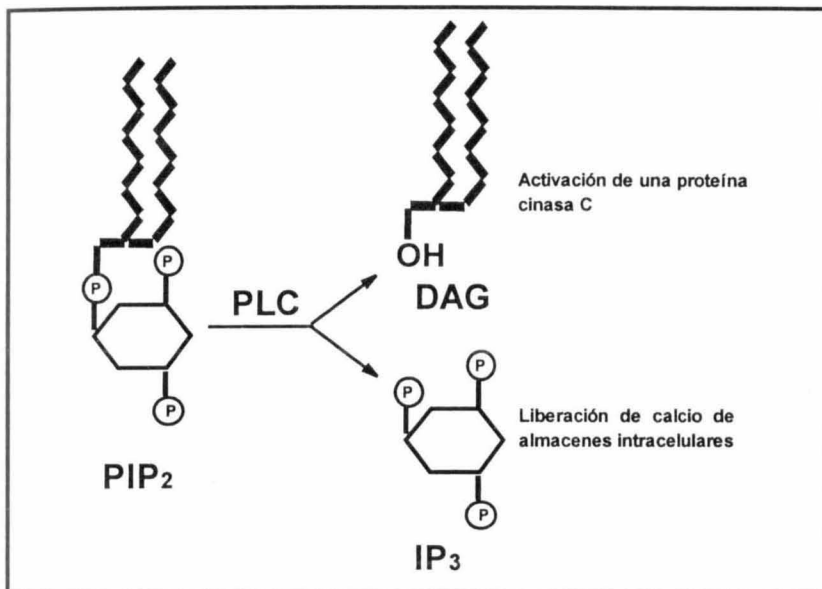


Fig. 1. Reacción de hidrólisis del PIP_2 . La PLC cataliza esta hidrólisis para generar dos segundos mensajeros: el DAG que permanece en la membrana y activa a una proteína cinasa C y el IP_3 que es liberado al citosol e interactúa con receptores intracelulares y moviliza iones de calcio de los almacenes intracelulares [Adaptado de Alberts *et al.*, 1994].

Isoenzimas

La PLC comprende una familia diversa de enzimas que difieren en su estructura y distribución en los tejidos. Son proteínas monoméricas y pueden ser divididas en tres

tipos (β , γ y δ) sobre las bases de su tamaño y secuencia de aminoácidos. Cada grupo se divide a su vez en subgrupos, que son designados por la adición de un número arábigo después de la letra griega (Rhee y Bae, 1997). La tipo β incluye cuatro enzimas de mamíferos (PLC- β 1, PLC- β 2, PLC- β 3 y PLC- β 4), la tipo γ incluye dos enzimas (la PLC- γ 1 y la PLC- γ 2) y la tipo δ incluye cuatro enzimas (PLC- δ 1, PLC- δ 2, PLC- δ 3 y la PLC- δ 4) (Singer *et al.*, 1997).

En células animales se han purificado a homogeneidad varias isoformas de la PLC; también se han clonado cDNAs de una gran variedad de tejidos y especies, esto es lo que ha permitido la identificación de las isoenzimas antes mencionadas (Rhee y Bae, 1997).

Características estructurales

La secuencia de aminoácidos de las isoenzimas de PLC es relativamente variable con la excepción de dos regiones altamente conservadas, identificadas como los dominios X (~170 aminoácidos) y Y (~260 aminoácidos), que aparentemente constituyen el sitio catalítico. La similitud en la secuencia de aminoácidos entre estos dominios es ~ 40 y 60%, respectivamente, entre las isoenzimas; la similitud es mayor cuando se comparan las PLC del mismo tipo (Rhee y Bae, 1997). La secuencia entre los dominios X y Y es corta en las isoenzimas β y δ (Fig.2). En las isoenzimas tipo γ esta región es mucho más grande y contiene los dos dominios Src homology 2 (SH2) y un dominio Src homology 3 (SH3) (Singer *et al.*, 1995).

Todas las isoenzimas poseen una región aminoterminal de ~300 aminoácidos que precede a la región X y que contiene el dominio de Homología a Pleckstrina (PH). El dominio PH es una región de ~100 aminoácidos presente en numerosas proteínas de diversas funciones. Hasta la fecha se han identificado varios ligandos capaces de unirse a proteínas que contienen el dominio PH, entre éstos se incluye al PIP_2 y las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas (Parker *et al.*, 1994). También poseen dos módulos accesorios, un dominio EF-hand y un dominio C2 (Fig.2); el primero posee cuatro sitios de unión a Ca^{2+} y el segundo se ha sugerido que participa

en la unión a las vesículas lipídicas; esta unión es dependiente de Ca^{2+} (Rhee y Bae, 1997).

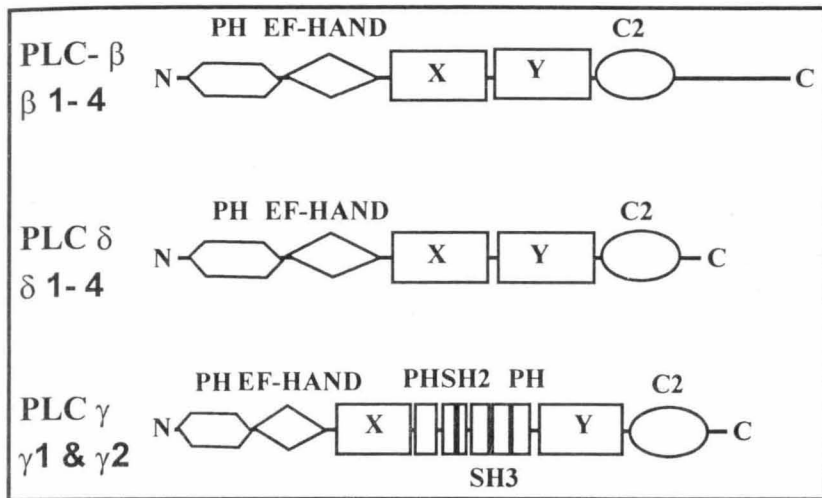


Fig. 2 Representación lineal de los diferentes dominios identificados en las tres familias de la PLC. Se indican los dominios catalíticos X e Y, así como los dominios PH, EF-hands, C2 y SH (SH2 y SH3) [Adaptado de Rhee y Bae, 1997].

Mecanismos de activación

Las isoformas de PLC pueden ser activadas por diferentes mecanismos. La activación de las enzimas tipo γ se lleva a cabo por mecanismos de fosforilación. Esta fosforilación la realizan cinasas de tirosina. Se produce por medio del enlace de estas cinasas con la enzima, a través de los dominios SH2. Las isoenzimas tipo β son activadas como resultado de un enlace entre las subunidades α de una proteína G clase G_q y la región carboxilo terminal, o del enlace de las subunidades $\beta\gamma$ a través del dominio PH. Aún no se conoce muy bien el mecanismo de regulación de las PLC δ , pero recientemente se han propuesto dos mecanismos para la regulación de estas isoenzimas (Singer *et al.*, 1997). En uno de estos mecanismos se propone que la regulación es por una proteína G, denominada G_{11} , la cual se demostró recientemente que estimula la actividad de la PLC $\delta 1$. Se ha sugerido un segundo mecanismo, en el

cual se propone que la regulación de la actividad enzimática está a cargo de un polipéptido que tiene homología con las proteínas Rho-GAP. Se ha demostrado que este polipéptido puede estimular la actividad de la PLC $\delta 1$, pero no a la PLC $\beta 1$ o a la PLC $\gamma 1$ (Rhee y Bae 1997).

Todas las isoenzimas son activadas por Ca^{2+} *in vitro*, pero las isoenzimas PLC δ son más sensibles a Ca^{2+} cuando se comparan con las otras isoenzimas. Además, la PLC δ , puede anclarse a las membranas que contienen PIP_2 por medio del dominio PH, en ausencia de otras señales. Un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} a un nivel suficiente para fijar el dominio C2 de la PLC δ , podría por lo tanto, llevar a su activación. Esta activación de las isoenzimas de PLC δ , puede ocurrir de forma secundaria a la activación de otras isoenzimas de PLC (a través de un receptor) o podría ser resultado de la activación de canales de Ca^{2+} (Rhee y Bae, 1997).

PLC EN PLANTAS

La PLC está presente también en tejidos vegetales; en los últimos años han aparecido reportes de su actividad en varios sistemas vegetales (Yotsushima *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1995). A la fecha, se han identificado en células vegetales dos tipos de PLC específica para fosfolípidos de inositol: una soluble y la otra asociada a la membrana. Las formas solubles hidrolizan preferencialmente PI y requieren concentraciones milimolares de Ca^{2+} . Las actividades asociadas a la membrana tienen como sustratos al PIP y al PIP_2 y necesitan concentraciones micromolares de Ca^{2+} para su activación (Yotsushima *et al.*, 1992).

También se ha reportado la clonación de genes que codifican para la PLC en plantas. En *Arabidopsis thaliana* se han clonado tres genes: a) un gen que codifica para una PLC específica para PI y que es inducido bajo condiciones de estrés salino y deshidratación (Hirayama *et al.*, 1995); b) un gen que exhibe un alto grado de similitud de secuencia con los genes de la PLC- δ de animales (Yamamoto *et al.*, 1995); c) un gen de *A. Thaliana* que codifica para una PLC específica para PI que es expresado

constitutivamente y cuyo RNAm fue detectado tanto en tejido vegetativo como floral, este gen presenta homología con la PLC δ de animales (Hirayama *et al.*, 1997). Se ha clonado un gen de soya, que codifica para una PLC específica para PI y que presenta una alta homología con la PLC δ de animales (Shi *et al.*, 1995). Recientemente, se ha reportado la clonación de tres genes de *Solanum tuberosum* que codifican para tres diferentes isoformas de PI-PLC. Los tres genes se expresan en hojas, flores y raíces de papa (Kopka *et al.*, 1998).

INTERACCION DEL ALUMINIO CON PROCESOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES

Haug y colaboradores (1994) realizaron estudios sobre el mecanismo de toxicidad del aluminio con procesos de transducción de señales en células animales. Estos estudios sostienen la hipótesis de que las interacciones de los iones de aluminio con los elementos de las vías de transducción de señales son eventos primarios en las células afectadas por dicho ión. Los resultados de los estudios realizados en células de neuroblastoma sobre la interacción de la vía de los fosfoinosítidos y el Al^{3+} , han sugerido que las proteínas G y una PLC específica para PIP_2 son los elementos de la vía con los que interactúa este ión. Se observó que el Al^{3+} disminuye la acumulación de fosfatos de inositol, principalmente el IP_3 . La formación de IP_3 también se encuentra disminuida en células pretratadas con aluminio, aún en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} ; estos resultados sugieren que el aluminio tiene como blancos a la proteína G_p y/o a la fosfolipasa C específica para PIP_2 , ya que estos dos componentes son cruciales para la formación de IP_3 (Shi y Haug 1992). La interacción con la proteína G_p posiblemente se lleve a cabo en el sitio de unión al Mg^{2+} (Haug *et al.*, 1994). El Al^{3+} no parece unirse al IP_3 e inactivarlo directamente (Kochian, 1995).

En células vegetales se ha estudiado el efecto del Al sobre el IP_3 ; al aplicar exógenamente Al (50 μM) en raíces de trigo se observó que se inhibe rápidamente el crecimiento de estas. La actividad de la PLC fue medida en membranas microsomales directamente en presencia de tricloruro y citrato de aluminio, ambos compuestos inhibieron la actividad enzimática de la PLC de una manera dependiente de la dosis y

a concentraciones fisiológicamente relevantes de Al (Jones y Kochian, 1995). La exposición al Al no tiene efectos sobre la desfosforilación del IP_3 ; tampoco afectó a otras enzimas que se aislaron de las raíces de trigo. Esto sugiere que la PLC podría ser un blanco para el mecanismo de toxicidad del Al. Esto pudiera tener profundos efectos sobre la división y la elongación celular, porque se está impidiendo la formación de IP_3 . El IP_3 es un mediador de la elevación transitoria de Ca^{2+} , la cual es necesaria para continuar los eventos de crecimiento celular. También podría estar interfiriendo con la dinámica del citoesqueleto, la cual depende de la presencia de IP_3 y de PIP_2 (Jones y Kochian, 1995).

PLC EN *Catharanthus roseus*

Se ha logrado un avance importante en el estudio de la enzima PLC usando como modelo las raíces transformadas de *C. roseus*. Dentro de los antecedentes más importantes se pueden citar los siguientes:

a) Se ha encontrado actividad de PLC tanto en fracciones solubles como membranales. La actividad de la fracción soluble es mayor en el día dos del crecimiento de las raíces. En el caso de la actividad encontrada en la fracción membranal la actividad más elevada se encontró en el día seis (De los Santos Briones *et al.*, 1997).

b) La enzima es dependiente de la concentración de Ca^{2+} , la PLC citosólica así como la membranal se activaron de una manera dependiente de la dosis. La actividad soluble se activó hasta una concentración máxima de 100 μM . Mientras que la actividad membranal fué activada hasta una concentración máxima de 360 μM ; concentraciones mayores ejercen un efecto de inhibición sobre la actividad enzimática (De los Santos-Briones *et al.*, 1997).

c) Se ha medido el efecto de los cambios en el pH sobre la actividad de la PLC y se ha observado que para la actividad de la fracción membranal el pH óptimo es de 6.8, mientras que en la fracción citosólica se encuentran dos picos de máxima actividad uno a pH 6.0 y el otro a 6.8 (Hernández-Sotomayor *et al.*, 1997).

d) Se observó también una inhibición de la actividad enzimática en experimentos en los cuales se estudió el efecto de diferentes concentraciones de sulfato de neomicina, poliaminas y diferentes cationes sobre la actividad de la PLC de ambas fracciones: citosólica y membranal (Piña-Chable *et al.*, 1998).

e) En estudios inmunológicos se encontró que anticuerpos monoclonales contra la PLC δ y anticuerpos policlonales contra la PLC γ de animales reconocen a la PLC de *C. roseus* (Piña-Chable, 1997).

f) En presencia de distintos activadores de proteínas G, tales como iones de flúor, magnesio, nucleótidos de guanina, mastoparín y ácido indolacético se observaron diferentes efectos sobre la actividad de la PLC *in vitro*; en algunos casos la regulación fue de tipo inhibitorio y en otros de tipo estimulatorio. Al parecer, la regulación de la actividad de la PLC *in vitro*, se lleva a cabo a través de proteínas G sensibles a la toxina del cólera, pero insensibles a la toxina pertussis (Suárez-Solis *et al.*, 1999).

Modelo experimental: raíces transformadas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

C. roseus es una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia Apocynaceae, originaria de Madagascar. Esta planta ha sido de las más estudiadas, debido a que se han aislado más de 200 alcaloides de diferentes partes de la planta, varios de ellos son de importancia en la industria farmacéutica. Los más importantes son la vinblastina y la vincristina que poseen propiedades antileucémicas; la ajmalicina que se utiliza como antihipertensivo y la serpentina que se usa como sedante. El interés por incrementar la producción de estos metabolitos ha llevado a buscar métodos alternativos para su obtención (Van der Heijden *et al.*, 1989); como son los cultivos de raíces transformadas.

Actualmente, la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán cuenta con varios cultivos de *C. roseus*. Uno de éstos es la línea J1. Esta línea de raíces se obtuvo a partir de la infección de hojas con *Agrobacterium rhizogenes* (bacteria gram negativa del suelo) (Ciau-Uitz *et al.*, 1994), y ya ha sido caracterizada en cuanto a crecimiento y producción de alcaloides.

Los cultivos de raíces transformadas tienen varias ventajas, como son: a) su capacidad para producir una gran cantidad de biomasa, b) el hecho de tener un alto nivel de estabilidad, tanto a nivel genético como a nivel bioquímico, c) es un modelo en el cual ya se ha generado información muy valiosa sobre la actividad de PLC (De los Santos-Briones *et al.*, 1997; Hernández-Sotomayor., *et al* 1997; Piña-Chable *et al.*, 1998; Suárez-Solis *et al*, 1999). El hecho de conocer el comportamiento de la actividad enzimática, el conocer algunos factores que modulan su actividad y el hecho de tener caracterizado el cultivo permitirá avanzar más rápido en los estudios a realizar.

Conclusiones

Teniendo como base que existe una interacción entre la vía en la que participa esta enzima y el Al^{3+} , el objetivo de este trabajo fué estudiar el efecto del aluminio sobre la actividad de la PLC y sobre el crecimiento de las raíces transformadas de *C. roseus* línea J1.

HIPÓTESIS

En estudios realizados en células animales se ha demostrado que existe una interacción entre el aluminio y la vía de transducción de señales en la cual participa la enzima PLC. Por lo cual se ha sugerido que el mecanismo de toxicidad del Al involucra una interacción entre esta enzima y el metal. Entonces, esta interacción podría estarse produciendo también en las células vegetales y el Al debe afectar la actividad de la PLC.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar los efectos del aluminio sobre el crecimiento de las raíces transformadas de *C. roseus* línea J1 y sobre la actividad de la PLC en las raíces transformadas de *C. roseus* en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

I) Documentar el efecto de diferentes concentraciones de Al y periodos de incubación con el Al sobre la actividad de PLC *in vitro*.

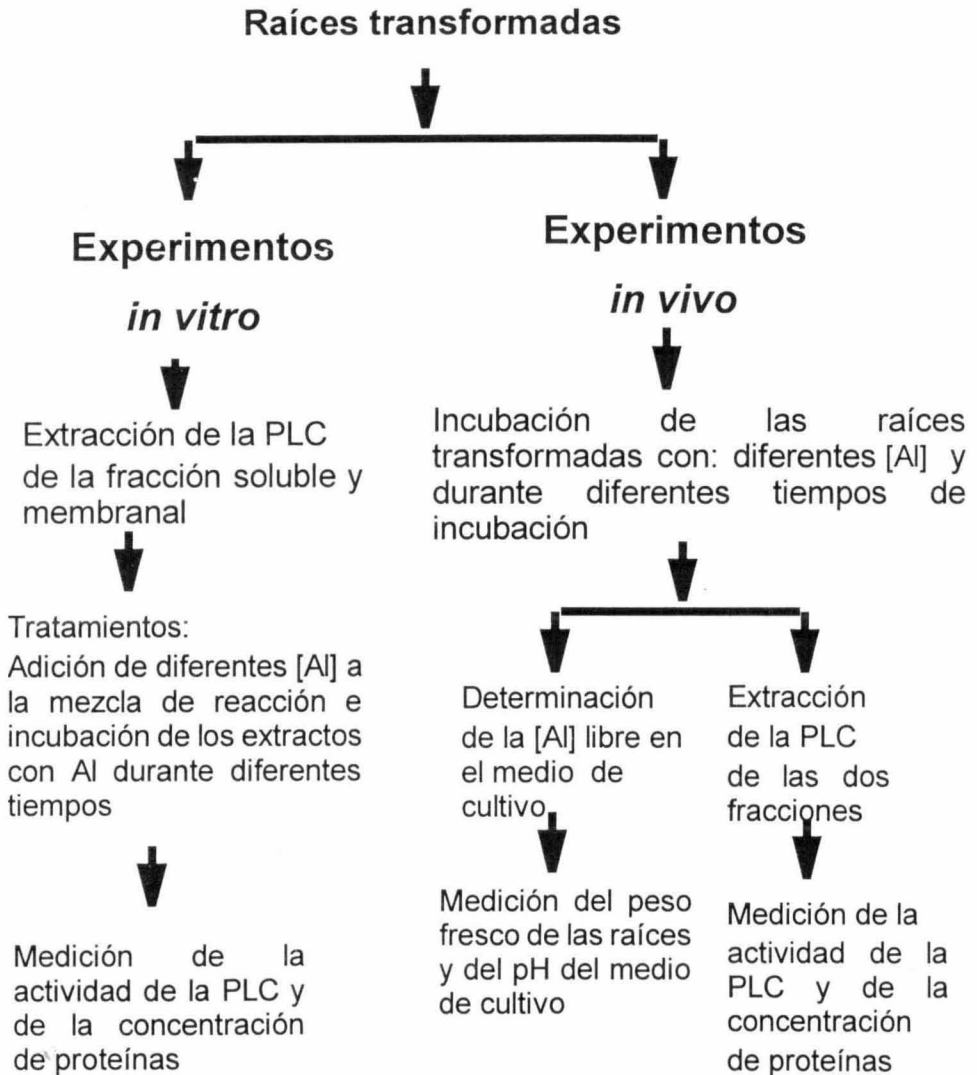
II) Cuantificar las concentraciones de Al libre en el medio de cultivo.

III) Documentar el efecto de diferentes periodos de incubación con Al sobre la actividad de PLC *in vivo*.

IV) Medir el efecto de diferentes concentraciones de Al sobre el crecimiento de las raíces transformadas y sobre la actividad de PLC durante el ciclo de crecimiento de las raíces.

V) Medir el efecto del cambio en el pH sobre la actividad de la PLC *in vivo* y sobre el crecimiento de las raíces.

DISEÑO EXPERIMENTAL



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilar-Noh, A. (1991) La acidez del suelo y su fertilidad. En Memorias del primer seminario sobre manejo de suelos tropicales en Chiapas. Impreso por el CIES, pp. 40-45
- Alberts B., Bray D., Lewis, J. y Raff, M. (1994) Cell signalling. En Molecular Biology of the Cell. Garland publishing Inc. pp. 721-734
- Berridge, M. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325
- Blancaflor, E., Jones, D. y Gilroy, S. (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* **118**: 159-172.
- Ciau-Uitz, R., Miranda-Ham, L., Coello-Coello, J., Chi, B., Pacheco, L. y Loyola-Vargas, V. (1994) Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30**: 84-88
- Clarkson, D. (1967) Interactions between aluminum and phosphorus on root surfaces and cell wall material. *Plant Soil* **27**: 347-56
- Clarkson, D. (1985) Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 77-115
- Cocker, M., Evans, D., y Hodson, M. (1998) The amelioration of aluminum toxicity by silicon in wheat (*Triticum aestivum* L.): malate exudation as evidence for an *in planta* mechanism. *Planta* **204**: 318-323
- De la Fuente, J., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J. y Herrera-Estrella, L. (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**: 1566-1568
- Delhaize, E. y Ryan, P. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in Plants. *Plant Physiol* **107**: 315-321
- De los Santos-Briones, C., Muñoz-Sánchez, J., Chin-Vera, J., Loyola-Vargas, M. y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate - Phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.* **150**: 707-713
- Dill, E., Holden, M. y Colombini, M. (1987) Voltage gating in VDCA is markedly inhibited by micromolar quantities of aluminum. *J. Memb. Biol.* **99**: 187-196
- Gross W. y Boss W. (1993) Inositol phospholipids and signal transduction. En Control of Plant Gene Expression. DPS Verna, ed., CRC Press, Boca Ratón pp. 17-32
- Foy, C., Chandel, R. y White, M. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**: 511-66

- Hartwell, B. y Pember, F. (1918) The presence of aluminum as a reason for the difference in the effect of so-called acid soil on barley and rye. *Soil Sci.* **6**: 259-281
- Haug, A. (1984) Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **1**: 345-373
- Haug, A., Shi, B. y Vitorello, V. (1994) Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* **68**: 1-7
- Hernández-Sotomayor, S.M.T., De los Santos-Briones, C., Muñoz-Sánchez, J., Piña-Chable, M. y Loyola-Vargas, V. (1997) Phospholipase C in *Catharanthus roseus* transformed roots. En *Radical biology: Advances and perspectives on the function of plant roots*. Amer. Soc. Plant. Physiologist. **18**: 138-141
- Hirayama, T., Hadjuk P., Yoon H. y Fesik S. (1995). Inositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 3903-3907.
- Hirayama, T., Mitsukawa, N., Shibata, D. y Shinozaki, K. (1997) AtPLC2, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues. *Plant Mol. Biol.* **34**: 175-180
- Huang, Ch., Tate, B., Crain, R. y Coté, G. (1995) Multiple phosphoinositide-specific phospholipases C in oat roots: characterization and partial purification. *Plant J.* **2**: 257-267
- Huang, J., Grunes, D. y Kochian, L. (1992a) Aluminum effects in the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. Quantification of calcium fluxes using a calcium-selective vibrating microelectrode. *Planta* **188**: 414-21
- Huang, J., Shaff, J., Grunes, D. y Kochian, L. (1992b) Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* **98**: 230-37
- Hue, N., Craddock, G. y Adams, F. (1986) Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Am. J.* **50**: 28-34
- Jan, F. (1991) Aluminum effects on growth, nutrient uptake and transport in 3 rice (*Oryza sativa*) cultivars with different sensitivity to aluminum. *Physiol. Plant.* **83**: 441-448
- Jenschke, G., Schelegel, H. y Godbold, D. (1991) The effect of aluminum on uptake and distribution of magnesium and calcium in roots of mycorrhizal Norway Spruce seedlings. *Physiol. Plant.* **82**: 266-270
- Jones, D. y Kochian, L. (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *Plant Cell* **7**: 1913-1922
- Kinraide, T. (1990) Assessing the rhizotoxicity of the aluminate ion, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$. *Plant Physiol.* **93**: 1620-25
- Kinraide, T. (1991) Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* **134**: 167-178

- Kinraide, T. y Parker, D. (1990) Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxi-aluminum to four dicotyledons species. *Physiol. Plant.* **79**: 283-288
- Kochian, L. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **46**: 237-60
- Kopka, J., Pical, Ch., Gray, J. y Müller-Röber, B. (1998) Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* **116**: 239-250
- Lazof, D., Goldsmith, J., Rufty, T. y Linton, R. (1994) Rapid uptake of aluminum into cells of soybean root tips. *Plant Physiol.* **103**: 1107-1114
- Lodish, H., Baltimore, D. y Berk, A. (1995) Cell to cell signalling: hormones and receptor. En *Molecular Cell Biology*, Ed. Scientific American Book, Inc. pp. 853-920
- López, W., González, D. y Casas, E. (1994) Socioeconomic aspects of acid soil management: the case of southeast Mexico. En *Memorias del 15th World Congress of Soil Science*. Impreso por el INEGI y el CNA (México) **5a**: 520-535
- Loewenstein, W. (1987) The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell.* **48**: 725-726
- MacDonald, T., Humphreys, W. y Martin, R. (1987) Promotion of tubulin assembly by aluminium ion in vitro. *Science* **236**: 183-186
- Marschner, H. (1995) Beneficial mineral elements. En: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Second ed., Academic Press. pp. 433-434
- Olivetti, G., y Etherton, B. (1991) Aluminum interactions with corn root plasma membrane. *Plant Physiol.* **96** (Suppl.) 142
- Parker, P., Hemming, B. y Greshik, P. (1994) PH domains and phospholipases a meaningful relationships. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 54-55
- Parker, D. y Kinraide, T. (1988) Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxi-aluminum solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**: 438-444
- Piña-Chable, M., De los Santos-Briones, C., Muñoz-Sánchez, J., Echeverría, I. y Hernandez-Sotomayor, S. (1998) Effect of different inhibitors on phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Prostagl. Other Lip. Med.* **56**: 19-31
- Piña-Chable, M. (1997) Tesis: Caracterización bioquímica de la fosfolipasa C en raíces transformadas de *C. roseus*. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán; Mérida, Yucatán, México.
- Rhee, S. y Bae, Y. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**: 15045-15048
- Rengel, Z. (1992) Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol.* **121**: 499-513
- Rengel, Z. y Elliot, D. (1992) Mechanism of Al inhibition of net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant. Physiol.* **98**: 632-638
- Ryan, P., Skerret, M., Findlay, G., Delhaize, E. y Tyerman, S. (1997) Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6547-6552

- Schroeder, J.** (1988) K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *J. Gener. Physiol.* **92**: 667-683
- Shi, B. y Haug, A.** (1992) Aluminum interferes with signal transduction in neuroblastoma cells. *Pharmacol. Toxicol.* **71**: 308-313
- Shi, J., Gonzales, R. y Bhattacharyya, M.** (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J.* **8**: 381-390.
- Siegel, N. y Haug, A.** (1983) Aluminum interaction with calmodulin: evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochem. Biophys. Acta* **744**: 36-45
- Singer, W., Brown, A. y Sternweis, P.** (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and Phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 475-509
- Suárez-Solis, V., Carrillo-Pech, M., Muñoz-Sánchez, J., Coria-Ortega, R. y Hernández-Sotomayor, S.** (1999) Presence of guanine-nucleotide-binding proteins in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Physiol. Plant.* **105**: 593-599.
- Takabatake, R., y Shimmen, T.** (1997) Inhibition of electrogenesis by aluminum in characean cells. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1264-1271
- Tepper, H., Yang, C. y Shadle, M.** (1989) Effect of aluminum on growth of root tips on honey locust and loblolly pine. *Env. Exp. Bot.* **29**: 165-173
- Tice, K., Parker, D. y De Mason, D.** (1992) Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum intoxicated wheat. *Plant Physiol.* **100**: 309-18
- Van der Heijden, R., Verpoorte, R. y Hoopen, H.** (1989) Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 294-298
- Wissemeier, A., Klotz, F. y Horst, W.** (1987) Aluminum induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.) *J. Plant. Physiol.* **129**: 487-492
- Wright, R., Baligar, V., Ritchey, K. y Wright, S.** (1989) Influence of soil solution aluminum on root elongation of wheat seedling. *Plant Soil* **113**: 294-298
- Yamamoto, Y., Conkling, M., Sussex, I. e Irish, V.** (1995). An *Arabidopsis* cDNA related to animal phosphoinositide-specific phospholipase C genes. *Plant Physiol.* **107**: 1029-1030.
- Yotsushima, K., Nakamura, K., Mitsui, T. e Igami, I.** (1992) Purification and characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in suspension-cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1247-1251.
- You, G. y Nelson, D.** (1991) Al³⁺ versus Ca²⁺ ion binding and tyrosine spin-labeled bovine brain calmodulin. *J. Inorg. Biochem.* **41**: 283-91

CAPITULO II

Determinación de la concentración de Al^{3+} en el medio de cultivo de las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*

María Luisa Piña-Chable y S. M. Teresa Hernández-Sotomayor

Palabras claves

Aluminio, morín, *Catharanthus roseus*

Abreviaturas

Al, aluminio; morín, 3, 5, 7, 2', 4'-pentahidroxiflavona; DMSO, dimetilsulfóxido

RESUMEN

El Al en solución, puede formar numerosos complejos, esto puede conducir a estimaciones erróneas al medir su concentración en la célula (Kinraide, 1991). Esto a provocado que se desarrollen varias metodologías para su cuantificación. Un método involucra el uso del morín, un flavonoide que al unirse al Al^{3+} emite fluorescencia en un pico de 510 nm (Vitorello y Haug, 1997). En el presente estudio se realizaron experimentos para demostrar que el morín se une específicamente al Al^{3+} . Se midió la concentración del Al^{3+} en medios de cultivo con raíces de 3 y 7 días de crecimiento. Se observó que la concentración de Al^{3+} disminuye conforme aumenta el período de incubación de las raíces con el $AlCl_3$ (0.1 mM). Estos resultados señalan al morín como un método específico y sensible para la determinación de Al^{3+} .

INTRODUCCION

La mayor parte de las dificultades en la interpretación de los estudios sobre los efectos tóxicos del Al se deben a la gran variedad de complejos que este metal puede formar (Kinraide, 1991). La precipitación de los hidróxidos que forma el Al, especialmente en la pared celular (Clarkson, 1967), pueden resultar en estimaciones erróneas de su entrada a la célula. Este fenómeno ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías para su detección. Idealmente, un buen método para detectar Al permite la cuantificación y la localización intracelular de este metal, con alta sensibilidad y resolución. En la mayoría de los estudios para detectar y/o localizar al Al en las células, se han usado los microanálisis con rayos X y más recientemente la espectrometría de masa iónica (Lazof *et al.*, 1994). Estas técnicas requieren instrumentos costosos y una compleja preparación de las muestras (Vitorello, 1997).

Un método alternativo involucra el uso de un flavonoide, llamado morín (3, 5, 7, 2', 4'-pentahidroxiflavona) (Fig. 3). Con un límite de detección en la concentración de $[Al^{3+}]$ de 0.4 μM . Este reactivo fluorescente se utiliza en química analítica y también ha sido utilizado en estudios histoquímicos para localizar al Al en las células (Browne *et al.*, 1990). El morín se utiliza como una técnica cuantitativa, ya que al preparar una curva patrón, se puede determinar la concentración del Al libre en las soluciones acuosas.

El objetivo del presente estudio fué determinar la concentración del Al libre en el medio de cultivo de las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. Las raíces fueron de dos diferentes días del ciclo de cultivo y se incubaron durante diferentes períodos de incubación con $AlCl_3$ 0.1 mM.



MATERIALES Y METODOS

Reactivos

El morín (3, 5, 7, 2', 4'-pentahidroxiflavona) es de Sigma (PM 302.2). Es un flavonoide que al unirse al Al^{3+} emite fluorescencia. El pico de absorción es de 440 nm y el de emisión es de 510 nm.

Experimento para medir la interacción del morín con el Al a diferentes pH

Se prepararon dos soluciones de $AlCl_3$ en dos concentraciones (0.1 mM y 1 mM). A estas soluciones se les ajustó sus valores de pH (rango de 4-9) con KOH 1 M. Posteriormente se les agregó el morín en dos concentraciones de (0.1 y 1 mM), en relación con la concentración de $AlCl_3$. Se midió la emisión de fluorescencia a 510 nm, en un fluorómetro modelo 111, de la marca Turner. Los resultados se graficaron como emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias contra los diferentes valores de pH.

Experimentos de cuantificación de Al^{3+}

El morín se preparó a una concentración de 0.1 M en DMSO. El pico de absorción es de 440 nm y el de emisión es de 510 nm. Para cada uno de los experimentos de cuantificación se preparó una curva patrón. Las curvas patrón se obtuvieron de la siguiente manera. Se prepararon soluciones de $AlCl_3$ de varias concentraciones (0 a 0.1 mM), posteriormente se les adicionó el morín en una concentración de 0.1 mM en el volumen final (4 ml). Se midió la fluorescencia en unidades arbitrarias. Los resultados se graficaron como la emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias contra las concentraciones de $AlCl_3$ (0 a 0.1 mM). La relación entre la concentración del $AlCl_3$ y la emisión de fluorescencia fue lineal. El coeficiente de correlación (r) fué de 0.998.

El $AlCl_3$ 0.1 mM se adicionó al medio de cultivo con raíces de 3 y 7 días de crecimiento, se incubó durante diferentes periodos de tiempo (0 a 120 min). Se separó el medio de cultivo de las raíces a los 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 min.

Posteriormente se tomaron alicuotas de estos medios (4 ml) y se les adicionó el morín (0.1 mM, en el volumen final), se midió la emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias. Posteriormente, tomando en cuenta el factor de dilución y la curva patrón se obtuvo la concentración del Al libre en el medio de cultivo. Los resultados se graficaron como la concentración del Al^{3+} en contra del tiempo de incubación (min).

RESULTADOS

Interacción del morín con el Al a diferentes valores de pH

Este experimento se realizó para demostrar que el morín solo se une al Al^{3+} . Los resultados obtenidos en este experimento muestran que efectivamente el morín sólo reacciona con el Al^{3+} , pues conforme se aumenta el pH y se van formando diferentes complejos del Al la fluorescencia disminuye (Fig. 4, panel A y B).

Estos ajustes de pH tuvieron el proposito de que el Al formara diferentes complejos (hidróxidos) con esta sustancia. De esta manera el Al no se encontraba en su forma libre (Al^{3+}) en la solución, pues conforme aumentó el pH se formaron un mayor número de complejos entre el Al y el KOH.

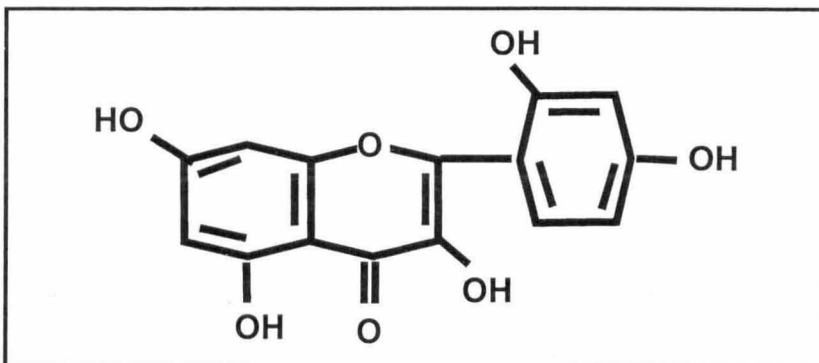


Fig. 3. Estructura del Morín. 3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavona. [Adaptado de Vitorello y Haug, 1997]

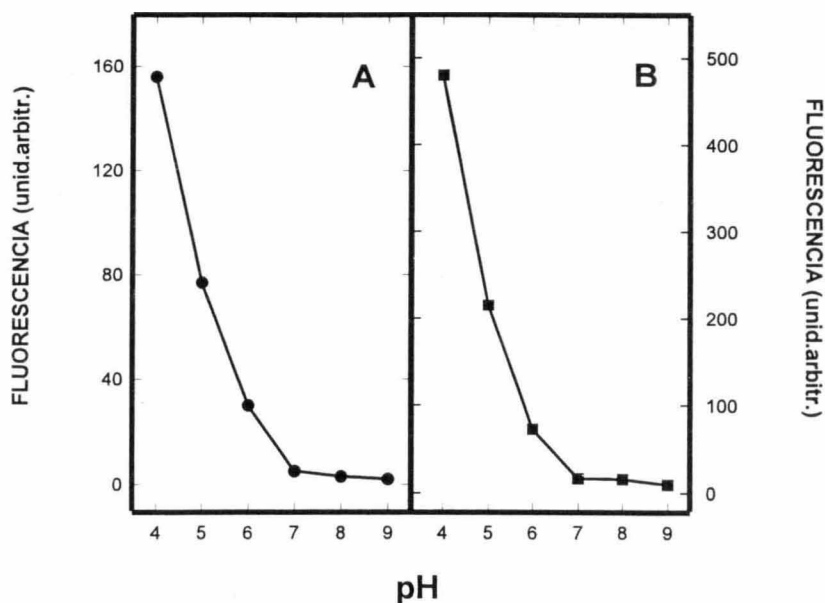


Fig. 4. Interacción del morín con el AlCl_3 a diferentes valores de pH. El panel A es AlCl_3 0.1 mM a diferentes valores de pH con morin 0.1 mM. El panel B es AlCl_3 1 mM a diferentes valores de pH con morin 1 mM.

Cuantificación del Al^{3+} en el medio de cultivo de las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*

El objetivo del presente trabajo, es conocer cuánto Al^{3+} existía en el medio de cultivo de las raíces transformadas de *Catharanthus roseus* en dos diferentes días del ciclo de cultivo. Estos días del ciclo de cultivo se eligieron tomando en consideración los días de máxima actividad de la enzima PLC. Estos días son del 2-4 para la PLC soluble y del 6-8 para la PLC membranal. El objetivo de esta tesis, es estudiar el efecto del Al sobre la actividad de esta enzima y uno de los primeros experimentos que se realizaron fué observar el efecto de la incubación del AlCl_3 0.1 mM durante períodos cortos de incubación con las raíces. Previo a este experimento, consideramos importante determinar si el Al se encuentra libre en el medio y en qué

concentración. Esto facilitaría interpretar los resultados obtenidos sobre la actividad de la PLC. El Al podría no estar disponible para entrar a la raíz, al formar complejos con algunas sustancias en el medio de cultivo y no se observaría efecto sobre la actividad enzimática.

La concentración de Al^{3+} disminuye conforme aumenta el tiempo de incubación, tanto en el día 3 como en día del ciclo de cultivo (Fig. 5 panel A y B). Esto probablemente ocurre porque el Al entró en la raíz, aunque también podría estar formando complejos con algunas sustancias que se encontraban en el medio de cultivo.

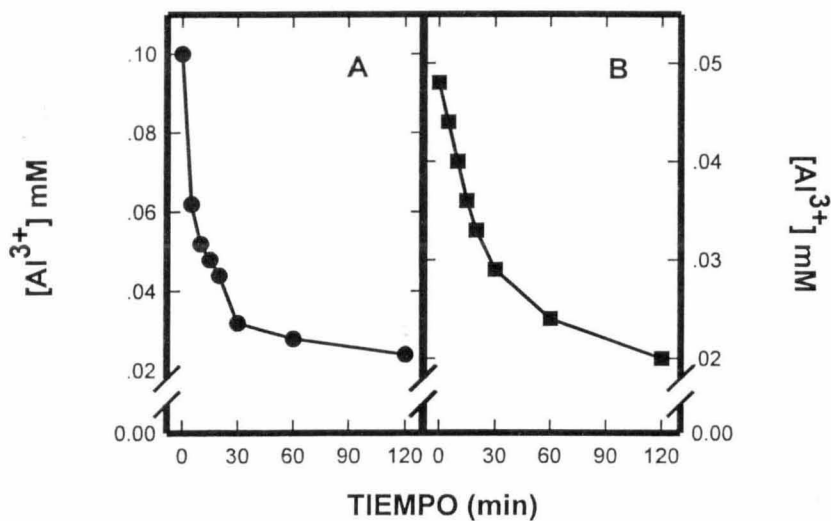


Fig. 5. Concentración de Al^{3+} en el medio de cultivo con raíces de 3 y 7 días de crecimiento. Se observa el cambio en la concentración de Al^{3+} en el medio de cultivo con raíces de 3 días (panel A) y 7 días (panel B) de crecimiento, las cuales han sido incubadas con AlCl_3 0.1 mM durante diferentes periodos de tiempo. Las concentraciones de Al^{3+} en el medio se determinaron a través de una curva patrón.

En los resultados se observa que en el día 3, la concentración del Al^{3+} en el tiempo cero es del 100%, esto se debe a que el pH en estos días es aproximadamente 5. En el día 7, la concentración en este mismo período de tiempo es menor; aproximadamente es del 50%. Este probablemente se debe a que el pH del medio de cultivo en este día es de aproximadamente 5.6. Las dos curvas son diferentes, en la del día 3, se observa que durante los primeros 30 min la $[\text{Al}^{3+}]$ disminuye rápidamente y posteriormente parece disminuir muy lentamente (Fig. 5, panel A). En la curva obtenida en el día 7, la disminución de la $[\text{Al}^{3+}]$ es muy similar durante los períodos de incubación (Fig. 5, panel B).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el morín es un método específico y sensible para la determinación de Al libre. Como podemos observar, en los resultados obtenidos en el experimento realizado a diferentes valores de pH, se demuestra que el morín sólo forma complejos con el Al^{3+} y que conforme disminuye este, disminuye la emisión de fluorescencia. Esto es debido a que el Al^{3+} disminuye, conforme aumenta el pH (Kinraide, 1990; Kinraide, 1991).

Los experimentos de cuantificación muestran que si existe Al^{3+} en el medio de cultivo de las raíces transformadas en los días 3 y 7 del ciclo de cultivo. Podemos observar que en el medio con raíces de 3 días de crecimiento, en los primeros min la concentración del Al^{3+} es mayor que en los del día 7, esto probablemente se deba a los diferentes pH de los medios de cultivo. En el día 3 este es menor que 5 y en el día 7 es mayor de 5; esto afectó la solubilización del Al en ambos días.

La disminución del Al^{3+} en el medio de cultivo probablemente se debe a que está siendo tomado por las raíces de *C. roseus*. Aunque también podría pensarse que este

metal está formando complejos con compuestos que se encuentran en el medio de cultivo. Una manera de comprobar esto, sería incubando la solución sin raíces y ver como varía la concentración de Al^{3+} .

La existencia de Al en su forma libre en el medio de cultivo de las raíces en estos días, nos permitirá estudiar el efecto del Al sobre la actividad de la PLC en estas mismas condiciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Browne, B., McColl, J. y Briscoll, C.** (1990) Aluminum Speciation using Morin: I. Morin and its complexes with aluminum. *J. Envir. Qual.* **19**: 65-72
- Clarkson, D.** (1967) Interactions between aluminum and phosphorus on root surfaces and cell wall material. *Plant Soil* **27**: 347-356
- Kinraide, T.** (1990) Assesing the rhizotoxicity of de aluminate ion, $Al(OH)_4^-$. *Plant Physiol.* **134**: 167-178
- Kinraide, T.** (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soil* **134**: 167-178
- Lazof, D., Goldsmith, J., Rufty, T. y Linton, R.** (1994) Rapid uptake of aluminum into cells of soybean roots tips. *Plant Physiol.* **103**: 1107-1114
- Vitorello, V. y Haug, A** (1997) An aluminum-morin flourescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2. *Plant Sci.* **122**: 35-42

CAPITULO III

PHOSPHOLIPASE C ACTIVITY FROM *Catharanthus roseus* TRANSFORMED ROOTS: ALUMINUM EFFECT

María Luisa Piña-Chable and S.M.Teresa Hernández-Sotomayor

KEY WORDS

Aluminum, phospholipase C, signal transduction, *Catharanthus roseus*.

ABBREVIATIONS

PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; PIP₂, phosphatidilinositol 4,5-biphosphate

ABSTRACT

The effect of aluminum on the activity of PLC was examined in transformed roots from *Catharanthus roseus*. When added *in vitro* Al inhibited the enzymatic activity in a concentration and time-dependent fashion. This effect is very similar for both activities (soluble and membrane-associated). When roots were treated *in vivo* with Al 0.1 mM for short periods (0-4 h), PLC activity was also inhibited. Aluminum (1 mM) diminished root growth in ~50% when added on the first day of culture cycles that affect PLC activity. Other enzymatic activities (NAD⁺-GDH, NADH-GDH, NADH-GOGAT and HMGR) were not affected when roots were treated with Al (0.1 mM) for short periods of time (1 h). Results obtained in this work suggest that the Al can affect PLC activity as a specific target.

INTRODUCTION

Aluminum (Al) is the most abundant metal and the third most abundant element in the Earth's crust (Rengel, 1992). Most of the Al is bound by ligands or occurs in other non-phytotoxic forms such aluminosilicates and precipitates. However, solubilization of Al is enhanced by low pH. As a consequence, Al toxicity is a major limiting factor for plant production on acid soils (Delhaize and Ryan, 1995). The first visual symptom of Al toxicity is a reduction in root growth and the toxic effects are more evident in the root tips (Pintro, 1998).

The mechanism by which Al inhibits plant root growth is unknown. A large number of hypotheses for Al toxicity have been suggested including alteration of the cation-exchange capacity of cell walls, changes in the membrane potential of the cell affecting directly the uptake of the cations such as Ca^{2+} and/or Mg^{2+} (Kuhn *et al.*, 1995), induction of oxidative stress via lipid peroxidation, replacement of Mg^{2+} or Fe^{3+} in cellular reactions, interaction with the cytoskeleton (Mac Donald *et al.*, 1987; Blancaflor *et al.*, 1998), interference with signal transduction pathways (Jones and Kochian 1995), and binding directly to DNA and/or RNA. In fact there is only indirect evidence supporting each of these possibilities (Delhaize and Ryan, 1995, Kochian, 1995), since no direct evidence favoring any of them has been reported.

In animal cells, Al has been implicated as a toxic agent in various neurodegenerative disorders, e.g. Alzheimer's disease (Haug *et al.*, 1994). Toxicity in these cells is linked to aberrations in the phosphoinositide signal transduction pathway, presumably by interactions of the metal with a Gp protein/ phospholipase C system (Shi and Haug, 1992; Shi *et al.*, 1993). As a result, intracellular Ca^{2+} homeostasis is perturbed (Haug 1994).

Phospholipase C (PLC) has a key role in the signal-transduction pathway in animal cells. PLC catalyses the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), generating two potential intracellular second messengers: diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5,-triphosphate (IP₃). IP₃ binds to an intracellular membrane receptor, usually a Ca²⁺ channel, releasing Ca²⁺ into the cytosol causing the elevation of cytosolic Ca²⁺ levels. DAG can activate protein kinase C (Rhee and Bae, 1997; Singer *et al.*, 1997).

In plants, the presence of phosphoinositide pathway components has been demonstrated (Yotsushima *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1995). Indeed, isoforms of PLC that have high sequence homology with mammalian PLCs have now been cloned from plants and have been shown to be induced under various environmental stresses and at specific developmental stages (Hirayama *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1995; Hirayama *et al.*, 1997; Kopka *et al.*, 1998). However, understanding of the regulation of this pathway is limited.

In wheat roots, PLC activity was assayed directly in the presence of Al in microsomal membranes. It was shown that AlCl₃ specifically inhibited PLC activity in a dose-dependent manner and at physiologically relevant Al levels, suggesting that Al exposure may specifically target PLC (Jones and Kochian, 1995).

The rapid inhibitory effects of Al exposure on root elongation suggests an involvement of signal transduction pathways. Based on recent results from animal and plant studies implicating signal transduction in Al toxicity, the objectives of this study were: test the effect of Al on the PLC activity and explore the effect of Al on root growth from *Catharanthus roseus* transformed roots.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Hairy root line J1 of *C. roseus* was obtained by infection of leaves with *Agrobacterium rhizogenes* (Ciau-Uitz *et al.*, 1994) and maintained in B5 medium (Gamborg, 1968), supplemented with 30 g/L sucrose. The pH was adjusted with 0.1 M KOH/HCl to 5.7 prior to autoclaving the medium. One hundred mL aliquots of medium were placed in 250 mL Erlenmeyer flasks and autoclaved for 20 min at 15 psi. Flasks were inoculated with 0.5 g (fresh mass) of hairy roots. Roots were subcultured every 14d. Cultures were grown in darkness at 25°C on a rotary shaker at 100 rpm.

Materials

[³H]PIP₂ and Aquasol were purchased from Du Pont-New England Nuclear; unlabelled PIP₂ was purified from Folch (fraction I) extract of brain lipid (Sigma) by a neomycin affinity column as previously described (Waldo *et al.*, 1994). BCA protein assay reagent was supplied by Pierce Chemical Co. B5 medium and AlCl₃ were obtained from Sigma.

Effect of Al on PLC activity *in vitro*

Roots were quickly frozen with liquid nitrogen and homogenized with a polytron in buffer A (1 g of tissue in 2.5 mL; 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris.HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.2 mM orthovanadate, and 1 mM β-mercaptoethanol). Extracts were passed through gauze, and tissue debris was removed by centrifugation at 14,000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was further centrifuged at 100,000 x g for 45 min. The supernatant (protein: 3.5-5.0 mg/mL) was recovered as the soluble fraction. The pellet was resuspended in the buffer A (protein: 0.5-1.2 mg/mL), and was used as a

crude membrane fraction. All steps during the extraction were performed at 4°C. The cell extracts were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -75°C.

Protein concentrations of samples were measured by BCA protein assay reagent using bovine serum albumin (BSA) as standard (Smith, 1985).

The hydrolysis of [³H]PIP₂ was measured as described by Hernández-Sotomayor and Carpenter (1993) and De los Santos Briones *et al.*, (1997), in a reaction mixture (50 µL) that contained 35 mM NaH₂PO₄ (pH 6.8), 70 mM KCl, 0.8 mM EGTA, 0.8 mM CaCl₂ (final Ca²⁺ concentration 25 µM), 200 µM PIP₂ (~20,000 cpm), 0.08% deoxycholate. AlCl₃ (0 - 0.4 mM) was added to the reaction mixture and the hydrolysis of PIP₂ was starting with the addition of the extract. After incubation at 30°C for 10 min, the hydrolysis reaction was stopped with 100 µL of 1% (w/v) BSA and 250 µL of 10% (w/v) TCA. Precipitates were removed by centrifugation (13,000 x g for 10 min.) and the supernatants collected for quantification of [³H]IP₃ release by liquid scintillation counting Aquasol.

In the experiments were the effect of different times of incubation was tested, extracts were pre-incubated with AlCl₃ 0.1 mM (0- 10 min) at room temperature and the assay was continued as described previously.

Effect of Al on PLC activity *in vivo* and effect on root growth

Flasks containing 100 mL of cultured medium were inoculated with 0.5 g (fresh mass) of hairy roots. At day 3 or 7 roots were incubated with AlCl₃ 0.1 mM (0 - 48 h). Cytosolic and membrane proteins were extracted and PLC assayed. Roots were subcultured. In experiments were the effect of Al was tested at different days of culture, AlCl₃ 1 mM was added at day 0, 2, 6, 8, 10 and 16. Cultures were grown in darkness at 25°C and collected every 2 days. They were weighted and frozen (-80°C). Cytosolic and membrane proteins were extracted and PLC assayed.

Effect of Al on enzymes of the nitrogen metabolism and HMGR

Flasks containing 100 mL of cultured medium were inoculated with 0.5 g (fresh mass) of hairy roots. After roots were grown 7 days and incubated with AlCl_3 0.1 mM for 1 h. Proteins were extracted and the activity of nitrogen metabolism enzymes and HMGR were assayed. In experiments where the effect of Al is observed at longer times (6 and 8 days incubation), roots were subcultured and AlCl_3 1 mM added at day 0. Cultures were grown in darkness at 25°C, at day 6 and 8 collected, measured fresh weight and frozen (-80°C). Proteins and enzyme activities were measured.

3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase activity assay

HMGR activity was measured according to Chappell and Nable (1987) with the following modifications: the extract was prepared by homogenising transformed roots in 2 volumes of 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.5), (250 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol) filtered through cheesecloth. The filtrate was centrifuged at 1,000 x g for 15 min; the supernatant was subsequently centrifuged for 45 min at 100,000 x g. The pellet was resuspended in a buffer containing 100 mM phosphate, pH 7.5, 50 mM DTT, 5 mM EDTA, 20% glycerol, 1 mM PMSF and 7.5 $\mu\text{g/mL}$ of leupeptine. Extraction was carried at 4°C.

The HMGR activity assay measured the conversion of ^{14}C -HMG-CoA to ^{14}C -mevalonate (MVA). The assay was performed in a final volume of 26 μL and was initiated with the addition of 0.66 nmol of ^{14}C -HMG-CoA (0.33 $\mu\text{mol/mL}$; 59.9 mCi/mL) to the reaction mixture containing 5-50 μg protein, 5 mM DTT, 3 mM β -NADPH and 100 mM phosphate buffer, pH 7.5. After incubation at 30°C for 5 min, the reaction was terminated with 5 μL of 6 N HCl and 5 μL of mevalonate lactone (1.0 mg/mL). The ^{14}C -MVA was allowed to lactonize for 15 min at 18°C. One hundred and twenty five μL of K-phosphate buffer and 300 μL of ethyl acetate were added to the lactonized ^{14}C -MVA, the mixture was vortexed for 3 min and centrifuged for 2 min in a microtube at full velocity. An aliquot of 150 μL of the upper phase was taken and added to the scintillation vial containing 5 mL of scintillation liquid and the radioactivity determined.

Glutamate dehydrogenase activity

Enzyme extract and reactions of GDH activity (amination and deamination) were measured according to the method described by Loyola-Vargas and Sánchez de Jimenez (1984). The amination reaction was measured at room temperature in 100 mM Tris-HCl, pH 8.2, containing 100 mM NH_4Cl , 10 mM α -cetoglutaric acid and 160 μM NADH and 2 mM CaCl_2 and the α -cetoglutarate-dependent oxidation of NADH followed at 340 nm. The deamination reaction was measured at room temperature in 100 mM Tris-HCl, pH 9.4, containing 10 mM Na-glutamate, 600 μM NAD^+ , and 1 mM CaCl_2 by following the Na-glutamate-dependent reduction of NAD^+ at 340 nm. Both reactions were initiated by the addition of the enzyme extract. Enzyme units were expressed as nmoles of cofactor oxidized (or reduced) per minute.

Glutamate synthase activity

Enzyme extract and NADH-GOGAT activity was measured according to Loyola-Vargas and Sánchez de Jimenez (1986) with the following modifications: the reaction mixture contained 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30 mM glutamine, 10 mM α -cetoglutaric acid and 0.05, 0.1, 0.15, or 0.20 mL of enzyme extract in a total volume of 3 mL. Reaction was started by the addition of 0.2 mL of 160 mM of NADH and incubated at room temperature. Reaction was followed by decrease of absorbance at 340 nm. Protein determination was measured by Peterson's modification of the Lowry method (Peterson, 1977).

Data Presentation

All experiments were repeated three times using extracts prepared on separate occasions, and all gave similar results. Each figure contains data from a single, representative experiment assayed in duplicate; the errors varied by less than 10%.

RESULTS

***In vitro* effect of Al on PLC activity**

In *C. roseus* transformed roots, a phosphoinositide-PLC activity has been demonstrated (De los Santos-Briones *et al.*, 1997). During a culture cycle, PLC activity in the soluble and membrane fraction reached a maximum at days 2-4 and 6-8, respectively. In order to see the effect *in vitro* of Al on PLC activity, we chose to use roots from the days in which we detected the maximum activity in both fractions. Al inhibited the soluble and the membrane-associated PLC activity in a concentration-dependent fashion (Fig. 1, panel A). However, the soluble activity was more sensitive to the inhibition (~ 60%) than the membrane associated form (~ 50%). To explore the possibility that pre-incubation with Al might give a higher inhibition, we pre-incubated the extract with Al 0.1 mM for different periods of time before starting the enzymatic activity assay by the addition of the substrate. As shown in Fig. 1, panel B, under these conditions Al inhibited both activities (soluble and membrane) to the same extent.

Effect on PLC activity from roots treated with Al

For these experiments, roots from day 3 or 7 were exposed to AlCl_3 (0.1 mM) for different periods of time, after which, cytosolic and membrane proteins were extracted and PLC activity assayed as described in Materials and Methods. The inhibitory effect on the enzymatic activity was very rapid; less than 10 h after exposure the activity decreased 60 and 80% (Fig. 2, Panels A and B).

In both fractions, the maximal inhibition was observed 4 h after Al addition. Interestingly, after this period the activity recovered very rapidly. We decided to measure PLC activity in roots treated for shorter periods of time (0-30 min) as shown in Fig. 2, insert panels. When PLC activity was measured in extracts from roots treated with Al (0.1 mM), a clear dependence on the exposure time was evident.

It has been reported that Al diminished pH of the culture medium. However, the pH of the medium after the addition of Al (0.1 mM) had decreased to 4.5. In order to

discount that inhibition of the enzymatic activity was due to a decrease in pH, an experiment was performed in which the pH of the culture medium was decreased to 4.5 with the addition of HCl 1 M. PLC activity was not affected (Fig. 2, insert).

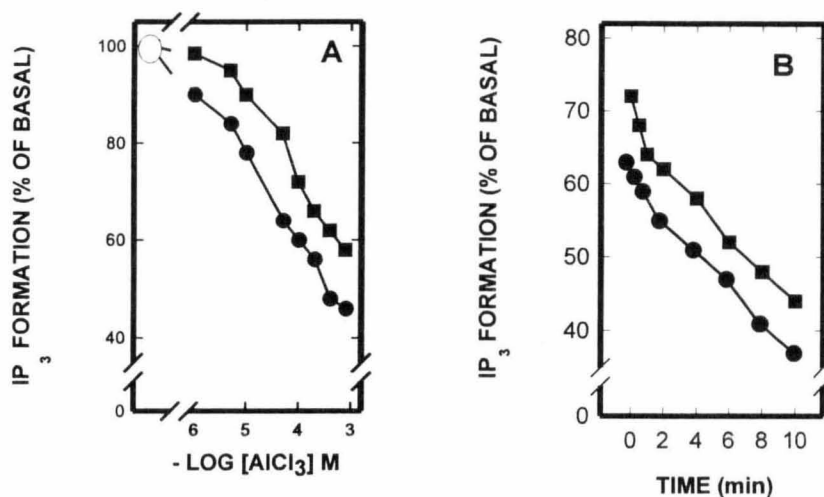


Fig. 1. Effect of different concentrations and incubation periods on PLC activity. PIP₂ hydrolysis was assayed in the presence of Ca²⁺ (25 μM free) and increasing concentrations of Al, (Panel A). Soluble and membrane PLC activity was assayed from roots at day 3 (●) and day 7 (■) respectively. The results are expressed as percentages of the activity without Al (○) which was 750 pmol/min/mg of protein and 150 nmol/min/mg of protein for the soluble and membrane fraction, respectively. Effect of different periods of incubation with AlCl₃ 0.1 mM, (Panel B). Soluble and membrane fractions were incubated for different time periods with Al before the incubation for 10 min at 30°C as described for PLC. The results are expressed as percentages of the activity for the soluble and membrane fraction, respectively (●, ■).

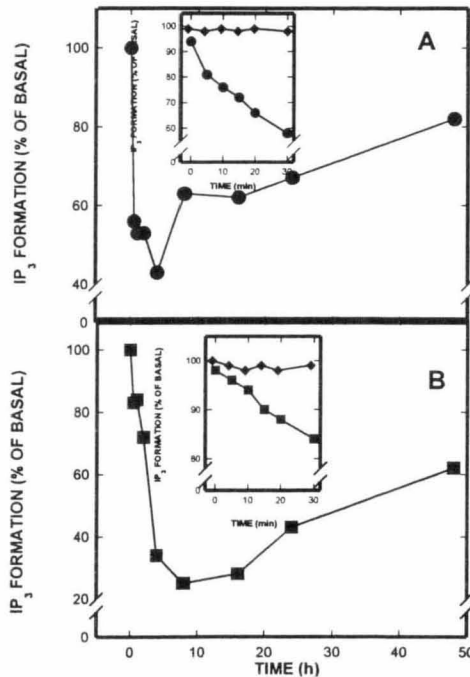


Fig. 2. Time course of the effect of AlCl₃ on PLC activity. Roots from day 3 (soluble fraction, Panel A; ●), and from day 7 (membrane fraction, Panel B; ■) were incubated for different time periods in the presence of AlCl₃ 0.1 mM. The insert is the same experiment at shorter time periods (soluble and membrane). A control experiment was carried out lowering the pH to the culture medium (◆) in the absence of AlCl₃.

Effect of short time Al treatments on different enzymes from the primary metabolism

To assess whether Al was specifically affecting PLC activity, a range of soluble and membrane-associated enzymes isolated from *C. roseus* transformed roots were assayed to see the effect on roots treated with Al (0.1 mM) for 1 h. The results are summarized in Table 1. Only PLC was inhibited by Al, which suggest that Al might specifically affect PLC.

TABLE 1. Effect of AlCl_3 (0.1 mM) on a range of enzymes isolated from *C. roseus* transformed roots.

ENZYME	UNITS	CONTROL	AlCl_3 0.1 mM
PLC SOLUBLE MEMBRANE			
	pmol/min/mg	740.5	220.8
	nmol/min/mg	24.89	18.15
HMGR	nmol/min/mg	20.16	20.17
GDH- NAD^+	nmol/min	60.24	59.9
GDH-NADH	nmol/min	30.54	30.35
NADH-GOGAT	pmol/min	660.2	658.8

Effect of Al on root growth and PLC activity during a culture-cycle

Cells in culture grow following a sigmoidal curve, and the metabolic requirements throughout the growth cycle differ. The culture curve for line J1 transformed roots is presented in Fig. 3. This curve shows a lag period of about 4-5 days, the exponential phase starts during the sixth day and then a linear phase continues over 14 days; after this period, roots enter into the stationary phase. In order to see the effects of Al on root growth and PLC activity during the culture cycle, roots were incubated with 1 mM AlCl_3 from the first day of culture. As expected, under control conditions roots grew normally. When roots were exposed to 1 mM Al, a decrease in root growth was induced, with a 50% reduction in growth, measured as fresh weight. As shown in Fig. 3, PLC activity was detectable in both cultures, control and Al-treated. In roots treated with Al, both soluble and membrane associated, PLC activity was affected. The specific activity was diminished in both fractions. The inhibition was greater on membrane associated PLC activity than on the soluble activity.

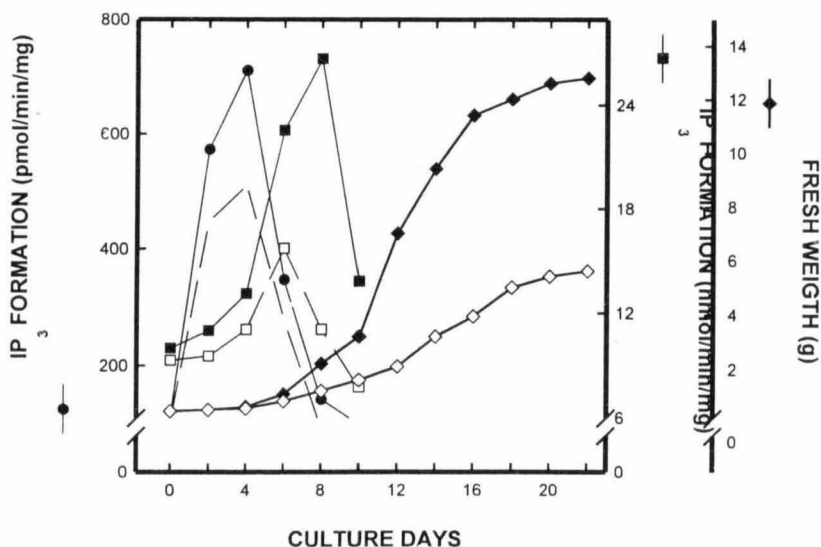


Fig. 3. Culture cycle of transformed roots in the presence of AlCl_3 . Fresh weight represent root growth (◆, ◇). Roots were cultured in medium without (●, ■) or with (○, □) AlCl_3 1 mM and the soluble (●, ○) and membrane (■, □) PLC activity was assayed.

Effect of longer-times Al treatments on different enzymes from the primary metabolism

To test whether Al was affecting other enzymatic activities over longer periods of exposure, a range of soluble and membrane-associated enzymes isolated from *C. roseus* transformed roots were incubated with 1 mM AlCl_3 from the first day of culture. The results are summarized in Table 2. The effect of Al was dependent on the enzyme measured. HMGR activity was affected after 8 days of exposure to Al, but as a consequence and not as a cause of the inhibition of growth. GDH-NAD⁺ activity was affected in day 6 but at day 8 it was the same that the control. GDH-NADH activity was affected in both days and GOGAT-NADH was the same that the control in both days.

TABLE 2. Effect of the addition of AlCl_3 (1mM) in the first day of culture cycle on a range of enzymes isolated from *C. roseus* transformed roots.

ENZYME	UNITS	CONTROL	AlCl_3 1 mM
PLC-MEMBRANE			
ROOTS-6D	nmol/min/mg	24.09	14.2
ROOTS-8D	nmol/min/mg	30.2	10.8
HMGR-MEMBRANE			
ROOTS-6D	nmol/min/mg	11.46	11.42
ROOTS-8D	nmol/min/mg	30.21	11.56
NAD ⁺ -GDH			
ROOTS-6D	nmol/min	60.40	40.49
ROOTS-8D	nmol/min	60.62	62.48
NADH-GDH			
ROOTS-6D	nmol/min	30.29	20.43
ROOTS-8D	nmol/min	30.28	25.19
NADH-GOGAT			
ROOTS-6D	pmol/min	650.2	678.2
ROOTS-8D	pmol/min	660.2	640.2

Effect of the addition of Al on different days during root culture

When roots were exposed to 1 mM Al, on day 2 growth inhibition was produced (50% reduction in growth F.W.) (Fig. 4, Panel A). When Al was added after the second day, root growth was not affected (data not shown). As expected, under control conditions, root growth was not affected. PLC activity was detectable in both cultures, control and Al-treated (Fig. 4, Panel b and C). The soluble and membrane associated PLC activity in roots treated with Al at day 2 was affected. The specific activity was inhibited in both fractions (Fig. 4, Panel B and C). The inhibition on the membrane associated PLC activity was greater than on the soluble PLC activity. The PLC activity was inhibited in the roots that were Al-treated on day 6, but this inhibition was low on day 8. Likewise PLC activity was also inhibited on day 8th.

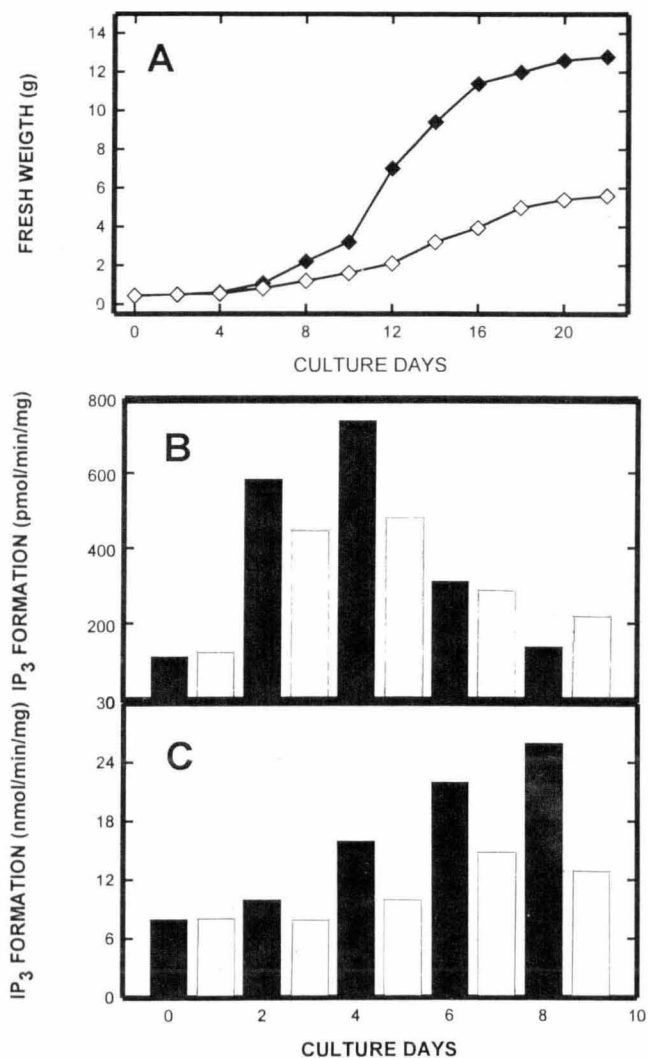


Fig. 4. Effect of the addition of AlCl_3 at day 2 of culture cycle. Roots were cultured in Al free medium with and without AlCl_3 1 mM. Root growth: control and Al treated ($\blacklozenge, \diamond$), respectively (panel A). Soluble PLC activity: control (black bars), Al treated (empty bars), panel B. Membrane PLC activity: control (black bars), Al treated (empty bars), panel C.

Effect of the diminished pH and the addition of Al at day six of the culture cycle

At the beginning of cell culture (2-4 days) pH decreases and then increases. This factor can affect Al solubilization. We explored this possibility in the next experiment. Roots were cultured in medium without Al. On day 6 some were kept without Al, some had AlCl_3 added in the culture medium and in some the pH of the culture medium was decreased to 5 by the addition of HCl 1 M plus AlCl_3 1 mM. Under control conditions the root growth proceeded normally. When roots were exposed to 1 mM Al at day 6 root growth was inhibited by 10%. In roots kept at pH 5 with HCl plus Al ~20% reduction in growth was observed, (Fig. 6, Panel A). This experiment was repeated at days 8, 10 and 16, but these was not inhibition on root growth (data not shown). PLC activity was affected in both treatments, but inhibition was greater when pH was lowered (Fig. 5, Panel B). This indicates that the decrease in pH favored Al solubilization causing an increase in Al uptake by roots and affecting PLC activity and growth. Change in pH by itself did not affect PLC activity or growth, but will cause Al solubilization resulting on toxic effects to the roots.

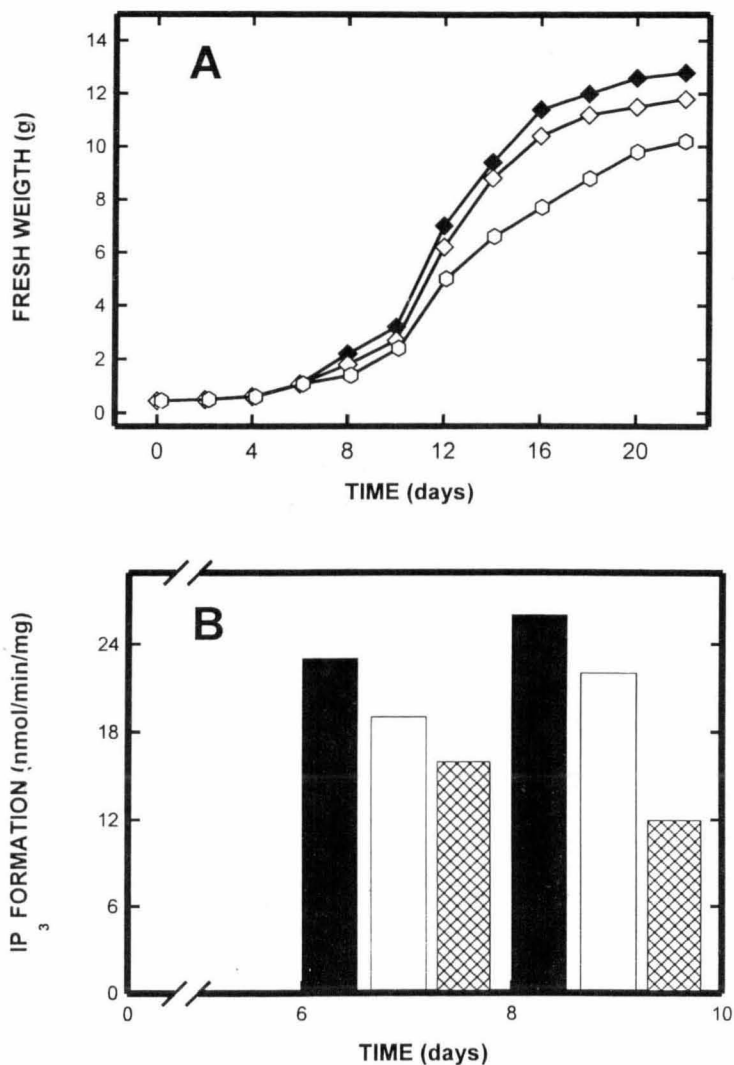


Fig. 5 Effect of the addition of AlCl_3 and pH in day 6. Roots were cultured in medium without AlCl_3 , and at day 6 some were treated with AlCl_3 , 1 mM and the pH of the culture medium diminished to 5 with HCl 1M. Effect on root growth, (◆) Control, (◇) AlCl_3 , 1 mM and (●) AlCl_3 , 1 mM plus HCl 1 M at pH 5; panel A. Control membrane PLC activity, (black bars), (empty) AlCl_3 , 1 mM treated and (gray bars) pH 5 with HCl 1 M plus AlCl_3 , 1 mM; panel B.

DISCUSSION

One of the most important responses to Al appears to be disturbance of Ca^{2+} fluxes. This can be the result of the interaction between Al and the phosphoinositides pathway, specifically the PLC/protein G_p system. The consequence is an inhibition in the generation of IP_3 , a second messenger that increases cytosolic Ca^{2+} concentrations.

The results presented here indicate that aluminum inhibits PLC activity when added *in vitro* to the assay mixture and also *in vivo* in the roots. The concentrations that inhibit this enzymatic activity are physiologically relevant (IC_{50} 100 μM). It was previously suggested that at least two PLC isoforms may exist in *Catharanthus roseus* transformed roots. The fact that Al does not totally inhibit PLC activity *in vitro*, may be due to the fact that not all the isoforms of this enzyme are affected. When the effect of aluminum was tested on the PLC activity from wheat roots *in vitro* (Jones and Kochian, 1995), the inhibition of the activity was complete and the authors suggested that Al is affecting all the isoforms of PLC present in their system.

There are many hypotheses regarding the toxic mechanism of aluminum in the roots (Kuhn *et al.*, 1995; Jones and Kochian, 1995; Blancaflor *et al.*, 1998). However, there is very little evidence in the literature that indicates the nature of the phytotoxic mechanism for aluminum (Delhaize and Ryan, 1995; Kochian, 1995). The results presented here show evidence that aluminum may be interacting with an enzyme that is involved in cellular expansion and root growth. In the past years, several enzyme activities extracted from roots treated with Al have been studied, but no changes due to Al exposure to roots were observed (Slaski, 1995).

When other enzymatic activities were measured in other systems, the roots had been exposed to Al for several hours. This suggests that inhibition is a consequence of diminished growth rather than because Al itself (Kochian, 1995). For example, nitrate reductase activity measured in roots treated with aluminum, for a period of 4 hours was the same as that found in roots from plants not treated with Al. However, when the

activity was measured after 8 hours exposure, a decrease in activity was found; probably as a consequence of growth inhibition (Jones and Kochian, 1995). Our results are similar when the activity of HMGR was measured. In roots that were incubated with Al for short periods, the activity was not affected. However, this activity was reduced when the exposure period was up to 8 days and growth inhibition was already seen. In roots treated with Al for short periods, the activity of nitrogen metabolism enzymes was not affected. But PLC activity was inhibited after a very short period of incubation with Al.

Jones and Kochian were unable to conclude that inhibition of PLC was due to a direct interaction between Al and the enzyme, or if this inhibition was a consequence of perturbation of its lipidic microenvironment. In this report, we suggest that there exists an interaction between Al and the enzyme; because the enzyme extracted from roots treated with Al was assayed using a substrate which has not been in contact with this element. In roots probably both interactions occur.

In mammal cells, it has been determined that PLC activity is stimulated by Mg^{2+} . This probably occurs because of the interaction of G protein and PLC. Where PLC inhibition was probably due to Al displacing Mg^{2+} (Haug *et al.*, 1994). In our system, we have found evidence for the regulation of the PLC activity by G proteins (Suarez-Solis *et al.*, 1999). Then the possibility that Al may affect PLC activity due to interaction of G protein, can also be included.

PLC activity strictly depends on Ca^{2+} (De los Santos-Briones *et al.*, 1997). The possibility that a trivalent cation may compete with Ca^{2+} and be the reason why PLC activity was inhibited is not likely. The ionic ratio of Al^{3+} (<0.06 nm) is smaller than the ionic ratio of Ca^{2+} (0.11 nm) and it occupies less than 15% of the volume occupied by Ca^{2+} (You and Nelson, 1991).

Crystallography studies of PLC in animals have been made and it has been reported that two histidine residues (His 311 and His 356) are essential for the

enzymatic activity (Essen *et al.*, 1996). It can be suggested that the PLC in our model also possesses residues that are essential for its activity and that Al^{3+} may interact with them.

In conclusion, we can say that Al^{3+} inhibits the activity of PLC in *in vitro* and *in vivo* assays. The fact that inhibition is produced in short periods during incubation with the Al, suggests that the PLC is a target for this ion.

LITERATURE CITED

- Blancaflor, E., Jones, D. and Gilroy, S.** (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant. Physiol.* **118**: 159-172
- Chapell, J. and Nable, R.** (1987) Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant. Physiol.* **85**: 469-473
- Ciau-Uitz, R., Miranda-Ham, L., Coello-Coello, J., Chí, B., Pacheco, L. and Loyola-Vargas, V.** (1994) Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30**: 84-88.
- Delhaize, E. and Ryan, P.** (1995) Aluminum toxicity and tolerance in Plants. *Plant Physiol.* **107**: 315-321
- De los Santos-Briones, C., Muñoz-Sánchez, J., Chin-Vera, J., Loyola-Vargas, V. and Hernández-Sotomayor, S.M.T.** (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate - phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.* **150**: 707-713
- Essen, L., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. and Williams, R.** (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ . *Nature*. **380**: 595-602
- Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158
- Haug, A., Shi, B., and Vitorello, V.** (1994) Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* **68**: 1-7
- Hernández-Sotomayor, S.M.T., and Carpenter, G.** (1993) Non-catalytic activation of phospholipase C- γ 1 in vitro by epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* **293**: 507-511
- Hirayama, T., Hadjuk, P., Yoon, H. and Fesik, S.** (1995). Inositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 3903-3907.
- Hirayama, T., Mitsukawa, N., Shibata, D. and Shinozaki, K.** (1997) AtPLC2, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues. *Plant Mol. Biol.* **34**: 175-180
- Huang, Ch., Tate, B., Crain, R. and Coté, G.** (1995) Multiple phosphoinositide-specific phospholipases C in oat roots: characterization and partial purification. *Plant J.* **2**: 257-267
- Jones, D. and Kochian, L.** (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *Plant Cell* **7**: 1913-1922
- Kochian, L.** (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **46**: 237-60

- Kopka, J., Pical, Ch., Gray, J. and Müller-Röber, B. (1998) Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant. Physiol.* **116**: 239-250
- Kuhn, A., Bauch, J. and Schroder, W. (1995) Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil.* **168**: 135-150
- Loyola-Vargas, V. and Sánchez de Jimenez, E. (1984) Differential Role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.* **76**: 536-540
- Loyola-Vargas, V. and Sánchez de Jimenez, E. (1986) Regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase cycle in maize tissues. *J. Plant Physiol.* **124**: 147-154
- MacDonald, T., Humphreys, W. and Martin, R. (1987) Promotion of tubulin assembly by aluminum ion *in vitro*. *Sci.* **236**: 183-186
- Peterson, G. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356
- Pintro, J., Barloy, J. and Fallavier, P. (1998) Uptake of aluminum by the root tips of an Al-sensitive and Al-tolerant cultivar of *Zea mays*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**: 463-467.
- Rhee, S. and Bae, Y. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**: 15045-15048
- Rengel, Z. (1992) Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol.* **121**: 499-513
- Shi, B. and Haug A. (1992) Aluminum interferes with signal transduction in neuroblastoma cells. *Pharmacol. Toxicol.* **71**: 308-313.
- Shi, B., Chou, K. and Haug, A. (1993) Aluminum impacts elements of the phosphoinositide signalling pathway in neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **121**: 109-18
- Shi, J., Gonzales, R. and Bhattacharyya, M. (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J.* **8**: 381-390
- Siegel, N. and Haug, A. (1983) Aluminum interaction with calmodulin: evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochem. Biophys. Acta* **744**: 36-45
- Singer, W., Brown, A. and Sternweis, P. (1997) Regulation of eukariotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and Phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 475-509
- Slaski, J. (1995) NAD⁺ kinase activity in root tips of nearly isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) that differ in tolerance to aluminum. *J. Plant Physiol.* **145**: 143-147
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, N., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. and Klen, K. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Bioch.* **150**: 76-85

- Suárez-Solis, V., Carrillo-Pech, M., Muñoz-Sánchez, J., Coria-Ortega, R. and Hernández-Sotomayor, S.** (1999) Presence of guanine nucleotide-binding proteins in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Physiol. Plant.* **105**: 593-599.
- Waldo, G., Morris, A. and Harden, J.** (1994) Purification of G-protein-regulated phospholipase C from turkey erythrocytes. *Methods in enzymol.* **238**: 195-201
- Yamamoto, Y., Conkling, M., Sussex, I. and Irish, V.** (1995). An *Arabidopsis* cDNA related to animal phosphoinositide-specific phospholipase C genes. *Plant Physiol.* **107**: 1029-1030.
- Yotsushima K., Nakamura K., Mitsui T. and Igaue I.** (1992). Purification and characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in suspension-cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 1247-1251
- You, G. and Nelson, D.** (1991) Al^{3+} versus Ca^{2+} ion binding and tyrosine spin-labeled bovine brain calmodulin. *J. Inorg. Biochem.* **41**: 283-291

CAPITULO IV

DISCUSION GENERAL

La regulación de algunos eventos metabólicos y el acoplamiento de las respuestas a estímulos externos puede ser generado a través de cambios en el flujo del Ca^{2+} citosólico. Se ha postulado que una amplia variedad de procesos son mediados a través del Ca^{2+} como segundo mensajero, éstos incluyen la mitosis, la citocinesis y el crecimiento (Rengel, 1992). Estos procesos también son afectados cuando se produce la toxicidad por el Al.

Se ha planteado la hipótesis de que el Al produce sus efectos tóxicos debido a que perturba la homeostasis del Ca^{2+} y por lo tanto su función como segundo mensajero (Rengel, 1992).

Este efecto sobre el flujo del Ca^{2+} puede deberse a la inhibición en la generación del IP_3 , lo cual no permitiría la liberación del catión de almacenes intracelulares (Alexandre *et al.*, 1990). El IP_3 se genera por la hidrólisis del PIP_2 ; esta reacción es catalizada por la PLC. De estudios realizados en células animales se ha planteado la hipótesis de que el Al puede estar inhibiendo la actividad de la PLC por una interacción directa con la enzima y/o con la proteína G que actúa como un activador de ésta (Shi y Haug, 1992).

Los síntomas que se presentan por la toxicidad del Al se han dividido en los que se presentan a corto (seg. o min) y a largo plazo (hrs o días) (Wissemeir *et al.*, 1987). En la literatura, los síntomas de largo plazo han sido reconocidos como de carácter secundario; sin embargo, hasta hace poco tiempo los síntomas a corto plazo han recibido una mayor atención. Una de las más importantes respuestas a corto plazo es la perturbación del flujo de Ca^{2+} (Rengel, 1992). La inhibición del crecimiento de la raíz se puede observar a partir de la primera hora de exposición al Al; una observación significativa en la inhibición de la mitosis celular y la elongación de la raíz se observa entre las 4-6 horas de exposición al metal (Tepper, 1989).

Para una mejor interpretación de los resultados obtenidos con el Al, era conveniente conocer las concentraciones de Al libre, que se encuentran en el medio de cultivo, antes de observar el efecto sobre la actividad de la PLC. Una metodología para la medición del Al^{3+} , que ha demostrado ser fácil, rápida y no es costosa, es el uso del morin (Vitorello y Haug, 1997).

En este trabajo se realizaron experimentos en los que se demuestra que el morin produce fluorescencia cuando forma complejos con el Al^{3+} ; esta formación del complejo es muy específica (Capítulo II, Fig. 3). Además, esta metodología puede hacerse cuantitativa por medio de una curva patrón, lo cual convierte al morin en una herramienta adecuada para la determinación del Al libre, pues es muy específico y sensible.

Los resultados presentados aquí sugieren que el aluminio puede inhibir la actividad de la PLC tanto *in vitro* como *in vivo*. Las concentraciones necesarias para inhibir esta actividad son fisiológicamente relevantes, la IC_{50} para el Al^{3+} fue de 0.1 mM. En estudios *in vivo* durante períodos cortos de incubación con Al, la actividad de la PLC fué inhibida. Cuando se adicionó el Al durante diferentes días del ciclo de cultivo, el Al inhibió la actividad de la enzima. La adición del Al en los primeros 6 días del ciclo de cultivo afectó el crecimiento de las raíces transformadas. La adición en días posteriores no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento. Estos resultados sugieren que el efecto sobre la actividad de la PLC, podría estar relacionado con los efectos sobre el crecimiento.

En conclusión, el hecho de que la inhibición se produzca en los períodos cortos de incubación con el Al y a concentraciones fisiológicamente relevantes, sugiere que la PLC podría ser un blanco para el mecanismo de toxicidad por Al.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- El aluminio inhibe la actividad de la PLC de las fracciones soluble y membranal en experimentos *in vitro*, con una IC_{50} de 0.1 mM.
- El aluminio inhibe la actividad de la PLC de las fracciones soluble y membranal en experimentos *in vivo*, durante períodos cortos de incubación de las raíces con el metal. La inhibición se observó durante las primeras 4 horas.
- El aluminio (1 mM) cuando se adicionó en el primer día del ciclo de cultivo, inhibió el crecimiento de las raíces en casi el 50 %, la actividad de la PLC se encontró inhibida durante todo el ciclo de cultivo.
- La adición del aluminio a una concentración 1 mM durante los primeros seis días del ciclo de cultivo, produce una inhibición en el crecimiento de las raíces. Esto sugiere que se produce una señal importante en estos días y que el Al probablemente esté interfiriendo con la generación de esta señal. Si la adición del Al es posterior a estos días, no se produce la inhibición en el crecimiento de las raíces.
- No todas las enzimas de las raíces transformadas se ven afectadas de la misma manera por el Al, lo cual sugiere que la PLC puede ser un blanco para el mecanismo de toxicidad por este metal.
- El uso del morín como método para la detección del Al^{3+} , es muy específico y sensible.

PERSPECTIVAS

Actualmente es evidente que los constituyentes de la vía de los fosfoinosítidos, se encuentran presentes en plantas. Se sabe que el metabolismo de los fosfolípidos es esencial para la función celular y acompaña a una gran variedad de procesos, entre los cuales se incluye: la reorganización de la membrana y su degradación, y la producción de segundos mensajeros (Chapman, 1998).

Las plantas responden a una gran variedad de factores ambientales y en la respuesta se encuentran involucradas diversas cascadas de transducción de señales en las que participan fosfolipasas específicas.

En el presente trabajo se ha demostrado que el Al inhibe la actividad de la PLC en las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. Para conocer mejor el mecanismo por el cual se está produciendo este efecto, se plantea una lista de acciones a seguir:

1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Al LIBRE Y TOTAL. Este sería el primer paso a seguir, pues es necesario saber cuáles son las concentraciones de Al tanto en el medio de cultivo, como en las raíces. Esto permitirá conocer las concentraciones de este metal que están afectando a la PLC.

2.- REALIZAR EXPERIMENTOS DE CINETICA ENZIMATICA. Con la enzima pura se deben realizar experimentos para conocer cuál es el mecanismo por el cual el Al está produciendo el efecto de inhibición de la actividad. Estos experimentos serían de competencia con calcio, para saber si el Al está desplazando a este catión de los sitios de unión en la enzima. También se deben realizar experimentos de incubación con el sustrato, para saber si el Al está interaccionando con los fosfolípidos y en que proporción lo está haciendo.

3.- EXPERIMENTOS DE RECONSTITUCION. Estos experimentos serían con la enzima pura y algunos de los elementos de las vías de transducción (receptores, proteínas G) de células animales para saber si el Al está afectando a las proteínas G, y

si éste podría ser un mecanismo que esté contribuyendo a la inhibición de la actividad de la PLC.

3. EXPERIMENTOS DE INMUNODETECCION. Estos experimentos podrían realizarse para saber si el AI está inhibiendo la actividad de PLC y determinar si está afectando la cantidad de enzima presente en los extractos. Los experimentos se realizarían utilizando los anticuerpos contra las PLC de animales, los cuales ya se sabe que cruzan con las PLC del sistema empleado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexandre, J., Lasalles, J. y Kado, R.** (1990) Opening of Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*. **343**: 567-570.
- Chapman, K.** (1998) Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Sci.* **3**: 419-426
- Rengel, Z.** (1992) Disturbance of cell Ca^{2+} homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant, Cell and Envir.* **15**: 931-938
- Shi, B. y Haug, A.** (1992) Aluminium interferes with signal transduction in neuroblastoma cells. *Pharmacol. Toxicol.* **71**: 308-313
- Tepper, H., Yang, C. y Shadle, M.** (1989) Effect of aluminum on growth of root tips on honey locust and loblolly pine. *Env. and Exp. Botany*. **29**: 165-173
- Vitarello, V. y Haug, A.** (1997) An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2. *Plant Sci.* **122**: 35-42
- Wissemeyer, A., Klotz, F. y Horst, W.** (1987) Aluminium induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.) *J. Plant Physiol.* **129**: 487-492



5392

Bib. 1