

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS**

**Estudio de la fosforilación de lípidos de membrana
durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L.**

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

María Julissa Ek Ramos

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2003



A Dios por guiar mis pasos

A mi papito por haber tenido el privilegio de compartir contigo 28 años de mi vida, por enseñarme a valorar las cosas importantes: la amistad y el amor al prójimo y porque ahora eres mi ángel de la guarda.

A mi mami porque me apoyas en la búsqueda del cumplimiento de mis sueños, porque compartes mis alegrías y mis tristezas y porque con tu fortaleza y ejemplo me has hecho la persona que soy.

A mis hermanos Mars, Asun y Any por todos los momentos compartidos, por todo su amor, por cada una de sus palabras de aliento y por enseñarme y dejar que les enseñara que el que quiere puede.

Todo tiene su tiempo,
Y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora.
Tiempo de nacer, y tiempo de morir;
Tiempo de plantar, y tiempo de arrancar lo plantado;
Tiempo de matar, y tiempo de curar;
Tiempo de destruir, y tiempo de edificar;
Tiempo de llorar, y tiempo de reír;
Tiempo de endechar, y tiempo de bailar;
Tiempo de esparcir piedras, y tiempo de juntar piedras;
Tiempo de abrazar, y tiempo de abstenerse de abrazar;
Tiempo de buscar, y tiempo de perder;
Tiempo de guardar, y tiempo de desechar;
Tiempo de romper, y tiempo de coser;
Tiempo de callar, y tiempo de hablar;
Tiempo de amar, y tiempo de aborrecer;
Tiempo de guerra y tiempo de paz.

Eclesiastés 3: 1-8

CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

LISTADO DE FIGURAS

LISTADO DE CUADROS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I.	Antecedentes	1
	Reproducción vegetal	1
	Embriogénesis somática <i>in vitro</i>	5
	Estudios que involucran componentes de las rutas de transducción de señales durante la embriogénesis somática	6
	Proteína parecida a receptor con actividad de cinasa de la embriogénesis somática (SERK)	7
	Proteínas G	8
	Proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs)	9
	Proteínas cinasas de tirosina	10
	Ruta de los fosfoinosítidos	11
	¿Qué son los fosfoinosítidos?	11
	Síntesis de los fosfoinosítidos	12
	Sistema de los fosfoinosítidos	19
	Función de los fosfoinosítidos en diferentes organismos	19
	Fosfoinosítido cinasas	23
	Importancia del estudio de las fosfoinosítido cinasas durante la embriogénesis somática	28
	Objetivos	30
	Objetivo general	30
	Objetivos particulares	30
	Bibliografía	31

CAPÍTULO II.	Presencia de la actividad de fosfatidilinositol cinasas y fosfatidilinositol monofosfato cinasas durante el ciclo de cultivo de células en suspensión de <i>Coffea arabica</i> L.	42
	Abreviaturas	42
	Resumen	42
	Introducción	43
	Materiales y métodos	45
	Resultados	47
	Discusión	51
	Bibliografía	53
CAPÍTULO III.	Changes in phosphatidylinositol and phosphatidylinositol monophosphate kinase activities during the induction of somatic embryogenesis in <i>Coffea arabica</i> L.	57
	Abbreviations	57
	Abstract	57
	Introduction	58
	Materials and methods	59
	Results	62
	Discussion	69
	Acknowledgements	73
	References	73
CAPÍTULO IV.	Optimización de la metodología para medir la actividad de lípido cinasas eliminando los lípidos endógenos presentes en los extractos membranales crudos de <i>Coffea arabica</i> L.	78
	Abreviaturas	78
	Resumen	78
	Introducción	79
	Materiales y métodos	79
	Resultados	81
	Discusión	86
	Bibliografía	87

CAPÍTULO V.	Discusión general	89
	Actividad de lipido cinasas encontradas en células en suspensión de <i>Coffea arabica</i> L.	89
	La embriogénesis somática en <i>Coffea arabica</i> L.	90
	Clasificación de las diferentes etapas de desarrollo de la embriogénesis somática de <i>Coffea arabica</i> L.	91
	Actividad de fosfoinosítido cinasas presentes en los diferentes estadios de desarrollo de la embriogénesis somática de <i>Coffea arabica</i> L.	93
	¿Qué ocurre con el proceso de embriogénesis somática si se agregan diferentes concentraciones de wortmanina al medio de inducción?	94
	Bibliografía	98
CAPÍTULO VI.	Conclusiones	103
	Resumen de resultados	103
	Conclusiones generales	103
CAPÍTULO VII.	Perspectivas	105

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección de la Dra. S. M. Teresa Hernández Sotomayor y la Dra. Graciela Racagni Di Palma.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología financió este trabajo con el proyecto 33646-N y con la beca de Doctorado 126282.

AGRADECIMIENTOS

Para la obtención de este grado dos personas fueron muy importantes. Quiero agradecer a mis asesoras la Dra. Teresa Hernández Sotomayor y la Dra. Graciela Racagni de Di Palma. Gracias por su apoyo, por sus consejos y por todos los momentos compartidos, los buenos y los malos. Tere, gracias por todo, por enseñarme tantas cosas, no sólo desde el punto de vista académico sino acerca de la vida. Kelly, gracias por tu maravillosa manera de hacer las cosas, por tu amistad incondicional y por compartir conmigo tus conocimientos. A ambas les prometo seguir siempre su ejemplo de superación.

De igual manera agradezco a mis sinodales: la Dra. Nancy Santana Buzzy, el Dr. Luis González de la Vara, el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, el Dr. Víctor Loyola Vargas y el Dr. Tomás González Estrada. Gracias por sus sugerencias y sus valiosos comentarios los cuales enriquecieron esta tesis. También quiero agradecer al CICY en general, por brindarme las facilidades en infraestructura y servicios para realizar esta tesis. Gracias a mis maestros, gracias por los exámenes, las tareas, por los seminarios y, en general, por compartir sus conocimientos. Gracias a las Unidad de Posgrado, Biblioteca y Sala de cómputo. Gracias Army, Yoli, Felipe, Genny, Sergio, Ofir y los chavos de cómputo.

El largo camino para la obtención de este grado no habría sido tan llevadero sin la ayuda y el apoyo de un gran número de personas. A todos ellos gracias, cada uno de ustedes aportó una pieza clave. Mi proceso de formación asemeja a un árbol. Las raíces se volvieron fuertes en mis primeros años en el CICY, cuando empecé como estudiante de entrenamiento. Gracias a la Unidad de Biotecnología y a toda la gente con la que compartí 3 años de mi vida. Gracias Javierín (porque sin ti no habría terminado la licenciatura), Pepe, Sarita (ustedes son los culpables de que esté en el CICY), Andresillo (gracias por tus consejos), Ileanita Borges, Lety (gracias por tu alegría y tus consejos), Huero y compañía, Don Fredi, Charlie, Chanito, Ramón, Luis Saénz, Maggy (la chuli), Francisco, Felipe (por tus conocimientos en fotografía y todo

tu apoyo en el propedéutico y los angustiosos primeros meses del posgrado), los Migueles, Albertico, Fernando, Don Ceci. Gracias a toda la gente con quien tuve el privilegio de convivir y de las cuales aprender tantas cosas. Gracias a ustedes las raíces de este árbol son tan fuertes.

Posteriormente, el tallo se fue formando y creciendo durante mis primeros años en el posgrado. Gracias a mis compañeros de generación: Vicky, Santy, Fer, Ileanín, Gaby, Joaquín, Gabo, Alfonso. Por todos los momentos, por la convivencia, por nuestras largas conversaciones, por la empatía, por la química, la física y la biología. Sobre todo la biología. Esas discusiones filosóficas fueron de campeonato. Ese tratar de componer al mundo durante las tardes. Cada uno tuvo y tiene muchas cosas que aportar.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de la Dra. Hernández: César, Luis Carlos, Ignacio, Víctor, Marilú, Lucy, Ileana, Manuel, Ligia, Armando, Ángela, Gaby, Juan, Ana Luisa, Rosa, Elda y Nina. Los de antes y los de ahora, gracias por los momentos compartidos. Gracias por acompañarme en este proceso.

A toda la gente de la UBBMP, gracias por hacer de las ramas y las hojas de este árbol las más verdes y hermosas. Gracias por tu amistad Mary Solís. Gracias Rosy, Marce y Paco por compartir la información acerca de la línea FM y por su ayuda incondicional en todo lo que necesité. Gracias por tu amistad Luis Carlos, Oscar, Elidé y Adriana. Mi querida Nancy (nuñú), un beso y un abrazo. Lo logré.

A América, Juan Manuel, José Juan y su maravillosa familia, Elizabeta, Celene, Abril, Magally, Gaby, Lucy y Carlos, Ligia, Tere, Armando, Manuel, Ileana y Nancy, gracias por estar conmigo en el momento más difícil de mi vida.

A mis amigos entrañables, Ameri, Juan Ma, Ligiovich (sabes que me refiero a ti), Ely, Cel, Lucy, Elda, los quiero un resto. A mis queridos amigos Vicky y Santy, por todo su amor a pesar de la distancia y a mis amigos fiesteros, Tere, Julio, Jorge, Cristian, Roberto y Elda. Gracias por su amistad y su alegría. Idur, gracias por tu amistad.

ABREVIATURAS

DAG: diacilglicerol

IC₅₀: concentración del inhibidor a la cual se obtiene el 50% del efecto

IP₃: inositol trisfosfato

K_i: constante de inhibición

LPA: ácido lisofosfatídico

PA: ácido fosfatídico

PI: fosfatidilinositol

pl: punto isoelectrico

PIP: fosfatidilinositol monofosfato

PI 3-P: fosfatidilinositol 3-monofosfato

PI 4-P: fosfatidilinositol 4-monofosfato

PI 5-P: fosfatidilinositol 5-monofosfato

PIP₂: fosfatidilinositol bisfosfato

PI 3,4-P₂: fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato

PI 3,5-P₂: fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato

PI 4,5-P₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PI 3,4,5-P₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato

PIK: fosfatidilinositol cinasa

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa

PI4K: fosfatidilinositol 4-cinasa

PIPK: fosfatidilinositol monofosfato cinasa

PIP4K: fosfatidilinositol monofosfato 4-cinasa

PIP5K: fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PLC: fosfolipasa C

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro

RTPCR: reacción en cadena de la polimerasa utilizando la transcriptasa reversa

TLC: cromatografía en placa fina

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO I.	Figura 1.1. Alternancia de generaciones en angiospermas	1
	Figura 1.2. Desarrollo del embrión cigótico	2
	Figura 1.3. Diferentes etapas del desarrollo de los embriones somáticos	4
	Figura 1.4. Estructura química de algunos fosfolípidos	11
	Figura 1.5a. Síntesis del fosfatidilinositol (PI) en células vegetales	13
	Figura 1.5b. Síntesis de los fosfolípidos en células vegetales. Síntesis de la fosfatidilserina (PS) por la vía del CMP-ácido fosfatídico y la fosfatidilcolina (PC) por la vía del diacilglicerol	14
	Figura 1.5c. Síntesis de los fosfolípidos en células vegetales. Síntesis de la fosfatidiletanolamina (PE) por la descarboxilación de PS	15
	Figura 1.5d. Síntesis de los fosfolípidos en células vegetales. Síntesis de la cardiolipina	16
	Figura 1.6. Rutas alternativas de síntesis del ácido fosfatídico (PA)	17
	Figura 1.7. Síntesis de los fosfoinosítidos en células eucariotes	18
	Figura 1.8. Síntesis del fosfatidilinositol 4-monofosfato y del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato mediante la actividad de fosfoinosítido cinasas	23
	Figura 2.1. Curvas de crecimiento de la línea L-7	47
CAPÍTULO II.	Figura 2.2. Cambios en la actividad de lípido cinasas durante el ciclo de cultivo de la línea L-7	48
	Figura 2.3. Actividad de PIKs en las células de 7 días de cultivo de la línea L-7	49
	Figura 2.4. Actividades específicas de las lípido cinasas presentes en las células en suspensión de <i>Coffea arabica</i> L. durante 14 días de cultivo	50

CAPÍTULO III.	Figure 3.1. Developing somatic embryos of <i>Coffea arabica</i> L ,	63
	Figure 3.2. Changes in lipid kinase activities during somatic embryogenesis of <i>Coffea arabica</i> L.	64
	Figure 3.3. Effect of the addition of exogenous substrates on phosphoinositide kinase activities during somatic embryogenesis of <i>Coffea arabica</i> L.	66
	Figure 3.4. Separation of phosphorylated lipids using a boric acid system	67
	Figure 3.5. Wortmannin effect on <i>in vitro</i> PI3K and PI4K activities	67
	Figure 3.6. Effect of addition of different concentrations of wortmannin on the number of normal somatic embryos obtained	68
CAPÍTULO IV.	Figure 4.1. Análisis del contenido de lípidos y proteínas de las diferentes fracciones obtenidas durante la estandarización de la metodología de eliminación de lípidos endógenos	82
	Figure 4.2. Autorradiografía de la cromatoplaca con los productos obtenidos del ensayo de lípido cinasas utilizando la fracción que no se pegó a la columna de resina AG 1-X8 (PREG)	84
	Figure 4.3. Autorradiografía de la cromatoplaca con los productos obtenidos del ensayo de lípido cinasas utilizando la fracción que no se pegó a la columna de resina AG 1-X8 (CE) y (GLO)	85
CAPÍTULO V.	Figure 5.1. Esquema de los eventos que se encontraron en los diferentes estadios de desarrollo de la embriogénesis somática en <i>Coffea arabica</i> L.	97

LISTADO DE CUADROS

CAPÍTULO I.

Cuadro 1.1a. Procesos fisiológicos en que se han visto involucrados los fosfoinosítidos	20
Cuadro 1.1b. Procesos fisiológicos en que se han visto involucrados los fosfoinosítidos	21
Cuadro 1.2. Propiedades de las PI3Ks de mamíferos	24
Cuadro 1.3. Características de las PI4Ks y las PIPKs de células animales	25
Cuadro 1.4a. Características de las PI4Ks citosólicas purificadas de plantas	26
Cuadro 1.4b. Características de las PI4Ks membranales de plantas	27

RESUMEN

Las fosfatidilinositol cinasas son enzimas que participan en un gran número de procesos fisiológicos tales como el crecimiento y el desarrollo. Por otra parte, la embriogénesis somática es un sistema muy útil para estudiar los primeros mecanismos que regulan las primeras etapas del desarrollo embrionario en las plantas, por lo que es un buen modelo para analizar la presencia de las fosfatidilinositol cinasas y determinar su posible función.

La información generada en este trabajo representa la primera evidencia de la presencia de la actividad de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) y de la fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K) durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. Además, se determinó que la regulación de las actividades de la PI3K y la PI4K podría tener una función muy importante durante el desarrollo de la embriogénesis somática.

También se utilizó la wortmanina, un inhibidor de la actividad de la PI3K y de la PI4K en células animales, levaduras y plantas. La formación del fosfatidilinositol 3-monofosfato (PI 3-P) y del fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI 4-P) tuvo una IC_{50} de 31 y 6 nM respectivamente. La adición al medio de inducción de la wortmanina, después de la formación de estructuras preglobulares (PREG), tuvo un efecto en la formación de un menor porcentaje de embriones normales en etapas avanzadas del desarrollo.

En conclusión, en este trabajo se presentan evidencias de la presencia de la actividad de fosfoinosítido cinasas durante la inducción y el desarrollo de los embriones somáticos de *Coffea arabica* L. además de que los resultados sugieren que la PI3K y la PI4K podrían tener una función muy importante durante este proceso.

ABSTRACT

Phosphatidylinositol kinases have been involved in many different physiological processes that regulate mechanisms involved in growth, development and many others. Somatic embryogenesis is a useful system to determine the possible mechanisms that regulate the first events of the embryogenic development in plants; therefore it is a good model to analyze the presence and possible function of these enzymes.

The information generated in this work represents the first evidence of the presence of the enzymes phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) and phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase (PIP5K) during somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. Besides, regulation in the activity of PI3K and PI4K appears to have an important role in the development of somatic embryogenesis.

Wortmannin, a known inhibitor of PI3K and PI4K activities in mammalian cells, yeast and plants, was used. In our system, the formation of phosphatidylinositol 3-monophosphate (PI 3-P) and phosphatidylinositol 4-monophosphate (PI 4-P) had an IC_{50} of 31 and 6 nM respectively. The addition of wortmannin to the induction medium during the PREG stage resulted in a reduction of the number of normal embryos.

In conclusion, this work represents the first evidence of the presence of phosphatidylinositol kinase activities during somatic embryogenesis induction and development of *Coffea arabica* L. These results suggest that PI3K and PI4K may have an important role during these processes.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un proceso que ha intrigado por muchos años a los científicos. Además, es un modelo idóneo para determinar los posibles mecanismos que regulan las primeras etapas del desarrollo embrionario en las plantas puesto que puede ser inducida bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, los factores involucrados en la inducción de este proceso no se encuentran claramente definidos. Por ejemplo, se desconoce como las señales externas interactúan en la membrana celular para modular los procesos intracelulares que conducen a la diferenciación.

En los últimos años, varios grupos de investigación se han enfocado al estudio de las posibles rutas de transducción de señales involucradas en la regulación del proceso de la embriogénesis somática. Las evidencias reportadas hasta ahora muestran la presencia de una proteína parecida a receptor con actividad de cinasa de la embriogénesis somática (SERK) en zanahoria y en *Arabidopsis thaliana*, la actividad de proteínas G, de proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs) y de proteínas cinasas de tirosina en diferentes especies. Sin embargo, para poder tener elementos suficientes para obtener un modelo deben analizarse otros componentes de las rutas de transducción de señales, entre ellas la ruta de los fosfoinosítidos.

Durante la embriogénesis, se requiere de un control preciso de eventos tales como la división celular, la diferenciación celular y el crecimiento. Los mecanismos que regulan estos procesos se ha estudiado en diferentes organismos y se ha determinado que los fosfoinosítidos participan en ellos. Por lo tanto, en la embriogénesis somática, estos compuestos podrían estar cumpliendo funciones muy importantes.

Utilizando como modelo de estudio la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L., una especie de alto valor comercial, en este trabajo se analiza la presencia de la actividad de las fosfatidilinositol cinasas, una familia de enzimas que forman parte de la ruta de los fosfoinosítidos, a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo embriogénico y se determinó su posible función en este proceso.

CAPÍTULO I

Antecedentes

REPRODUCCIÓN VEGETAL

Existen dos tipos de reproducción vegetal: la reproducción sexual y la reproducción asexual.

La reproducción sexual es el proceso mediante el cual se forman estructuras especializadas que producen células sexuales o gametos. Las plantas que se reproducen de esta manera, atraviesan por la alternancia de dos generaciones; así, el ciclo de vida típico de una angiosperma se puede dividir en la fase haploide o gametofítica y la fase diploide o esporofítica, las cuales son dependientes una de la otra (Figura 1.1).

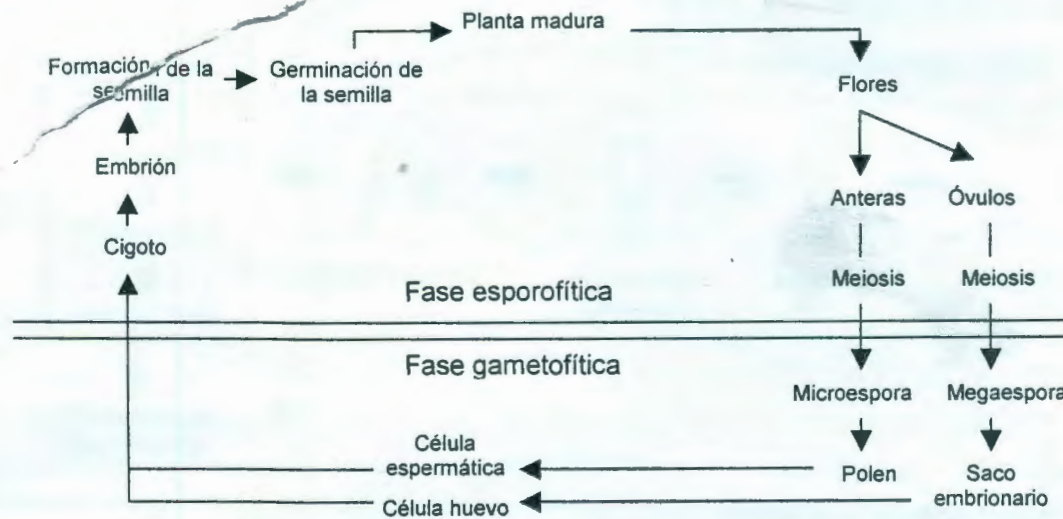


Figura 1.1. Alternancia de generaciones en las angiospermas. La fase esporofítica dominante y la fase gametofítica parasítica se presentan divididas por las líneas paralelas. (Richards, 1990).

Para la formación de un nuevo organismo, en las angiospermas ocurre un evento de doble fertilización. Una célula espermática se une con la célula huevo para formar el cigoto e inicia la embriogénesis, la otra célula espermática se une con la célula central,

una célula especializada del saco embrionario, e inicia la diferenciación del endospermo, un tejido triploide de reserva.

El desarrollo del embrión puede ser subdividido en una secuencia de 20 diferentes etapas que representan tres eventos principales: el primero, en el que se observa la división asimétrica del cigoto, se genera una pequeña célula apical que posteriormente formará el embrión y una gran célula basal que formará el suspensor; en el segundo se observa el patrón de formación específico del embrión a través de los estadios globular, corazón, torpedo y cotiledonario, y en el tercero se lleva a cabo la transición al estadio cotiledonario que coincide con el inicio de la formación de los primordios radicular y apical. En el ámbito fisiológico, se inician los procesos de crecimiento, acumulación de sustancias de reserva y maduración. La desecación y, en la mayoría de los casos, el inicio de la etapa de dormancia, completan el proceso de formación de la semilla (Dodeman et al., 1997).

Embriogénesis cigótica

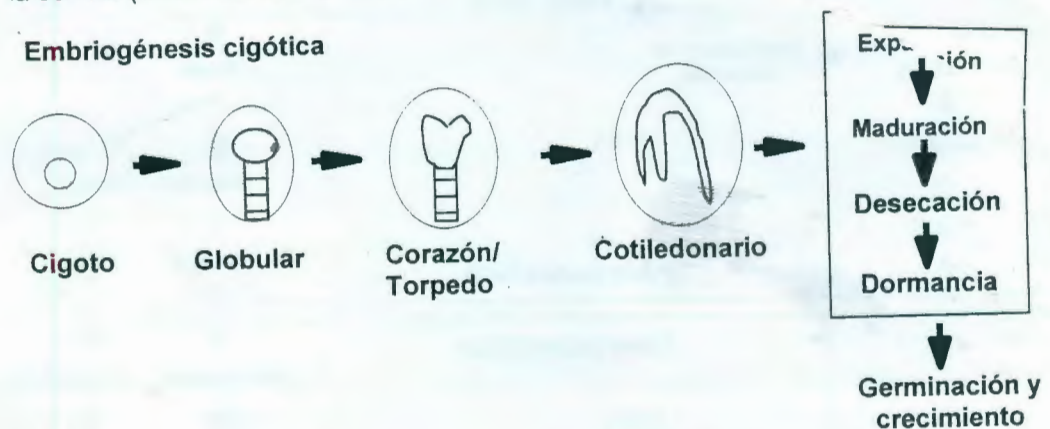


Figura 1.2. Desarrollo del embrión cigótico. Los embriones cigóticos atraviesan por diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón, torpedo y cotiledonario), y entran en dormancia, hasta que las condiciones son óptimas para la germinación, el crecimiento y el desarrollo de la plántula. El endospermo se encuentra presente durante la formación de la semilla y proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión y/o para la germinación. De igual manera, se observa la estructura conocida como suspensor, que se muestra en los estadios globular, corazón y torpedo. Este tejido se encuentra formado por pocas células y su función es proporcionar nutrientes provenientes del tejido materno (Zimmerman, 1993).

En la figura 1.2 se muestran las etapas características del desarrollo del embrión cigótico.

Por otra parte, la reproducción asexual es el proceso en el que no se lleva a cabo la fusión de los gametos. Este tipo de reproducción es característico de animales inferiores, microorganismos y plantas. En las plantas, este tipo de reproducción puede ser por propagación vegetativa, por agamosperimia o por embriogénesis somática (Rhagavan y Sharma, 1995).

La propagación vegetativa es la multiplicación masiva de un individuo, originalmente obtenido a partir de un cigoto, en unidades espacialmente separadas conocidas como rametos. En casi todos los casos, los rametos son modificaciones de estructuras preexistentes en el individuo original. Un ejemplo de estas modificaciones son los rizomas y los estolones; ambos son tallos modificados con crecimiento subterráneo.

La agamosperimia es la producción de semillas fértiles, sin la fusión de los gametos, a partir de las células que no son sexuales y que forman parte de los órganos reproductivos. En algunos casos, los embriones pueden formarse mediante un proceso conocido como androgénesis, a partir de la microespora (Richards, 1990). En otros casos los embriones pueden formarse a partir de células de la nucela o del integumento del óvulo o a partir del saco embrionario que se ha formado por mitosis o por meiosis no reduccional (Dodeman et al., 1997). En este proceso, se requiere la formación del endospermo para el desarrollo exitoso del embrión. En la mayoría de los casos, el endospermo es formado por la fertilización de una célula del saco embrionario tetraploide y una célula espermática haploide. Sin embargo, existen algunas excepciones, en las que la célula del saco embrionario es diploide y se fusiona con una célula espermática diploide (Richards, 1990). De igual manera se han reportado casos en los que el endospermo se forma de manera autónoma (Dodeman et al., 1997).

Por otro lado, la embriogénesis somática es la producción de embriones fértiles, sin la fusión de los gametos, a partir de células somáticas. En la naturaleza, se ha observado la formación espontánea de embriones somáticos en el borde de las hojas de plantas de géneros como *Kalanchoe* y *Ranunculus*. También se han obtenido embriones somáticos de una amplia variedad de especies vegetales utilizando condiciones *in vitro* (Yeung, 1995).

Los embriones somáticos presentan programas de desarrollo similares a los de los embriones cigóticos, sin embargo, existen algunas diferencias entre ellos. Después de las primeras divisiones de la célula embrionaria, los embriones somáticos parecen no presentar la formación del suspensor (Halperin, 1995). Sin embargo, existen algunos reportes, durante la embriogénesis somática de *Daucus carota*, que muestran la presencia de una estructura con características parecidas a éste, aunque no se mostraron evidencias de su funcionalidad (Yeung y Meinke, 1993). Durante la embriogénesis somática en café también se ha observado la aparición de una estructura parecida al suspensor (Quiroz et al., 2002).

Embriogénesis somática



Figura 1.3. Diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos. Mediante inducción experimental, se pueden obtener embriones fértiles a partir de células somáticas. Los embriones somáticos presentan etapas similares a las observadas en los embriones cigóticos. Sin embargo, los embriones somáticos no atraviesan por una etapa de quiescencia, no presentan fenómenos de dormancia y carecen de endospermo (Zimmerman, 1993).

Por otra parte, los embriones somáticos no atraviesan por el periodo de dormancia característico de los embriones cigóticos y tampoco presentan formación del endospermo (Dudits et al., 1995). En la figura 1.3 se muestran las etapas características del desarrollo de los embriones somáticos.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *IN VITRO*

De acuerdo con Ammirato (1983), a finales de la década de los 70's ya era posible inducir la embriogénesis somática *in vitro* de 132 especies vegetales procedentes de 32 familias y 81 géneros diferentes. Este logro ha permitido llegar a la conclusión de que existen múltiples factores que influyen en este proceso. Entre ellos se mencionan el tipo de explante, el genotipo, el estadio fisiológico y la edad de la planta donadora (Litz, 1984) además de las condiciones de cultivo *in vitro*. Estas condiciones son variables, si bien, en la mayoría de los casos se ha utilizado el medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962) o una de sus modificaciones (Evans et al., 1981) para la obtención de cultivos embriogénicos y/o el desarrollo y germinación de los embriones somáticos.

También, se ha observado la importancia de la concentración de los reguladores de crecimiento, generalmente auxinas y citocininas, en la inducción de la embriogénesis y en el desarrollo de los embriones (Golberg et al., 1994).

Desde el punto de vista biotecnológico, la embriogénesis somática brinda múltiples posibilidades. Algunas de ellas son el establecimiento de nuevas plantaciones o la resiembra de plantaciones maduras con individuos con características agronómicas específicas al igual que la producción de nuevas variedades y la propagación de híbridos. De igual manera, permite regenerar plantas transgénicas a partir de células individuales transformadas genéticamente.

Por otra parte, la embriogénesis somática puede ser un sistema muy útil para determinar los posibles mecanismos que regulan las etapas del desarrollo embrionario

en las plantas. Este proceso puede ser inducido en condiciones *in vitro*, lo que representa una importante ventaja en comparación con la embriogénesis cigótica, en la que se ha observado que uno de los mayores obstáculos para el estudio detallado de los eventos que dirigen las etapas de la formación de los embriones, es su relativa inaccesibilidad para la manipulación experimental (Anil et al., 2000).

Una pregunta muy importante es ¿cómo las señales de la superficie celular modulan los procesos intracelulares que conducen a la diferenciación morfológica de los embriones a partir de células somáticas?

Para poder encontrar la respuesta a esta interrogante, en los últimos años, varios grupos de investigación se han enfocado al estudio de las posibles rutas de transducción de señales involucradas en la regulación de este proceso.

ESTUDIOS QUE INVOLUCRAN COMPONENTES DE LAS RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La transducción de señales es el área de la biología que se enfoca en el estudio de cómo el medio ambiente extracelular es interpretado para regular las respuestas celulares (Kapeller y Cantley, 1994). Una señal extracelular o primer mensajero es percibida por su receptor específico, localizado generalmente en la superficie exterior de la membrana plasmática y transducida, a través de ella, hacia el citoplasma por un mecanismo de amplificación, en el que intervienen una serie de moléculas encargadas de producir los compuestos conocidos como segundos mensajeros, los cuales son los encargados de activar las respuestas intracelulares.

En el mecanismo de amplificación intervienen un sistema regulador y un sistema efector. El sistema regulador se encarga de modular la funcionalidad del receptor y el sistema efector se encarga de la generación de los segundos mensajeros (Alberts et al., 1994).

Proteína parecida a receptor con actividad de cinasa de la embriogénesis somática (SERK)

En 1997, se reportó la presencia de una proteína parecida a un receptor con actividad de cinasa, durante la inducción de la embriogénesis somática de *Daucus carota* (Schmidt et al., 1997). En este modelo se aisló un gen que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos rica en leucina y con actividad de cinasa, la cual se identificó como *DcSERK* (proteína parecida a receptor con actividad de cinasa de la embriogénesis somática, por sus siglas en inglés) y se estableció como un posible marcador de la transición de células somáticas competentes a células embriogénicas debido a que los embriones se formaron únicamente a partir de las células que expresaron SERK (Schmidt et al., 1997).

De igual manera, se analizó la expresión de *DcSERK* durante la embriogénesis cigótica, con el objetivo de determinar si existía alguna relación entre el proceso normal de formación de los embriones cigóticos y lo que se había observado durante la embriogénesis somática. Los resultados mostraron que la expresión de *DcSERK* se lleva a cabo en las primeras etapas de formación del embrión cigótico y se mantiene así hasta la etapa globular, por lo que los autores propusieron que, al menos en zanahoria, la posible ruta de transducción de señales que es activada durante la adquisición de la competencia embriogénica de las células somáticas y durante la embriogénesis cigótica, después de la fertilización, podría ser la misma (Schmidt et al., 1997).

En trabajos mas recientes, se encontraron varias secuencias parecidas a SERK en la base de datos del genoma de *Arabidopsis*, de las cuales *AtSERK1* es la que está más relacionada con *DcSERK*. De igual manera, se determinó que este gen se expresa principalmente durante la megaesporogénesis, en el núcleo de los óvulos en desarrollo, en la megaespora funcional y en todas las células del saco embrionario antes de la fertilización. Después de la fertilización, la expresión de *AtSERK* se detectó en todas las células del embrión cigótico, en las del embrión globular y en las del

embrión en estadio de corazón. Por otra parte, no se detectó la expresión de este gen en los estadios tardíos del desarrollo embrionario, ni en ninguna otra parte de la semilla. En estudios realizados durante la embriogénesis somática, se determinó que *AtSERK* se expresa de manera importante durante la formación de la célula embrionaria y durante los estadios tempranos de la embriogénesis somática (Hecht et al., 2001). En este mismo trabajo, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *AtSERK* en la iniciación de la embriogénesis somática. Los resultados muestran que no se alteró el fenotipo de las plántulas transformadas y la eficiencia de iniciación de la embriogénesis aumentó de 3 a 4 veces (Hecht et al., 2001). Con base en estos resultados, varios autores (Schmidt et al., 1997; Hecht et al., 2001; Shah et al., 2001) proponen que *SERK* podría ser un componente importante de la ruta de transducción de señales de la embriogénesis.

En estudios realizados de manera paralela y utilizando otros modelos, se han encontrado evidencias, durante la embriogénesis somática, de la presencia de la actividad de proteínas G (Nato et al., 2000), de proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs) (Anil et al., 2000) y de proteínas cinasas de tirosina (Barizza et al., 1999; Islas-Flores et al., 2000). Estas proteínas son también componentes de rutas de transducción de señales y se les han atribuido funciones importantes en varios procesos celulares.

Proteínas G

Las proteínas G son componentes de algunas rutas de transducción de señales. Tienen la capacidad de hidrolizar GTP, por lo que su actividad enzimática es de GTPasa, además de que se clasifican en heterotriméricas, cuando están constituidas de tres subunidades y en proteínas G de bajo peso molecular, las cuales son monoméricas. Estas proteínas se encuentran involucradas en las rutas de señalización reguladas por giberelinas, ácido abscísico y auxinas (Millner, 2002), en las respuestas de defensa de los vegetales (Legendre et al., 1992) y en la regulación de la actividad de canales iónicos (Li y Assmann, 1993).

Durante la embriogénesis somática de *Triticum aestivum* L., se inmunodetectaron proteínas solubles de entre 22 y 48 kDa utilizando anticuerpos policlonales que reconocen la subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas también tuvieron actividad de GTPasa. El número y la masa molecular de las proteínas encontradas fue cambiando con las condiciones de inducción de la embriogénesis, lo cual sugiere que podrían tener alguna función importante en las cascadas de señalización que participan en los procesos del desarrollo vegetal (Nato et al., 2000).

Proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs)

Las proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs) son proteínas que necesitan de la presencia de Ca^{2+} para transferir el fosfato y del ATP a otras proteínas. A las CDPKs se les ha relacionado con varios procesos, entre ellos la formación del tubérculo en papa (MacIntosh et al., 1996) y durante las respuestas inducidas por ácido giberélico en la aleurona de cebada (Ritchie y Gilroy, 1998). La expresión de estas proteínas se induce por diferentes condiciones ambientales, como el ambiente salino (Botella et al., 1996) u osmótico (Pestenacz y Erdéi, 1996) y por fitohormonas, metil-jasmonato, daño mecánico e inductores fúngicos (Yoon et al., 1999).

Durante la embriogénesis somática, se han encontrado dos CDPKs, una de 55 kDa y otra de 60 kDa, en cultivos embriogénicos de *Santalum album* (Anil et al., 2000). Los resultados muestran que el nivel de expresión (a nivel de proteína) y la actividad de estas CDPKs de *Santalum album* (swCDPKs) es diferente en cada uno de los estadios de desarrollo analizados, lo cual sugiere que estas proteínas se encuentran involucradas de alguna manera en este proceso (Anil et al., 2000).

Proteínas cinasas de tirosina

Las proteínas cinasas de tirosina son proteínas que transfieren el fosfato γ del ATP a residuos de tirosina que se encuentran presentes en las proteínas que les sirven de sustrato. En células animales, las proteínas cinasas de tirosina intervienen en los eventos iniciales de respuesta a señales mitogénicas y han sido relacionadas particularmente en la regulación de la división y diferenciación celular (Alfaro-López et al., 1998). En plantas, existen algunos reportes en los que se muestran evidencias de la presencia y actividad de estas proteínas en diferentes organismos (Rodríguez-Zapata y Hernández-Sotomayor, 1998; Islas-Flores et al., 2000).

En estudios realizados durante la embriogénesis cigótica de *Cocos nucifera* L. se observó un patrón característico de actividad de proteínas cinasas de tirosina. Durante los primeros estadios de la embriogénesis, la actividad aumenta hasta llegar al estadio de maduración (Islas-Flores et al., 1998). Con base en estos resultados, se midió la actividad de estas proteínas durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática. Los resultados muestran que la mayor actividad se encuentra en el callo embriogénico que se formó durante el proceso de inducción y que ésta fue disminuyendo a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro*. Estos resultados sugieren que de alguna manera, la fosforilación en tirosina está relacionada con el proceso de inducción de la embriogénesis somática (Islas-Flores et al., 2000).

Por otra parte, en estudios realizados en cultivos de *D. carota* L. se encontró un patrón de fosforilación de tirosina diferente en tejidos de plantas adultas y en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos. De igual manera, al utilizar tirfostina A25, un inhibidor de la fosforilación en tirosina, en experimentos *in vivo*, se bloqueó la formación de embriones somáticos. Estos resultados sugieren, igualmente, un papel de la fosforilación en tirosina en el control de estadios específicos del desarrollo vegetal (Barizza et al., 1999).

Por todo lo anterior, se puede concluir que se han obtenido avances importantes en el estudio de los posibles mecanismos involucrados en la regulación de la inducción de la embriogénesis somática y durante el desarrollo embrionario; sin embargo, existen muchas otras rutas que todavía no han sido analizadas. Una de ellas es la conocida como ruta de los fosfoinosítidos, en la que se generan algunos de los segundos mensajeros más conocidos y que se encuentran involucrados en el crecimiento y la respuesta a señales extracelulares (Fruman et al., 1998).

RUTA DE LOS FOSFOINOSÍTIDOS

¿Qué son los fosfoinosítidos?

Los fosfoinosítidos son derivados fosforilados del fosfatidilinositol, el cual es un tipo de fosfolípido que se encuentra presente en todas las membranas biológicas. Estos compuestos son derivados del ácido fosfatídico y se les da el nombre de acuerdo con el compuesto presente en su cabeza polar. En la figura 1.4 se muestran las estructuras químicas de algunos fosfolípidos como el ácido fosfatídico, la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol.

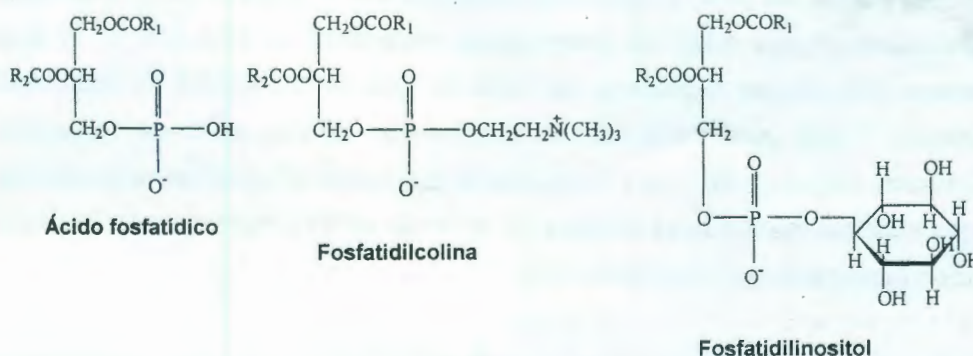


Figura 1.4. Estructura química de algunos fosfolípidos.

El fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados (fosfoinosítidos), como el fosfatidilinositol 4-monofosfato y el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato son componentes de la membrana plasmática de todas las células eucarióticas y constituyen cerca del 0.5% y 0.2% respectivamente del total de los fosfolípidos en las células animales. Las algas tienen niveles de alrededor del 0.45% y 0.3% respectivamente. En las plantas, los niveles de estos fosfoinosítidos son del 0.3% y de menos del 0.02% respectivamente (Coté y Crain, 1993). Además de estos fosfoinosítidos, las células animales también contienen fosfoinosítidos con un grupo fosfato unido al carbono en la posición 3 del anillo de inositol; estos productos son el fosfatidilinositol 3-monofosfato, el fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato, el fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato y el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato.

Síntesis de los fosfoinosítidos

En las plantas y en los animales, la ruta de los fosfoinosítidos está involucrada en la percepción y la transducción de estímulos externos. El fosfatidilinositol (PI) es el sustrato inicial para la síntesis de todos los demás fosfoinosítidos.

El PI se sintetiza por la condensación de la citidina 5-monofosfato-ácido fosfatídico (CMP-PA) y el inositol libre; los productos obtenidos son el fosfatidilinositol y la citidina 5-monofosfato (Figura 1.5a). Un intermediario importante de esta ruta es el ácido fosfatídico (PA), el cual representa del 1-2% del total de fosfolípidos en cada célula eucariótica y está involucrado, en su mayoría, en la biosíntesis de fosfolípidos estructurales (Figuras 1.5b, 1.5c y 1.5d), misma que ocurre en el retículo endoplásmico y en los plástidos, en donde se sintetiza por acilación secuencial del glicerol 3-fosfato y del ácido lisofosfatídico (LPA; Figura 1.5a).

Los fosfoinosítidos son sintetizados a partir del PI por la actividad secuencial de fosfatidilinositol cinasas y fosfatidilinositol fosfatasas específicas (Figura 1.7)

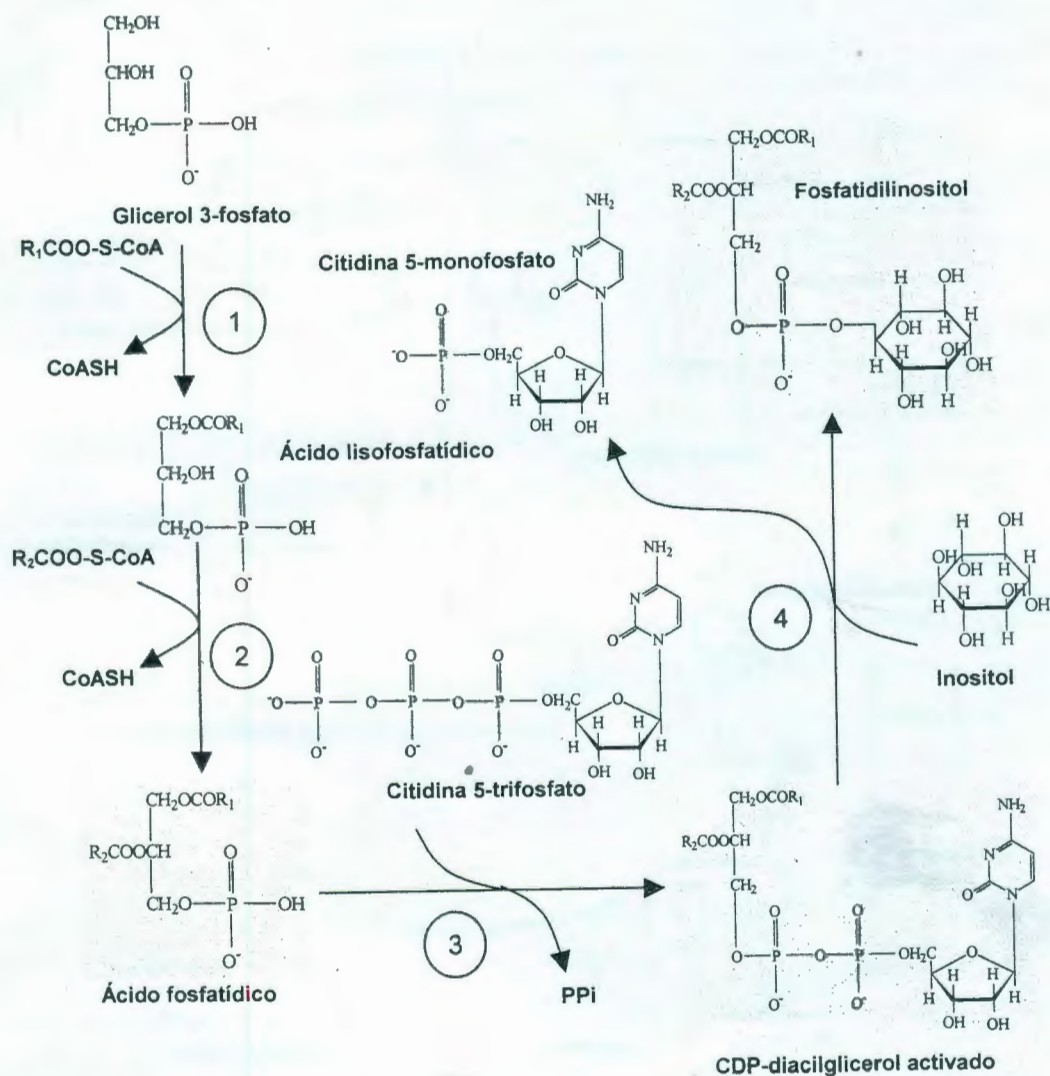


Figura 1.5a. Síntesis del fosfatidilinositol (PI) en células vegetales. El ácido fosfatídico (PA) es la estructura básica de todos los fosfolípidos. Éste es sintetizado, en el retículo endoplásmico y los plástidos, por acilación secuencial del glicerol 3-fosfato y del ácido lisofosfatídico (LPA). El fosfatidilinositol (PI) es sintetizado por la vía de la citidina 5-monofosfato-ácido fosfatídico (CMP-PA). Las enzimas de la ruta son 1) Glicerol 3-fosfato aciltransferasa (EC 2.3.1.15), 2) Aciltransferasa (EC 2.3.1.15), 3) CDP: diacilglicerol citidiltransferasa (EC 2.7.7.41) y 4) Fosfatidilinositol sintetasa (EC 2.7.8.11). Tomado de Somerville et al. (2000).

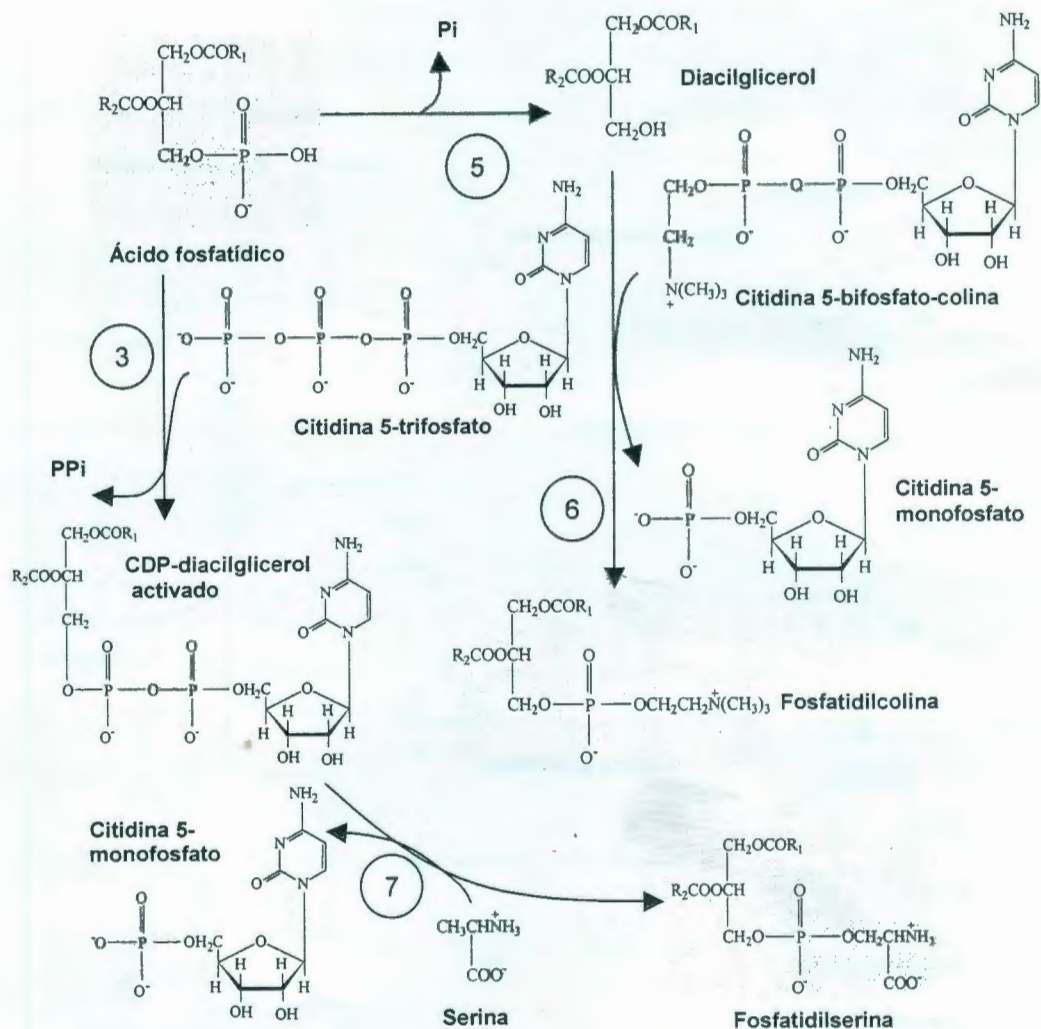


Figura 1.5b. Síntesis de los fosfolípidos en células vegetales. La fosfatidilserina (PS) es sintetizada por la vía del CMP-ácido fosfatídico y la fosfatidilcolina (PC) es sintetizada por la vía del diacilglicerol (DAG). Las enzimas de la ruta son 3) CDP: diacilglicerol citidiltransferasa (EC 2.7.7.41), 5) Fosfatidato fosfohidrolasa (EC 3.6.1.7), 6) Fosfatidilcolina sintetasa (EC 2.7.8.24) y 7) Fosfatidilserina sintetasa (EC 2.7.8.8). Tomado de Somerville et al. (2000).

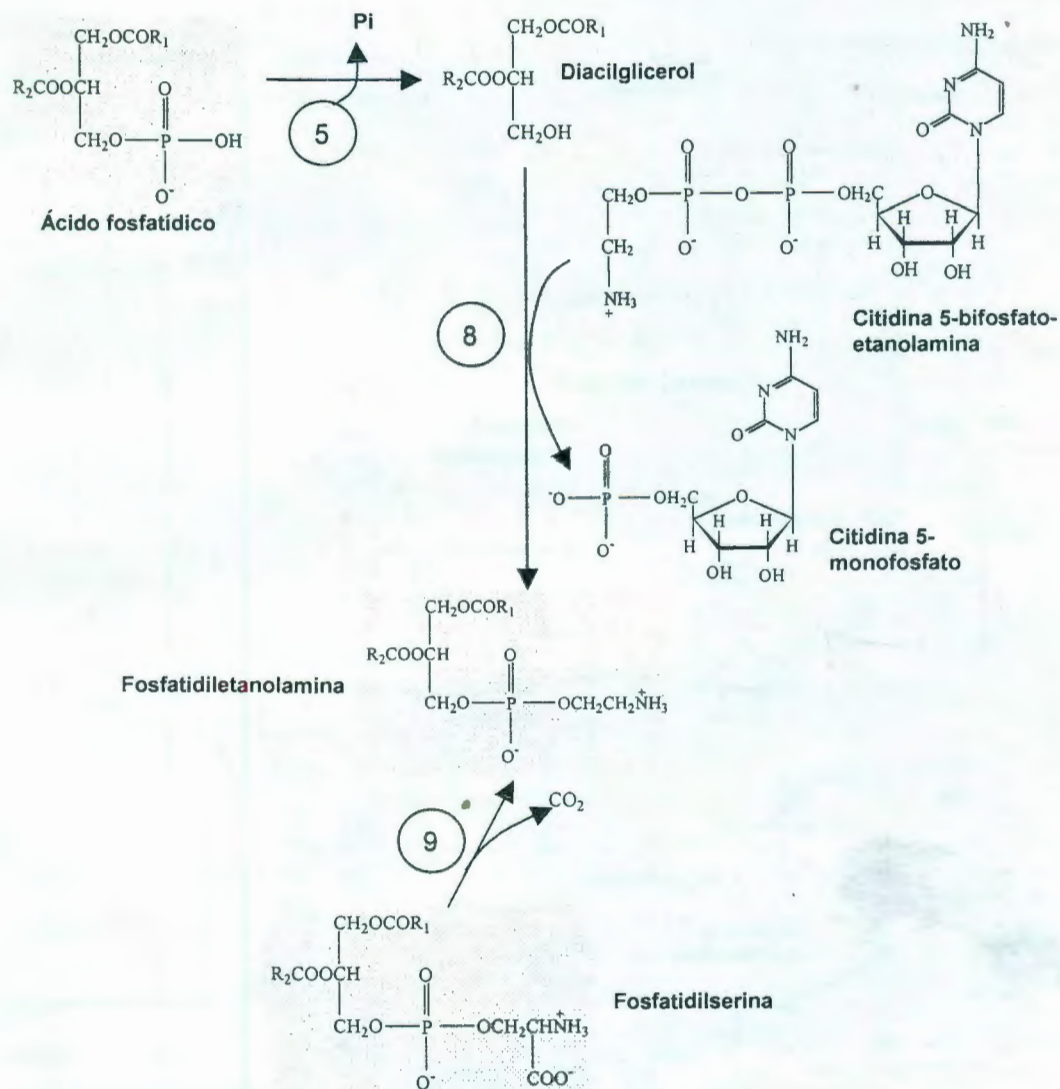


Figura 1.5c. Síntesis de los fosfolípidos en células vegetales. La fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilcolina (PC) son sintetizados por la vía del diacilglicerol (DAG) con la transferencia del grupo funcional de un citidin difosfato-aminoalcohol (figura 1.5b). Otra ruta alternativa de síntesis de PE es la descarboxilación de PS. Las enzimas de la ruta son 5) Fosfatidato fosfohidrolasa (EC 3.6.1.7), 8) Citidina 5-bifosfato-etanolamina: 1,2-diacilglicerol etanolamina-fosfotransferasa (EC 2.7.8.1) y 9) Fosfatidilserina descarboxilasa (EC 4.1.1.64). Tomado de Somerville et al. (2000).

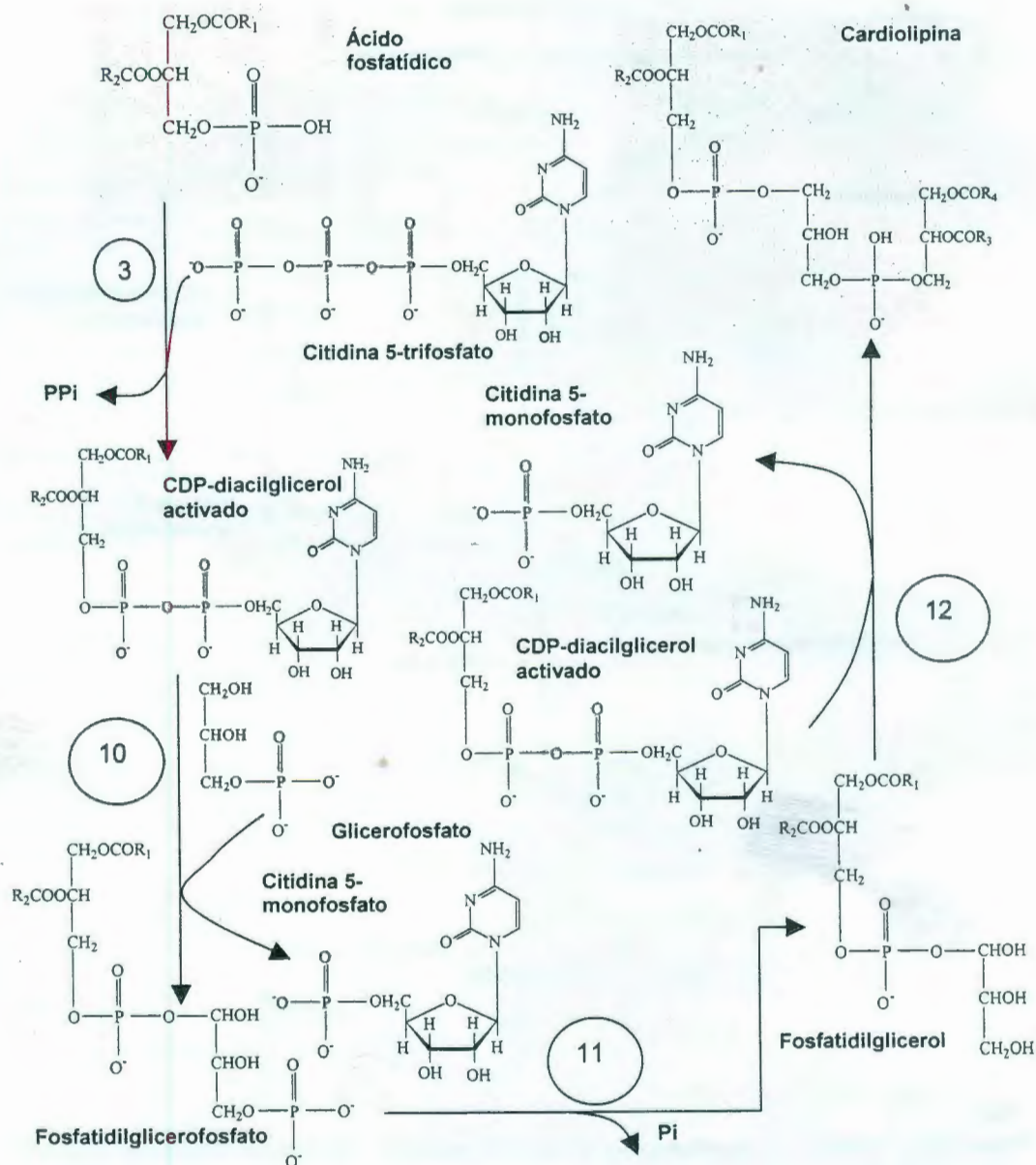


Figura 1.5d. Síntesis de los fosfolípidos en células vegetales. La cardiolipina es sintetizada por la vía de la citidina 5-monofosfato-ácido fosfatídico. Las enzimas de la ruta son 3) CDP: diacilglicerol citidiltransferasa (EC 2.7.7.41), 10) Fosfatidil glicerol-fosfato sintetasa (EC 2.7.8.5), 11) Fosfatidil glicerol-fosfato fosfatasa (EC 3.1.3.27) y 12) Difosfatidilglicerol sintetasa. Tomado de Somerville et al. (2000).

Sin embargo, la ruta que se muestra en la figura 1.5a no es la única para la síntesis del PA. Existen otras en las que intervienen componentes de rutas de transducción de señales. Una de ellas involucra a una fosfolipasa C, la cual hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato para generar dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). El DAG es entonces fosforilado por una DAG cinasa (DGK) para sintetizar el PA (Figura 1.6A). Otra ruta de síntesis involucra a una fosfolipasa D, la cual hidroliza fosfolípidos estructurales como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina para sintetizar el PA (Figura 1.6B; Munnik, 2001)

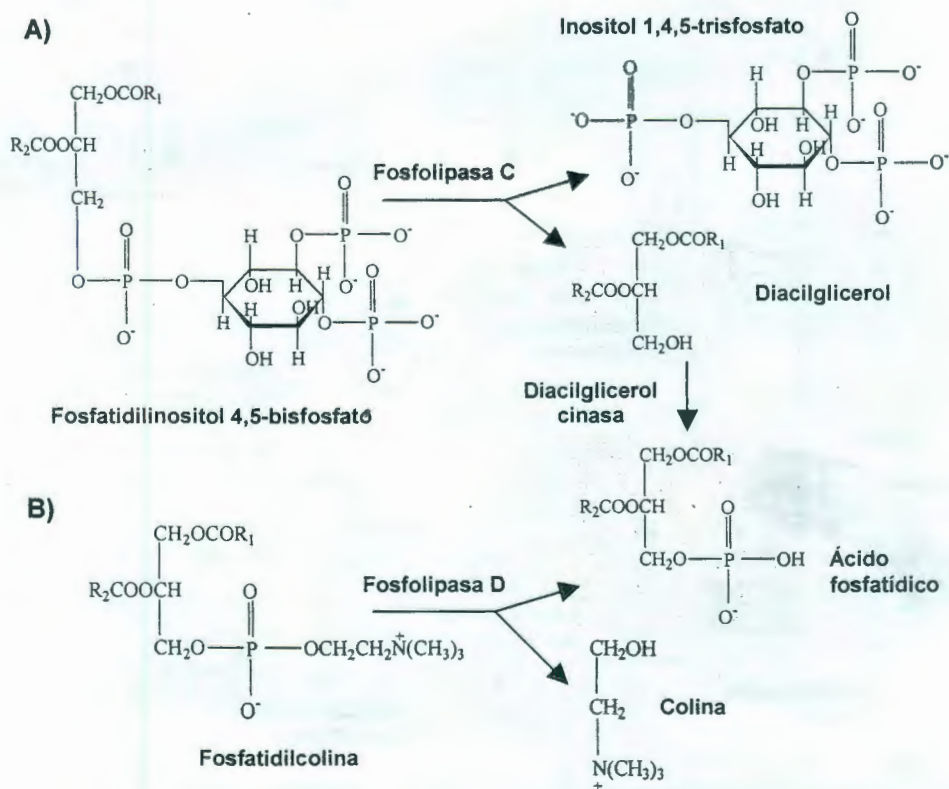


Figura 1.6. Rutas alternativas de síntesis del ácido fosfatídico (PA). **A)** Ruta donde se sintetiza el diacilglicerol (DAG) por la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato catalizada por una fosfolipasa C (EC 3.1.4.3). Posteriormente DAG es rápidamente fosforilado por la diacilglicerol cinasa (DGK; EC 2.7.1.107) para formar el PA. **B)** Ruta donde está involucrada una fosfolipasa D (PLD; EC 3.1.4.4), la cual hidroliza lípidos estructurales como la fosfatidilcolina (PC) para sintetizar el PA (Munnik, 2001).

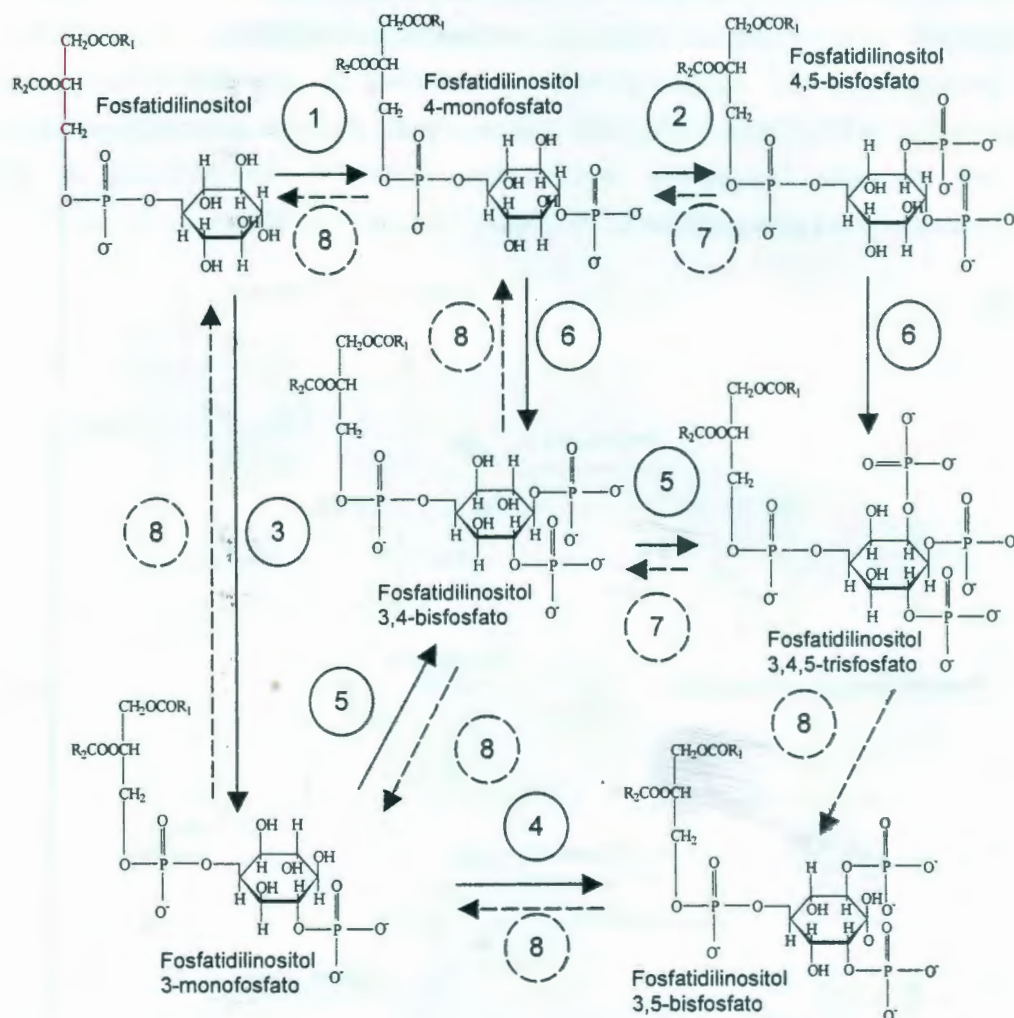


Figura 1.7. Síntesis de los fosoinositidos en células eucariotes. El fosfatidilinositol (PI) es el sustrato inicial. Las enzimas de la ruta son 1) Fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K; EC 2.7.1.67), 2) Fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K; EC 2.7.1.68), 3) Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K-clase III; EC 2.1.7.137), 4) Fosfatidilinositol monofosfato cinasa (PIPK tipo I), 5) Fosfatidilinositol monofosfato cinasa (PIPK tipo II), 6) Fosfoinositido 3-cinasa (clases I y II; EC 2.1.7.137), 7) Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 5-fosfatasa (Inp5) (EC 3.1.3.36) y 8) Inositol polifosfato fosfatasa (EC 3.1.3.56). Tomado de Fruman et al. (1998).

Sistema de los fosfoinosítidos

El sistema de los fosfoinosítidos fue descubierto en células de mamífero en el inicio de la década de los 80's y desde entonces se han encontrado evidencias de que éste se encuentra presente en la mayoría, si no es que en todas las células eucariotes (Berridge e Irvine, 1989). En este sistema, los fosfoinosítidos continuamente son formados y degradados por cinasas y fosfatasas específicas.

En modelos animales, el sistema se encuentra regulado por la interacción de un agonista con su receptor específico. Una vez formado el complejo agonista-receptor, se activa la fosfolipasa C. Esta enzima hidroliza al PI 4,5-P₂ y se producen dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). El IP₃ activa la liberación de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ y el DAG modula la actividad de la proteína cinasa dependiente de fosfolípidos (PKC). El incremento en la concentración del Ca²⁺ citosólico y la activación de la PKC conduce a la activación de un sistema de comunicación intracelular multicomponente el cual será inactivado cuando el complejo agonista-receptor sea disociado, la fosfolipasa C sea inactivada y/o los niveles intracelulares de IP₃ y DAG disminuyan (Drobak, 1993).

En plantas, la mayoría de los componentes de este sistema han sido encontrados y muestran características estructurales y funcionales equivalentes a las encontradas en animales.

Función de los fosfoinosítidos en diferentes organismos

Los fosfoinosítidos han despertado mucho interés debido a que se han visto involucrados en muchos procesos fisiológicos importantes. En los cuadros 1.1a y 1.1b se muestran algunos ejemplos.

Cuadro 1.1a. Procesos fisiológicos en que se han visto involucrados los fosfoinosítidos.

Proceso	Modelo	PI 3-P	PI 4-P	PI 5-P	PI 4,5-P ₂	PI 3,4-P ₂	PI 3,5-P ₂	PI 3,4,5-P ₃	Referencia
Tráfico vesicular	Células de mamíferos	x			x		x	x	De Camilli et al., 1996
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	x							Odorizzi et al., 2000
	Células de tabaco	x	x						Matsuoka et al., 1995
Señalización celular	Plaquetas de humano	x				x			Benfic et al., 1998a
						x		x	Benfic et al., 1998b
Dinámica del citoesqueleto	Células de mamíferos (COS-7)				x				Ishihara et al., 1998
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				x				Homma et al., 1998
	Células en suspensión de zanahoria	x							Dove et al., 1994
Exocitosis	Células de mamífero (PC12)				x				Beck y Keen, 1991
					x				Loyet et al., 1996
Endocitosis	Células de mamífero (NIH-3T3)				x				Davis et al., 1997

Los fosfoinosítidos fosfatidilinositol 3-monofosfato (PI 3-P), fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI 4-P), fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5-P₂), fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI 3,4-P₂) y fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PI 3,5-P₂) se han encontrado en levaduras, células animales, algas y en células vegetales (Munnik et al., 1998). En células animales y vegetales se detectó recientemente el fosfatidilinositol 5-monofosfato (PI 5-P), pero aún no se conoce claramente su función (Meijer et al., 2001). El fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PI 3,4,5-P₃) únicamente se ha detectado en células animales (Fruman et al., 1998).

Cuadro 1.1b. Procesos fisiológicos en que se han visto involucrados los fosfoinosítidos.

Proceso	Modelo	PI 3-P	PI 4-P	PI 5-P	PI 4,5-P ₂	PI 3,4-P ₂	PI 3,5-P ₂	PI 3,4,5-P ₃	Referencia
Regulación de la actividad de proteínas	Plaquetas de humano				x	x	x	x	Yamamoto et al., 1990
	Hipocótilos de girasol		x		x				Memon y Boss, 1990
	Células en suspensión de zanahoria		x		x				Coté y Crain, 1993
Localización intracelular de proteínas	Células de mamífero (NIH-3T3)		x		x	x		x	Franke et al., 1997
Regulación de la transcripción	<i>Glicine max</i>	x							Bunney et al., 2000
Morfogénesis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	x							Welters et al., 1994
	<i>Glicine max</i>	x							Hong y Verma, 1994
Respuesta a estrés osmótico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	x							Dove et al., 1997
	Células de mamífero (COS-7)						x		
							x		Meijer et al., 1999
	<i>Chlamydomonas</i>			x					Meijer et al., 2001

La mayor parte de los estudios reportados se han realizado en sistemas animales. Sin embargo, aunque en las plantas existe relativamente poca información acerca de la función de los fosfoinosítidos, en los últimos 10 años ésta se ha incrementado. Existen evidencias de que estímulos físicos y químicos como la luz, las hormonas (Zbell y Walter-Back, 1988; Grabowski et al., 1991), el choque osmótico, el choque térmico (Gawer et al., 1999) y los inductores fúngicos (Toyoda et al., 1993) son capaces de inducir cambios en los niveles de estos compuestos.

El PI 3-P tiene un papel esencial en la liberación, mediada por vesículas, de enzimas de la vacuola. Además, se han encontrado evidencias de que se encuentra asociado a la matriz nuclear en soya, lo que sugiere una posible función en procesos asociados a la expresión genética (Bunney et al., 2000).

El PI 4-P, funciona como sustrato para la síntesis del PI 4,5-P₂, además, se ha encontrado que modula la actividad *in vitro* de la ATPasa de membrana plasmática sensible a vanadato (Coté y Crain, 1993). Por otra parte, se han encontrado diferentes pozos intracelulares de este fosoinositido, por lo que podría tener diferentes funciones fisiológicas de acuerdo a su localización. (Stevenson et al., 2000).

El PI 4,5-P₂, se ha asociado, de igual manera que el PI 4-P, con la modulación de la actividad *in vitro* de la ATPasa de membrana plasmática (Coté y Crain, 1993). Este compuesto ha sido ampliamente conocido como sustrato de la fosfolipasa C para la generación del IP₃ y del DAG (Brearley et al., 1997), los cuales se modifican como respuesta a múltiples señales extracelulares, entre ellas hormonas vegetales, estrés osmótico y estrés salino (Heilmann et al., 1999). Además, se han encontrado evidencias que sugieren que el PI 4,5-P₂ podría tener un papel importante en la dinámica del citoesqueleto (Dove et al., 1994), en el tráfico vesicular y en el transporte de iones (Matsuoka et al., 1995; Stevenson et al., 2000).

Respecto al PI 3,4-P₂ de plantas, aún no se conoce alguna función específica, sin embargo, se ha encontrado que la concentración de este compuesto es mayor que la del PI 4,5-P₂ en células guarda de *Commelina communis* (Parmar y Brearley, 1995). Por otra parte, el PI 3,5-P₂ se detectó recientemente en células vegetales y los resultados obtenidos indican que posiblemente tiene una función importante en la respuesta a cambios osmóticos (Dove et al., 1997). En *Chlamydomonas* se encontró que su concentración aumenta rápidamente como respuesta a estrés hiperosmótico (Meijer et al., 1999).

Debido a las evidencias anteriores, que sugieren un papel importante de estos compuestos en sistemas vegetales, el interés se ha centrado en el estudio de las enzimas que los sintetizan. La mayor parte de los estudios reportados se ha enfocado en las fosoinositido cinasas.

Fosfoinosítido cinasas

Las fosfoinosítido cinasas catalizan la transferencia del fosfato γ del ATP hacia los fosfoinosítidos. En la figura 1.8 se muestra la ruta de síntesis del PI 4-P y del PI 4,5- P_2 . En esta figura se muestran los nombres y las reacciones catalizadas por las fosfoinosítido cinasas involucradas en la síntesis de estos fosfoinosítidos.

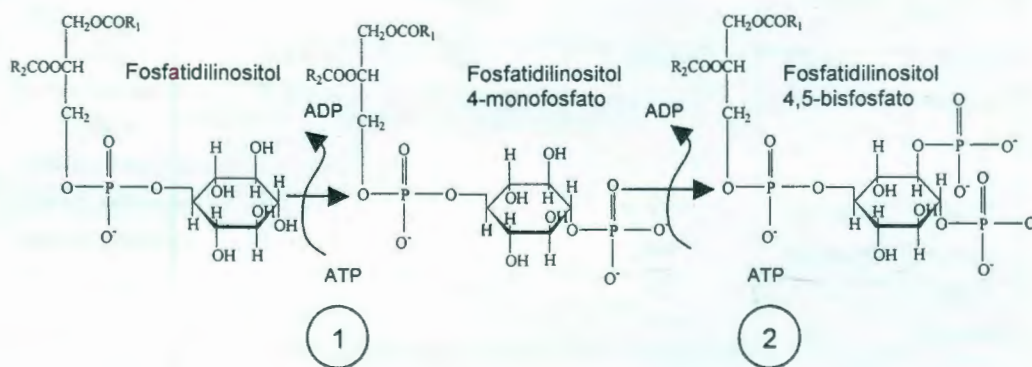


Figura 1.8. Síntesis del fosfatidilinositol 4-monofosfato y del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato mediante la actividad de fosfoinosítido cinasas. El fosfatidilinositol (PI) es el sustrato inicial. La ruta de síntesis del PI 4,5- P_2 se lleva a cabo por fosforilación secuencial. 1) Primero se sintetiza el PI 4-P por la enzima fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K; EC 2.7.1.67). 2) Después, el PI 4-P se fosforila en la posición 5 por la enzima fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K; EC 2.7.1.68).

Las fosfoinosítido cinasas de levadura y de mamíferos han sido ampliamente estudiadas. En el cuadro 1.2 se muestran algunas propiedades de miembros de la familia de la PI3K (EC 2.1.7.137) encontrados en células de mamíferos.

Cuadro 1.2. Propiedades de las PI3Ks de mamíferos.

Enzima	Subunidades catalíticas		Subunidades regulatorias	Sustratos <i>in vitro</i>	Inhibidores IC ₅₀ (nM)
	Isoformas	Peso molecular (kDa)			
PI3K clase IA	p110 α	123-110	p85 α , p55 α	PI 4,5-P ₂ ,	Detergentes no iónicos, wortmanina (1-10), Ly294002 (1000)
	p110 β	123-119	p50 α , p85 β	PI 4-P, PI,	
	p110 δ	119-115	p55 γ	PI 5-P	
PI3K clase IB	p110 γ	120-110	p101	PI 4,5-P ₂ , PI 4-P, PI.	Detergentes no iónicos, wortmanina (1-10), Ly294002 (1000)
PI3K clase II	PI3KC2 α	170,210		PI 4,5-P ₂ ,	Wortmanina (50-450), Ly294002 (19000)
	PI3KC2 β	180		PI 4-P, PI.	
PI3K clase III		101	p150	PI	Wortmanina (2-10)

Las PI3Ks de clase III únicamente fosforilan al PI y son las únicas PI3Ks que se han encontrado en células vegetales (Fruman et al., 1998). Se ha demostrado la presencia de la actividad *in vitro* de PI3K en zanahoria (Dove et al., 1994), soya (Hong y Verma, 1994), *Arabidopsis* (Welters et al., 1994) y en las fracciones solubles y membranales de células de tabaco (Matsuoka et al., 1995).

En zanahoria, las actividades específicas en extractos totales, microsomas, membranas plasmáticas y fracciones del citoesqueleto fueron de 1, 3.5, 2.8 y 7.5 picomoles min⁻¹ mg⁻¹, respectivamente (Dove et al., 1994). En *Arabidopsis* se clonó un cDNA que codifica para la PI3K y se denominó A α VPS34 (Welters et al., 1994). Las plantas que expresaron este cDNA en antisentido mostraron una fuerte inhibición de su crecimiento y desarrollo, por lo que estos resultados sugieren que de alguna manera la PI3K es esencial para la planta, sin embargo, la actividad sólo pudo ser detectada después de la sobreexpresión de este cDNA (Welters et al., 1994). También, se han

clonado dos cDNAs que codifican para la PI3K de soya denominados SPI3K-1 y SPI3K-5, cuya expresión fue relacionada con el estado morfológico de los nódulos. La SPI3K-1 fue inducida en las etapas tempranas y la SPI3K-5 en los nódulos maduros (Hong y Verma, 1994).

Por otra parte, la PI4K (EC 2.7.1.67) y la PIP5K (EC 2.7.1.68; ver figura 1.6) han sido ampliamente estudiadas en células animales, levaduras y plantas (Ishihara et al., 1998; Hinchliffe et al., 1998). En el cuadro 1.3 se muestran algunas de sus características.

Cuadro 1.3. Características de las PI4Ks y PIPKs de células animales.

Enzima	Peso molecular (kDa)	Sustratos <i>in vitro</i>	Características
PI4K tipo II	45-55	PI	Estimulada por detergentes no iónicos Inhibida por adenosina (Ki 200-100 μ M) Km para ATP (30-100 μ M) Necesita cationes divalentes Inhibida por Ca^{2+} (0.3-0.4 mM) y wortmanina (150 nM)
PI4K tipo III	(230) (76-80)	PI	Estimulada por Tritón X-100 Km para ATP (250-750 μ M) Inhibida por adenosina (Ki 1.5 mM)
PIPK tipo I	Isoformas α , β y γ (61-68) (70-72)	PI, PI 4-P, PI 3,4-P ₂ , PI 3-P	Inhibida por PI 4,5-P ₂ Estimulada por ácido fosfatídico <i>in vitro</i> Estimulada por espermina Estimulada por Rho (proteína G de bajo peso molecular)
PIPK tipo II	Isoformas α , β y γ (47-53)	PI 5-P, PI 3-P	Inhibida por PI 4,5-P ₂ y heparina

En células vegetales, se ha encontrado la actividad de PI4K en diferentes fracciones celulares, por ejemplo la membrana plasmática, el citoesqueleto, el núcleo y el citosol. Sus actividades cambian como respuesta a diversos tratamientos como inductores fúngicos, enzimas que digieren pared celular, estrés osmótico y luz (Stevenson et al., 2000). También, se han purificado parcial o totalmente varias PI4Ks y en los cuadros 1.4a y 1.4b se muestran algunas de sus características.

Cuadro 1.4a. Características de las PI4Ks citosólicas (fracciones solubles) purificadas de plantas.

Modelo	Características	Referencia
	Fracciones solubles	
<i>Dunaliella parva</i> (células)	500 kDa, pI 5.5-6.6, Mg ²⁺ (30 mM), Ca ²⁺ (10mM) Mn ²⁺ (10mM), pH óptimo 7.8, Km para ATP 390 µM, estimulada por Tritón X-100, inhibida por adenosina, ADP, AMP y fosfatidiletanolamina	Steinert et al., 1994
<i>Daucus carota</i> (células en suspensión)	83kDa, Mg ²⁺ (25-40 mM), Ca ²⁺ no afecta (0.01µM-1mM), Mn ²⁺ (1-5 mM), pH óptimo 8-9, Km para ATP 400-463 µM, estimulada por Tritón X-100, inhibida por adenosina 100 µM, ADP no afecta (> 100 µM)	Okpodu et al., 1995

En años recientes se obtuvieron y caracterizaron un cDNA parcial y un cDNA completo que codifica para la PI4K en *Arabidopsis* (Xue et al., 1999), un cDNA parcial en *Daucus carota* (Stevenson et al., 1998) y otro cDNA parcial en *Solanum tuberosum* (Aitken et al., 1998).

Cuadro 1.4b. Características de las PI4Ks membranales de plantas.

Modelo	Características	Referencia
	Fracción membranal	
<i>Catharanthus roseus</i> (células en suspensión)	500 kDa, pI 5.8, Mg ²⁺ (15 mM), pH óptimo 7.65, Km para ATP 60 µM, Km para PI 35 µM, estimulada por Tritón X-100, Inhibida por adenosina, Co ²⁺ y Cu ²⁺	Hanenberg et al., 1995
<i>Spinacia oleracea</i> (hojas)	Isoforma QI , 120 kDa, Mg ²⁺ (10 mM), Mn ²⁺ (1-2 mM), pH óptimo 7.5, Km para ATP 490 µM, Km para PI 230 µM, Ca ²⁺ inhibe (2mM), estimulada por Tritón X-100, inhibida por wortmanina (7 µM) Isoforma QII , 65 kDa, Mg ²⁺ (20 mM), Mn ²⁺ (1-4 mM), pH óptimo 7.5, Km para ATP 440 µM, Km para PI 35 µM, Ca ²⁺ inhibe (2mM), estimulada por Tritón X-100, inhibida por wortmanina (10 µM)	Westergren et al., 1999

La PIP5K es miembro de la familia de las PIPKs, las cuales difieren en su localización, regulación y especificidad de sustrato (Hinchliffe et al., 1998; Stevenson et al., 2000).

Las PIPKs de tipo I, fosforilan preferentemente al PI 4-P, mientras que las de tipo II tienen alta afinidad por el PI 5-P, sin embargo, ambas fosforilan al PI 3-P en condiciones *in vitro* (Hinchliffe et al., 1998), por lo que también estarían involucradas en la ruta de biosíntesis del PI 3,4-P₂ y el PI 3,5-P₂ (cuadro 1.3).

En cuanto a las PIPKs de plantas, se han detectado sus actividades en varios tejidos y tipos celulares y éstas cambian como respuesta a diferentes condiciones como

hormonas vegetales (Zbell y Walter-Back, 1988; Grabowski et al., 1991), daño mecánico (Gawer et al., 1999), inductores fúngicos (Toyoda et al., 1993) y estrés salino (Heilmann et al., 1999), sin embargo no se ha purificado ninguna de origen vegetal (Stevenson et al., 2000).

Por otra parte, en los últimos años se obtuvo un cDNA que codifica para la PIP5K de *Arabidopsis*. Su secuencia deducida de aminoácidos mostró siete nuevos dominios repetidos ricos en aminoácidos aromáticos y residuos de glicina (Satterlee y Sussman, 1997). La expresión de este cDNA se indujo como respuesta a estrés hídrico y ácido abscísico (Mikami et al., 1998).

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS FOSFOINOSÍTIDO CINASAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En las plantas y en los animales, la ruta de los fosfoinosítidos está involucrada en la percepción y la transducción de estímulos externos. Los fosfoinosítidos funcionan como un depósito de mensajeros moleculares, los cuales son liberados dentro de la célula cuando ciertas señales extracelulares interactúan con sus receptores específicos (Ferguson y Hanley, 1991).

Por otra parte, existen evidencias de estudios realizados utilizando como modelo la embriogenesis somática, donde se han encontrado cambios en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos durante la inducción y el desarrollo de los embriones somáticos (Dutta y Appelqvist, 1991; Liu et al., 1994).

En *Chichorium* se observó un incremento en la concentración de fosfatidilcolina y de fosfatidilinositol durante los primeros días de inducción de la embriogénesis (Blanckaert et al., 2000), sin embargo, no se analizaron los niveles de los demás fosfoinosítidos ni la actividad de fosfoinosítido cinasas.

De igual manera, existen evidencias, en otros organismos, que indican que los fosfoinosítidos intervienen de una u otra manera en la regulación de la división celular, la diferenciación celular y el crecimiento (Divecha e Irvine, 1995; Welters et al., 1994). Por lo tanto, en un proceso como la embriogénesis somática, en donde se requiere de un control preciso de tales eventos (Turner, 1991), los fosfoinosítidos y las fosfoinosítido cinasas podrían estar cumpliendo funciones muy importantes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la fosforilación de los fosfoinosítidos de membrana durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar la metodología para medir la actividad de lípido cinasas utilizando células en suspensión de *Coffea arabica* L.
2. Caracterizar morfológicamente las etapas de la embriogénesis somática en el modelo de estudio.
3. Determinar la actividad de lípido cinasas, en condiciones *in vitro*, de las diferentes etapas de desarrollo embriogénico seleccionadas.
4. Analizar el efecto de diferentes compuestos que modulan la actividad de fosfoinosítido cinasas sobre la embriogénesis somática, en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

Aitken FL, Pical C, Muller-Rober B, Kopka J and Gray JE (1998) Phosphoinositide signal transduction in guard cells. *Biochem Soc Trans* **26**: S397

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD (1994) Cell signaling. En: *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland Publishing Inc., New York, pp. 721-787

Alfaro-Lopez J, Yuang W, Phan CB, Kamath J, Lou Q, Lam KS and Hruby VJ (1998) Discovery of a novel series of potent and selective substrate-based inhibitors of p60^{c-src} protein tyrosine kinase: conformational and topographical constraints in peptide design. *J Med Chem* **41**: 2252-2260

Ammirato PV (1983) Embryogenesis. En: Evans D.A. (ed.) *Handbook of plant cell culture*. Academic Press, New York, pp. 82-123

Anil VS, Harmon AC and Rao KS (2000) Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. *Plant Physiol* **122**: 1035-1043

Banfic H, Tang X, Batty IH, Downes CP, Chen C and Rittenhouse SE (1998a) A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem* **273**: 13-16

Banfic H, Downes CP and Rittenhouse SE (1998b) Biphasic activation of PKB α /Akt in platelets. Evidence for stimulation both by phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, produced via a novel pathway, and by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**: 11630-11637

Barizza E, Lo Schiavo F, Terzi F and Filippini F (1999) Evidence suggesting protein tyrosine phosphorylation in plants depends on the developmental conditions. *FEBS lett* **477**: 191-194

Beck KA and Keen JH (1991) Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem* **266**: 4442-4447

Berridge MJ and Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**: 197-205

Blanckaert A, Belingheri L, Vaseeur J and Hilbert J (2000) Changes in lipid composition during somatic embryogenesis in leaves of *Chichorium*. *Plant Sci* **157**: 165-172

Brearley CA, Parmar PN and Hanke DE (1997) Metabolic evidence for PtdIns(4,5)P₂-directed phospholipase C in permeabilized plant protoplasts. *Biochem J* **324**: 123-131

Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M and Arteca RN (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). *Plant Mol Biol* **30**: 1129-1137

Bunney TD, Watkins AC, Beven A, Shaw PJ, Hernández L, Lomonossoff GP, Shanks M, Peart J and Drobak BK (2000) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with nuclear transcription sites in higher plants. *Plant Cell* **12**: 1679-1687

Coté GG and Crain RC (1993) Biochemistry of phosphoinositides. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 333-356

Davis JN, Rock CO, Cheng M, Watson JB, Ashmun RA, Kirk H, Kay RJ and Roussel MF (1997) Complementation of growth factor receptor-dependent mitogenic signaling by a truncated type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase. *Mol Cell Biol* **17**: 7398-7406

De Camilli P, Emr SD, McPherson PS and Novick P (1996) Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* **271**: 1533-1539

Divecha N and Irvine RF (1995) Phospholipid signaling. *Cell* **4**: 269-278

Dodeman VL, Ducreux G and Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Exp Bot* **48**: 1493-1509

Dove SK, Lloyd CW and Drobak BK (1994) Identification of a phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase in plant cells: association with the cytoskeleton. *Biochem J* **303**: 347-350

Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ and Michell RH (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* **390**: 187-192

Drobak BK (1993) Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol* **102**: 705-709

Dudits D, Györgyey J, Bögre L and Bakó L (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis. En: Thorpe T.A. (ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 267-308

Dutta PC and Appelqvist L (1991) Lipids and fatty acid patterns in developing seed, leaf, root and in tissue culture initiated from embryos of *Daucus carota* L. *Plant Sci* **75**: 177-183

Evans DA, Sharp WR and Flick CE (1981) Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe T.A. (ed.) Tissue culture: methods and applications in agriculture. Academic Press, New York, pp. 45-113

Ferguson JM and Hanley MR (1991) The role of phospholipases and phospholipid-derived signals in cell activation. *Curr Opin Cell Biol* **3**: 202-206

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC and Toker A (1997) Direct regulation of the *Akt* proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**: 665-668

Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507

Gawer M, Norberg P, Chervin D, Guern N, Yaviv Z, Mazliak P and Kader JC (1999) Phosphoinositides and stress-induced changes in lipid metabolism of tobacco cells. *Plant Sci* **141**:117-127

Grabowski L, Heim S and Wagner KG (1991) Rapid changes in the enzyme activities and metabolites of the phosphatidylinositol-cycle upon by growth substances of auxin-starved suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **75**: 33-38

Golberg RB, Paiva GD and Yadegari R (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* **266**: 605-614

Halperin W (1995) *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. En: Thorpe T.A. (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-16

Hanenberg A, Wissing JB and Wagner KG (1995) Properties of phosphatidyl inositol 4-kinase I from suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **112**: 53-63

Hecht V, Vielle-Calzada J, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U and De Vries SC (2001) The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* **127**: 803-816

Heilmann I, Perera IY, Gross W and Boss WF (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* **119**: 1331-1339

Hinchliffe KA, Ciruela A and Irvine RF (1998) PIPkins, their substrates and their products: new functions for old enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1436**: 87-104

Homma K, Terui S, Minemura M, Qadota H, Anraku Y, Kanaho Y and Ohya Y (1998) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J Biol Chem* **273**: 15779-15786

Hong Z and Verma DPS (1994) A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9617-9621

Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y Asano T and Oka Y (1998) Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* **273**: 8741-8748

Islas-Flores I, Oropeza C and Hernández-Sotomayor SMT (1998) Protein phosphorylation during coconut zygotic embryo development. *Plant Physiol* **118**: 257-263

Islas-Flores IR, Chan JL, Oropeza C and Hernández-Sotomayor SMT (2000) Occurrence of phosphorylated proteins and kinase activity in coconut tissues cultured *in vitro* in medium that induces somatic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem* **38**: 825-836

Kapeller R and Cantley LC (1994) Phosphatidylinositol-3-kinase. *Bioessays* **16**: 565-576

Legendre L, Heinsteins PF and Low PS (1992) Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J Biol Chem* **267**: 20140-20147

Li W and Assmann SM (1993) Characterization of a G-protein-regulated outward K^+ current in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 262-266

Liu L, Hammond EG and Wurtele ES (1994) Accumulation of petroselinic acid in developing somatic carrot embryos. *Phytochemistry* **37**: 749-753

Litz RE (1984) *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. *Hortscience* **19**: 715-717

Loyet KM, Kowalchuk C, Chaudhary A, Chen J, Prestwich GD and Martin TFJ (1998) Specific binding of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis. *J Biol Chem* **273**: 8337-8343

MacIntosh GC, Ulloa RM, Raices M and Tellez-Inon MT (1996) Changes in calcium-dependent protein kinase activity in *in vitro* tuberization in potato. *Plant Physiol* **112**: 1541-1550

Matsuoka K, Bassham DC, Raikel NV and Nakamura J (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**: 1307-1318

Meijer HJG, Divecha N, Van den Ende H, Musgrave A and Munnik T (1999) Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta* **208**: 294-298

Meijer HJG, Berrie CP, Urisci C, Divecha N, Musgrave A and Munnik T (2001) Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem J* **360**: 491-498

Memon AR and Boss WF (1990) Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinases and H⁺-ATPase in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *J Biol Chem* **265**: 14817-14821

Mikami K, Katagiri T, Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1998) A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15**: 563-568

Millner PA (2002) Heterotrimeric G-proteins in plant cell signaling. *New Phytologist* **151**: 165-174

Munnik T, Irvine RF and Musgrave A (1998) Phospholipid signaling in plants. *Biochim Biophys Acta* **1389**: 222-272

Munnik T (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* **6**: 227-233

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497

Nato A, Fresneau C, Moursalimova N, De Buyser J, Lavergne D and Henry Y (2000) Expression of auxin and light regulated arrestin-like proteins, G proteins and nucleoside diphosphate kinase during induction and development of wheat somatic embryos. *Plant Physiol Biochem* **38**: 483-490

Odorizzi G, Babst M and Emr SD (2000) Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* **25**: 229-235

Okpodu CM, Gross W, Bukhart W and Boss WF (1995) Purification and characterization of a soluble phosphatidylinositol 4-kinase from carrot suspension culture cells. *Plant Physiol* **107**: 491-500

Parmar PN and Brearley CA (1995) Metabolism of 3- and 4- phosphorylated phosphoinositides and inositol phosphates in stomatal guard cells. *Plant J* **8**: 425-433

Pestenacz A and Erdei L (1996) Calcium-dependent protein kinase in maize and sorghum induced by polyethylene glycol. *Physiol Plant* **97**: 360-364

Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R and Loyola-Vargas VM (2002) Histological studies on ontogenesis, development stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* **20**: 1141-1149

Rhagavan V and Sharma KK (1995) Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. En: Thorpe T.A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 73-116

Richards AJ (1990) Vegetative propagation. En: Richards A.J. (ed.) Plant breeding systems. Great Britain. pp. 370-402

Ritchie S and Gilroy S (1998) Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiol* **116**: 765-776

Rodríguez-Zapata LC and Hernández-Sotomayor SMT (1998) Evidence of protein-tyrosine kinase activity in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Planta* **204**: 70-77

Satterlee JS and Sussman MR (1997) An Arabidopsis phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase homolog with seven novel repeats rich in aromatic and glycine residues. *Plant Physiol* **115**: 864

Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ and De Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**: 2049-2062

Shah K, Schmidt EDL, Vlak JM and De Vries SC (2001) Expression of the *Daucus carota* somatic embryogenesis receptor kinase (DcSERK) protein in insect cells. *Biochimie* **83**:415-421

Somerville C, Browse J, Jaworski JG and Ohlrogge JB (2000) Lipids. En: Buchanan B.B., Griseham W. and Jones R.L. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Courier Companies Inc., Maryland, pp. 456-527

Steinert P, Wissing JB and Wagner KG (1994) Manganese-stimulated phosphatidylinositol 4-kinase from *Dunaliella parva*: purification and characterization. *Plant Sci* **101**: 105-114

Stevenson JM, Perera IY and Boss WF (1998) A phosphatidylinositol 4-kinase pleckstrin homology domain that binds phosphatidylinositol 4-monophosphate. *J Biol Chem* **273**: 22761-22767

Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S and Boss WF (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci* **5**: 252-258

Turner CE (1991) Paxillin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development. *J Cell Biol* **115**: 201-207

Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T, Ichinose Y and Oku H (1993) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol* **34**: 729-735

Welters P, Takegawa K, Emr SD and Chrispeels MJ (1994) ANPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11398-11401

Westergren T, Ekblad L, Jergil B and Sommarin M (1999) Phosphatidylinositol 4-kinase associated with spinach plasma membranes. Isolation and characterization of two distinct forms. *Plant Physiol* **121**: 507-516

Xue HW, Pical C, Brearley C, Elge S and Müller-Röber B (1999) A plant 126 kDa phosphatidylinositol 4-kinase with a novel repeat structure: cloning and functional expression in baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem* **274**: 5738-5745

Yamamoto K, Graziani A, Carpenter C, Cantley LC, and Lapetina EG (1990) A novel pathway for the formation of phosphatidylinositol 3,4- biphosphate. Phosphorylation of phosphatidylinositol 3-monophosphate by phosphatidylinositol-3-monophosphate 4-kinase. *J Biol Chem* **265**: 22086-22089

Yeung EC and Meinke DW (1993) Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* **5**: 1341-1381

Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. En: Thorpe T.A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 205-248

Yoon GM, Cho HS, Jung Ha H, Liu JR and Lee HP (1999) Characterization of *NtCDPK1*, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol Biol* **39**: 991-1001

Zbell B and Walter-Back C (1988) Signal transduction of auxin on isolated plant cell membranes: indications for a rapid polyphosphoinositide response stimulated by indolacetic acid. *Journal of Plant Physiol* **133**: 353-360

Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* **5**: 1411-1423

CAPÍTULO II

Presencia de la actividad de fosfatidilinositol cinasas y fosfatidilinositol monofosfato cinasas durante el ciclo de cultivo de células en suspensión de *Coffea arabica* L.

María Julissa Ek-Ramos, Graciela Racagni-Di Palma and S.M. Teresa Hernández-Sotomayor

ABREVIATURAS

DAGK, diacilglicerol cinasa; MAGK, monoacilglicerol cinasa; PA, ácido fosfatídico; PI, fosfatidilinositol; PIP, fosfatidilinositol monofosfato; PI 3-P, fosfatidilinositol 3-monofosfato; PI 4-P, fosfatidilinositol 4-monofosfato; PI 4,5-P₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIK, fosfatidilinositol cinasa; PI4K, fosfatidilinositol 4-cinasa; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PIPK, fosfatidilinositol monofosfato cinasa; PIP5K, fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa; PMSF, fenil metil sulfonil-fluoruro; PVP, polivinil pirrolidona; TLC, cromatografía de placa fina.

RESUMEN

En un artículo anterior (Racagni et al., 2002) se encontraron evidencias de la presencia de actividad de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K)(EC 2.7.1.67) y de la fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K) (EC 2.7.1.68) durante el ciclo de cultivo de células en suspensión de *Coffea arabica* L.

Con este trabajo se busca aportar evidencias de la presencia de la actividad de la PI3K (EC 2.1.7.137) utilizando el sistema del ácido bórico (Walsh et al., 1991) al igual que se explora la posibilidad de la formación de otros isómeros del fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) además del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5-P₂), lo cual no fue analizado en el artículo mencionado anteriormente.

Extractos membranales crudos de células en suspensión de *Coffea arabica* L. fueron incubados en la presencia de [32 P] γ -ATP. Después de la extracción, los lípidos fosforilados fueron separados utilizando la siguiente mezcla de disolventes metanol: cloroformo: hidróxido de amonio: agua (45:45:4:11, v/v), con la cual se logró la separación del PI 4,5-P₂ y del fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI 3,4-P₂).

Al analizar los diferentes días del ciclo de cultivo, la formación de los isómeros del PIP y del PIP₂ fue mayor en los días 4, 7 y 13. De igual manera, durante estos días se observaron cambios significativos en la velocidad de crecimiento de las células. En el día 4 se observó el cambio de la fase estacionaria a la fase exponencial y en los días 7 y 13, el cultivo se encontraba en la fase de crecimiento lineal. Por lo tanto, las actividades de estas enzimas pudieran estar relacionadas con los eventos que se desarrollan durante la proliferación celular.

En el día 7 de cultivo, la actividad de PIK encontrada correspondió en su totalidad a la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) (EC 2.7.1.67). De igual manera, se determinó la presencia de al menos otro isómero del PIP₂ además del PI 4,5-P₂. Resultados preliminares indican la posible formación del fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI 3,4-P₂) durante el ciclo de cultivo de las células en suspensión de *Coffea arabica* L.

INTRODUCCIÓN

El sistema de los fosfoinosítidos se ha determinado en las plantas con el estudio de la presencia de sus metabolitos y de sus actividades enzimáticas (Poovaiah et al., 1987; Boss, 1989; Einspahr y Thompson, 1990). Se ha reportado que la actividad de la enzima fosfatidilinositol monofosfato cinasa (PIPK) de membrana plasmática de pétalos de petunia se incrementa con la senescencia (Borochoy et al., 1994). De igual manera, en células en suspensión de *Catharanthus roseus*, se ha encontrado que los niveles de fosfoinosítidos cambian con la edad del cultivo, por lo que los autores sugieren un papel a estos compuestos en la regulación de la proliferación celular (Heim y Wagner, 1986; Falkenau et al., 1987).

Por otra parte, utilizando extractos membranales de células en suspensión de *Coffea arabica* L., se ha encontrado la presencia de la actividad de fosfatidilinositol 4-cinasa (PIK), fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K), diacilglicerol cinasa (DAGK) y monoacilglicerol cinasa (MAGK), las cuales cambian, tanto en la cantidad de proteína como en su actividad de acuerdo al ciclo de cultivo de estas células (Racagni et al., 2002).

Sin embargo, en este sistema no se determinó si existe la actividad de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (EC 2.1.7.137) de clase III, la cual fosforila al fosfatidilinositol (PI) y es la única que se ha encontrado en células vegetales (Dove et al., 1994; Hong y Verma, 1994; Welters et al., 1994; Matsuoka et al., 1995; Fruman et al., 1998), ni de otros miembros de la familia de las PIPKs, a la que pertenece la PIP5K.

Los miembros de la familia de las PIPKs pueden ser de tipo I, que fosforilan preferentemente al PI 4-P y de tipo II, que tienen alta afinidad por el PI 5-P; sin embargo, ambas fosforilan al PI 3-P en condiciones *in vitro* (Hinchliffe et al., 1998), por lo que también estarían involucradas en la ruta de biosíntesis del PI 3,4-P₂ y del PI 3,5-P₂.

En las plantas, se han detectado varias actividades de PIPKs en varios tejidos y tipos celulares y éstas cambian como respuesta a diferentes condiciones como hormonas vegetales (Zbell y Walter-Back, 1988; Grabowski et al., 1991), daño mecánico (Gawer et al., 1999), inductores fúngicos (Toyoda et al., 1993) y estrés salino (Heilmann et al., 1999).

Con base en lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de la actividad de la enzima PI3K y de miembros de la familia de las PIPKs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los estándares de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5-P₂) y fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI 4-P) fueron purificados de lípidos de extracto de cerebro (Sigma, St. Louis, Mis. USA) utilizando una columna de neomicina como describen Waldo et al., (1994). El estándar de fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI 3,4-P₂) fue obtenido de Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA. USA). El reactivo [γ -³²P] ATP (1.85×10^{10} Bq) fue adquirido en Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England). El reactivo para la determinación del contenido de proteína utilizando ácido bicinónico (BCA) fue obtenido de Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill., USA). El fosfatidilinositol (PI) fue obtenido de Sigma (St. Louis, Mis. USA). Todos los solventes y reactivos fueron grado analítico.

Caracterización del ciclo de cultivo

Las células en suspensión de la línea L-7 fueron obtenidas por desagregación de callos y se mantuvieron en el medio de cultivo compuesto de sales del medio Murashige y Skoog (1962), tiamina (29.64 μ M), cisteína (127 μ M), mioinositol (555 μ M) y sacarosa (87.6 mM). Los reguladores de crecimiento que se utilizaron fueron el 2,4-D (13.6 μ M) y el 6-BAP (4.4 μ M). El pH del medio fue ajustado a 5.8. Las células en suspensión se mantuvieron en este medio de cultivo a una concentración de 10 gL^{-1} y se sembraron cada 14 días.

Preparación de extractos membranales crudos

La proporción para la extracción fue de 2.5 ml de amortiguador (50 mM NaCl, 1 mM de EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sacarosa, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 10 mM pirofosfato de sodio, 0.2 mM ortovanadato de sodio y 2% PVP) por g de tejido pulverizado con nitrógeno líquido. El homogenado se centrifugó a 23,700 g durante 30 min a 4°C. Para obtener las fracciones membranal y citosólica se tomó el sobrenadante de la primera centrifugación y se centrifugó nuevamente a 100,000 g durante 45 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 20 μ l de amortiguador y se sonizó

durante 30 seg. La cuantificación de proteínas se hizo con el método del ácido bicinonínico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Smith et al., 1985).

Ensayo de lípido cinasas

Las actividades de lípido cinasas se ensayaron utilizando muestras de diferentes días del ciclo de cultivo. El extracto membranal obtenido (10 µg) se agregó a un amortiguador térmicamente equilibrado a 30°C (40 mM HEPES pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 0.4 mM EGTA, 50 mM NaCl, 0.2 mM ortovanadato de sodio y [γ -³²P] ATP/ATP (370 MBq/1 mM por ensayo). Después de 5 min, la reacción fue detenida con 1.25 mL de una mezcla de CH₃OH/CHCl₃/HCl 2.4 N (2:2:1, v/v). La extracción de los lípidos se realizó como describen Racagni et al., 2002.

Separación de los lípidos fosforilados

Los lípidos fueron separados por TLC. Las muestras se aplicaron sobre placas de gel de sílica pretratadas con una solución de oxalato de sodio 1% y precalentadas a 110°C durante 60 min antes de utilizarlas. Se utilizó la siguiente mezcla de disolventes para separar los productos: metanol: cloroformo: hidróxido de amonio: agua (45:45:4:11, v/v). La posición de los lípidos radioactivos se determinó por autorradiografía junto con una película NEMTM (Life Science Products, Boston, MA, USA) y por la exposición en un fosforimager GS-525 (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA., USA).

Se utilizó la solución de revelado del ácido fosfomolibdico para la identificación de los estándares. Una vez identificados los productos, se rasparon de la placa y se cuantificó la radiactividad incorporada utilizando un contador de centelleo y EcoLume, una mezcla de líquidos de centelleo (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA., USA).

Para la separación de los isómeros PI 4-P y PI 3-P, los productos obtenidos utilizando la muestra del día 7 de cultivo se separaron utilizando el sistema del ácido bórico reportado por Walsh et al., 1991.

RESULTADOS

Cambios en la actividad de lípido cinasas durante el ciclo de cultivo

El ciclo de cultivo de las células en suspensión de *Coffea arabica* L. se caracterizó utilizando como parámetros el peso fresco y el peso seco. En la figura 2.1 se muestran las gráficas obtenidas después de 22 días de cultivo. Las gráficas mostraron el comportamiento típico de las curvas de crecimiento de las células en suspensión que se utilizan en cultivo de tejidos.

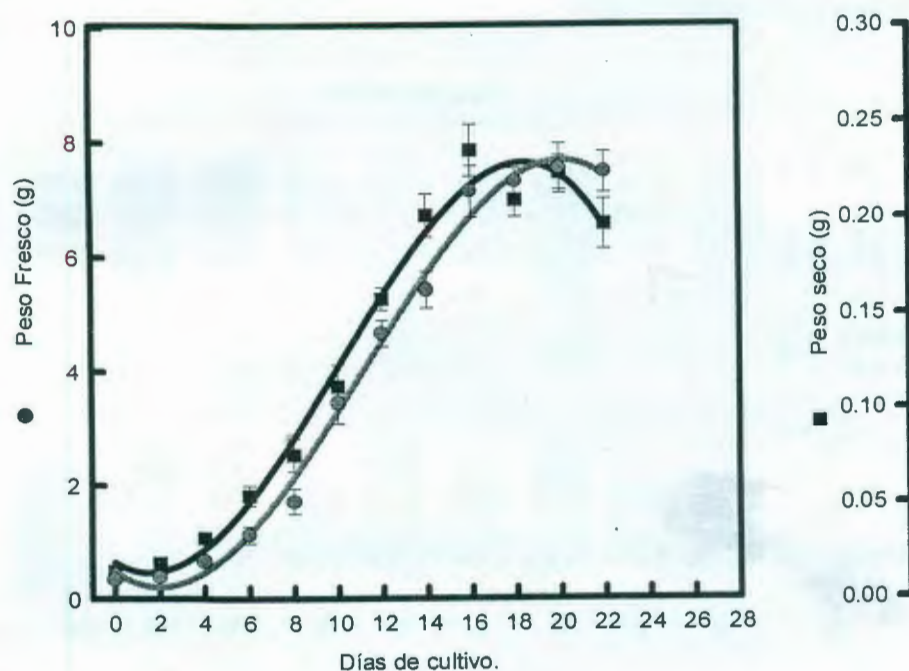


Figura 2.1. Curvas de crecimiento de la línea L-7. El tiempo de duplicación para el peso fresco fue de 4.046 días y para el peso seco fue de 3.84 días. Los valores representan el promedio $\pm$ error estándar (ES) de tres experimentos independientes.

La fase de adaptación se observó entre los días 0 y 4, las fases exponencial y lineal se observaron entre los días 5 y 6 y desde el día 7 hasta el día 18, respectivamente. La velocidad de crecimiento fue disminuyendo gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, que se observó entre los días 20 y 22. Antes de esta fase, en el día 20,

las células alcanzaron su máximo crecimiento celular, que fue de alrededor de 16 veces el inóculo inicial. Se determinaron los tiempos de duplicación para cada una de las curvas. Para el peso fresco fue de 4.046 días y para el peso seco fue de 3.84 días.

Se tomaron muestras durante los días 0, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 13 y 14 del ciclo de cultivo y se determinó la fosforilación de lípidos. Se utilizaron 10 μg de extracto proteico membranar de cada una de las muestras analizadas. Éste extracto contuvo los lípidos que sirvieron con sustrato endógeno.



Figura 2.2. Cambios en la actividad de lípido cinasas durante el ciclo de cultivo de la línea L-7. Diez μg de proteína membranar de los diferentes días de cultivo analizados fueron incubados en la presencia de $[^{32}\text{P}]$ -ATP como se describió en materiales y métodos. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos realizados por separado. La identidad de cada fosfoinosítido fue determinada por la comigración con estándares comerciales. X, compuesto no identificado.

Para identificar los productos obtenidos se aplicaron estándares comerciales en la misma placa donde se aplicaron las muestras radiactivas. Las movilidades relativas correspondientes a los estándares utilizados fueron: Ácido fosfatídico (PA) (0.77),

fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI 4-P) (0.68), fosfatidilinositol 3-monofosfato (PI 3-P) (0.676), fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5-P₂) (0.47) y fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI 3,4-P₂) (0.386).

Los productos que se encontraron mostraron movilidades relativas correspondientes al PA, al PI 4-P, al PI 4,5-P₂ y al PI 3,4-P₂, por lo que esto sugiere la presencia de la actividad de la diacilglicerol cinasa (DAGK), la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K), la fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K) y una fosfatidilinositol monofosfato cinasa (PIPK) de tipo II. Con la mezcla de disolventes utilizada, se observó una buena separación de los isómeros PI 4,5-P₂ y PI 3,4-P₂, sin embargo, los isómeros PI 3-P y PI 4-P tuvieron movilidades relativas muy cercanas (PI 4-P, 0.68 y PI 3-P, 0.676), por lo que se utilizó la metodología reportada por Walsh et al., 1991 para separar los isómeros utilizando el sistema del ácido bórico (Figura 2.3).

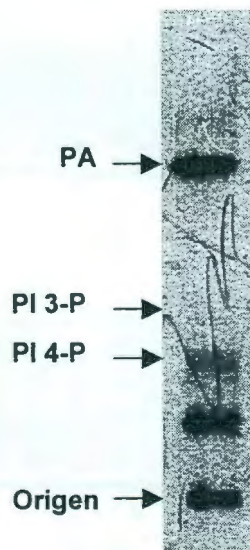


Figura 2.3. Actividad de PIKs en las células de 7 días de cultivo de la línea L-7. Diez μ g de proteína membranal del día 7 de cultivo se incubó en la presencia de [³²P] γ -ATP como se describió en materiales y métodos. Los productos obtenidos se separaron utilizando el sistema del ácido bórico (Walsh et al., 1991).

Al separar los productos formados utilizando la muestra del día 7 de cultivo, se encontró que el mayor porcentaje del PIP formado correspondió al PI 4-P (Figura 2.3).

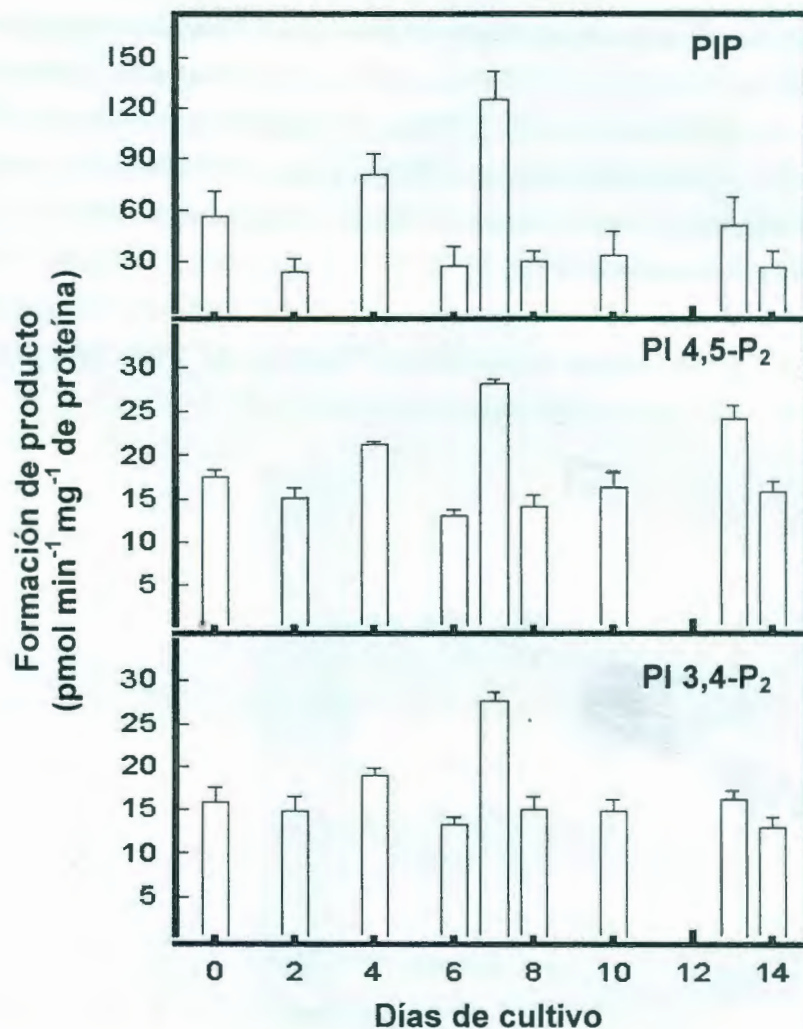


Figura 2.4. Actividades específicas de las lípido cinasas presentes en las células en suspensión de *Coffea arabica* L. durante 14 días de cultivo. Los valores corresponden al promedio $\pm$ error estándar (ES) de tres experimentos independientes.

De igual manera, se observó la formación de un compuesto que no pudo ser identificado (X), pero cuya formación cambia de acuerdo al ciclo de cultivo de manera diferente a la de los compuestos que si fueron identificados (Figura 2.2).

Debido a que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de la actividad de diferentes tipos de fosfatidilinositol cinasas y fosfatidilinositol monofosfato cinasas presentes en el modelo de estudio, el análisis cuantitativo de las actividades enzimáticas se realizó enfocándose en la formación del PIP, del PI 4,5-P₂ y PI 3,4-P₂.

En la figura 2.4 se muestran las gráficas correspondientes a la formación de cada uno de estos compuestos en dependencia del ciclo de cultivo de las células en suspensión de *Coffea arabica* L.

Con base en los resultados obtenidos se puede sugerir que existe una coincidencia entre el aumento de la actividad de las fosfoinosítido cinasas que sintetizan el PIP, el PI 4,5-P₂ y el PI 3,4-P₂, y las fases de crecimiento, específicamente en los días 4, 7 y 13, del ciclo de cultivo de la línea L-7 (Figura 2.1).

DISCUSIÓN

En las células en suspensión de *Coffea arabica* L. se observó la formación del PIP, el PI 4,5-P₂ y el PI 3,4-P₂, esto sugiere la presencia de la actividad de la PIK, al igual que la presencia de la actividad de la PIP4K y la PIP5K. Cuando se determinó que isómeros del PIP se formaron, se encontró que, en el día 7 de cultivo, prácticamente la totalidad del PIP formado corresponde al PI 4-P.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la coincidencia entre la formación del PIP, del PI 4,5-P₂ y del PI 3,4-P₂ y los cambios en las fases de crecimiento de las células en suspensión. Estos resultados son semejantes a los datos reportados para las células en suspensión de *Catharanthus roseus* (Grabowski et al., 1991) en donde se muestran evidencias de un aumento en la formación del PI y del PIP de acuerdo al día de cultivo de la línea celular. De igual manera, en este reporte se analizó el efecto de

la adición de la auxina 2,4-D a las células que previamente se mantuvieron sin ella. El efecto observado fue el aumento de la formación del PIP debido a la adición del 2,4-D.

También los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos para suspensiones celulares de *Daucus carota*, donde se utilizaron extractos microsomales (Zbell y Walter-Back, 1988). Estos extractos microsomales fueron capaces de utilizar ATP radiactivo como sustrato para la fosforilación rápida de los lípidos endógenos, dando como resultado la formación del PA, el PI 4-P y el PI 4,5-P₂. De igual manera, los niveles de estos fosfolípidos fosforilados se redujeron con la adición de una auxina, el ácido indolacético, indicando un posible efecto de la auxina sobre la reacción mediada por la fosfolipasa C. En este trabajo se propuso que la auxina puede controlar el recambio de los fosfoinosítidos, de una manera similar a la observada para las células animales.

De ahí hasta la fecha, el interés se ha enfocado en la determinación del efecto regulatorio de la fosfolipasa C sobre el crecimiento celular. Sin embargo, el papel de las fosfoinosítido cinasas que sintetizan el sustrato para esta enzima no se ha determinado aún. Sin embargo, es ampliamente aceptado que el PI 4,5-P₂ es el sustrato principal para la síntesis de los segundos mensajeros IP₃ y DAG, a los que se les han atribuido un amplio espectro de funciones en respuesta a diversas señales extracelulares (Coté y Crain, 1994).

En cuanto al PI 3,4-P₂, se ha reportado su presencia en células vegetales, aunque aún no se conoce su función (Parmar y Brearley, 1995). Con el presente trabajo se muestran las primeras evidencias de la posible presencia del PI 3,4-P₂ en células en suspensión de *Coffea arabica* L., sin embargo es importante tomar en cuenta reportes recientes acerca de la presencia de otro isómero del fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂), el fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PI 3,5-P₂) en células vegetales (Meijer et al., 1999).

Cuando se utiliza un sistema de disolventes que utiliza hidróxido de amonio, el PI 3,5-P₂ tiene una movilidad relativa ligeramente inferior al PI 4,5-P₂ (Meijer et al., 1999) por

lo que no se debe descartar la posibilidad de que el compuesto que en este trabajo se identificó como PI 3,4-P₂ sea en realidad PI 3,5-P₂, por lo tanto se requiere de la utilización de un sistema de separación específico para los isómeros del PIP₂ como el reportado por Meijer et al., (1999). De cualquier manera, con el presente trabajo se muestran evidencias de la presencia de diferentes isómeros del PIP₂ además de que, al menos en el día 7 de cultivo, donde se encontró una alta velocidad de proliferación, se encuentra la mayor actividad detectada de PI4K por lo que estos dos eventos podrían estar correlacionados.

BIBLIOGRAFÍA

Boss WF (1989) Phosphoinositide metabolism: Its relation to signal transduction in plants. In: Boss W.F. and Morre D.J. (eds) Second messengers in plant growth and development. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 29-56

Borochoy A, Cho MH and Boss WF (1994) Plasma membrane lipid metabolism of petunia petals during senescence. *Physiol Plant* **90**: 279-284

Coté GG and Crain RC (1994) Why do plants have phosphoinositides? *Bioessays* **16**: 39-46

Dove SK, Lloyd CW and Drobak BK (1994) Identification of a phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase in plant cells: association with the cytoskeleton. *Biochem J* **303**: 347-350

Einspahr KJ and Thompson GA (1990) Transmembrane signaling via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in plants. *Plant Physiol* **93**: 361-366

Falkenau C, Heim S and Wagner KJ (1987) Effect of cytokinins on the phospholipid phosphorylation of the suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **50**: 173-178

Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507

Gawer M, Norberg P, Chervin D, Guern N, Yaviv Z, Mazliak P and Kader JC (1999) Phosphoinositides and stress-induced changes in lipid metabolism of tobacco cells. *Plant Sci* **141**:117-127

Grabowski L, Heim S and Wagner KG (1991) Rapid changes in the enzyme activities and metabolites of the phosphatidylinositol-cycle upon by growth substances of auxin-starved suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **75**: 33-38

Heilmann I, Perera IY, Gross W and Boss WF (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* **119**: 1331-1339

Heim S and Wagner KG (1986) Evidence of phosphorylated phosphatidylinositols in the growth cycle of suspension cultured plant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 1175-1182

Hinchliffe KA, Ciruela A and Irvine RF (1998) PIPkins, their substrates and their products: new functions for old enzymes. *Biochem Biophys Acta* **1436**: 87-104

Hong Z and Verma DPS (1994) A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9617-9621

Matsuoka K, Bassham DC, Raikel NV and Nakamura J (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**: 1307-1318

Meijer HJG, Divecha N, Van den Ende H, Musgrave A and Munnik T (1999) Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta* **208**: 294-298

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497

Parmar PN and Brearley CA (1995) Metabolism of 3- and 4- phosphorylated phosphoinositides and inositol phosphates in stomatal guard cells. *Plant J* **8**: 425-433

Poovaiah BW, Reddy ASN and McFadden JJ (1987) Calcium messenger system: Role of phosphorylation and inositol bisphospholipids. *Physiol Plant* **69**: 569-573

Racagni-Di Palma G, Brito-Argáez L and SMT Hernández-Sotomayor (2002) Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* L. cells. *Plant Physiol and Biochem* **40**: 899-906

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85

Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T, Ichinose Y and Oku H (1993) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol* **34**: 729-735

Waldo GL, Morris AJ and Harden TK (1994) Purification of G-protein-regulated phospholipase C from turkey erythrocytes. *Methods Enzymol* **238**: 195-201

Walsh JP, Caldwell KK and Majerus PW (1991) Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11398-11401

Welters P, Takegawa K, Emr SD and Chrispeels MJ (1994) AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. Proc Natl Acad Sci USA 91: 11398-11401

Zbell B and Walter-Back C (1988) Signal transduction of auxin on isolated plant cell membranes: indications for a rapid polyphosphoinositide response stimulated by indolacetic acid. Journal of Plant Physiol 133: 353-360

CAPÍTULO III

Changes in phosphatidylinositol and phosphatidylinositol monophosphate kinase activities during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*.

María Julissa Ek-Ramos, Graciela Racagni-Di Palma and S.M. Teresa Hernández-Sotomayor

Este artículo fue aceptado para su publicación en la revista *Physiologia Plantarum*

ABBREVIATIONS

CE, embryogenic calli; COT, cotyledonary embryo; DMSO, dimethyl sulfoxide; GLO, globular-shaped embryo; HRT, heart-shaped embryo; PI, phosphatidylinositol; PIP, phosphatidylinositol monophosphate; PI 3-P, phosphatidylinositol 3-monophosphate; PI 4-P, phosphatidylinositol 4-monophosphate; PI 4,5-P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIK, phosphatidylinositol kinase; PI4K, phosphatidylinositol 4-kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIPK, phosphatidylinositol monophosphate kinase; PIP5K, phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase; PMSF, phenyl methyl sulfonylfluoride; PREG, preglobular structures; PVP, polyvinyl-pyrrolidone; TLC, thin-layer chromatography; TOR, torpedo-shaped embryo.

ABSTRACT

Evidence was obtained for the presence of phosphatidylinositol (PIK) and phosphatidylinositol monophosphate kinase (PIPK) at different developmental stages during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. by *in vitro* phosphorylation of endogenous lipids in the presence of [γ -³²P]ATP followed by thin-layer chromatography. The results indicate the existence of a relationship between the development stages that were analyzed and the kinases found. In cells without differentiated structures (EC, embryogenic calli) phosphatidylinositol kinase and phosphatidylinositol

monophosphate 5-kinase (EC 2.7.1.68) activities were present. These activities increased significantly in the first differentiated stage (PREG, preglobular structures) and decreased as the development stages advanced. Phosphatidylinositol monophosphate (PIP) formation decreased from the globular (GLO) to the cotyledonary (COT) stage. The PIP fraction contained both isomers, PI 3-P and PI 4-P. This demonstrates PI3K (EC 2.7.1.137) and PI4K (EC 2.7.1.67) activity during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. When wortmannin, an inhibitor of PI3K and PI4K activities, was included in an *in vitro* assay, a dose-dependent inhibition of the formation of both isomers was observed. The addition of wortmannin to the induction medium during the PREG stage reduced the number of normal embryos. Our results suggest that PI and PIP kinases and the formation of certain phosphoinositides may play roles in the regulation of somatic embryo development in *Coffea arabica* L.

INTRODUCTION

Coffee is a high value crop produced in tropical countries. For several years the *in vitro* multiplication of *Coffea spp.* has depended on somatic embryogenesis. The mechanisms involved in the induction process in this species are not yet clear however (Halperin, 1995).

Recently the presence of Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) (Schmidt et al., 1997) has been shown to be important in the induction of somatic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001). Other studies during the induction and differentiation stages of somatic embryogenesis have shown the presence of G proteins (Nato et al., 2000), calcium-dependent kinase activities (CDPKs) (Anil et al., 2000) and tyrosine kinase activities (Barizza et al., 1999; Islas-Flores et al., 2000), all of which are components of different signal transduction pathways.

The phosphoinositide pathway is a component of signal transduction mechanisms and has not yet been studied in somatic embryogenesis. Phosphoinositides are

phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol (PI), an important component of eukaryotic cell membranes. It is unique among phospholipids in that its head group can be phosphorylated at multiple free hydroxyls.

In plants, the phosphoinositide pathway is related to several processes such as morphogenesis (Hong and Verma, 1994) and the response to growth regulators (Heim and Wagner, 1989; Gawer et al., 1999), cell wall degrading enzymes (Chen and Boss, 1990) and hyperosmotic stress (Meijer et al., 1999) among others. The intracellular multifunction of these phospholipids is regulated by a series of metabolizing enzymes that include lipases, lipid phosphatases and lipid kinases. Most information comes from the lipid kinases group, specifically phosphatidylinositol kinases (PIKs) and phosphatidylinositol monophosphate kinases (PIPKs). These catalyze the transfer of a phosphate group from ATP to PI or PIP and comprise a large family of different enzymes (Fruman et al., 1998; Stevenson et al. 2000).

Information is available regarding changes in phospholipid and fatty acid composition during somatic embryogenesis in carrot (Dutta and Appelqvist, 1991; Liu et al., 1994) and *Chichorium* (Blackaert et al., 2000). Although the importance of PI and PIP kinases in several different processes has been documented, these activities have not been studied during somatic embryogenesis. The goal of this work was therefore to study these activities and their possible roles during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI 4,5-P₂) and phosphatidylinositol 4-monophosphate (PI 4-P) standards were purified from extract of brain lipids (Sigma, St. Louis, MO, USA) by a neomycin affinity column as described in Waldo et al., (1994). [γ -³²P]ATP (1.85 x 10¹⁰ Bq) was supplied by Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England). Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent was obtained from Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill., USA). PI and wortmannin were

obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All solvents and reactants were of analytical grade.

Somatic embryogenesis

Somatic embryos were obtained by indirect embryogenesis from leaves of plantlets raised from seeds of *Coffea arabica* L. germinated *in vitro*. The cell line FM was used to induce somatic embryogenesis as described by Quiroz-Figueroa et al., (2001). Cells in maintenance medium were taken at day 8 and inoculated into induction medium at 5 gL⁻¹. The different development stages were classified by their morphology using a stereoscopic microscope Bausch & Lomb StereoZoom[®]5.

Preparation of crude membrane fractions

Samples were quickly frozen with liquid nitrogen and homogenized with polytron in buffer A (1 g of tissue in 3 mL of 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 10% glycerol v/v, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate and 2% PVP w/v). The homogenate was centrifuged at 23,700 g for 30 min at 4°C. The supernatant was further centrifuged at 100,000 g for 45 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in the same buffer A, sonicated for 30 sec and used as a crude membrane fraction. Protein concentrations of samples were measured with bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent using bovine serum albumin as standard (Smith et al., 1985). The yeast membrane fraction was obtained as described by Stack et al., (1993).

Lipid kinase assay

Lipid kinase activities were assayed using endogenous lipids as substrates unless otherwise specified. The membrane fraction, isolated as previously described (20 μ g of protein), was added to thermally (30°C) equilibrated buffer 40 mM HEPES pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 0.4 mM EGTA, 50 mM NaCl, 0.2 mM sodium orthovanadate and [γ -³²P]ATP/ATP (370 MBq mM⁻¹ for assay). After 5 min at 30°C, the reaction was stopped with the addition of 1.25 mL of a mixture of CH₃OH/CHCl₃/HCl 2.4 M (2:2:1 v/v). PI3K

assay was performed using PI as substrate according to Stack et al., (1993). Fifty μL of total volume using 20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mg mL^{-1} of sonicated PI, 60 μM ATP and 370 MBq mL^{-1} [γ - ^{32}P] ATP, were incubated at 25°C for 5 min and stopped by the addition of 160 μL of $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v). A *Saccharomyces cerevisiae* membrane fraction was used as a control for PI3K activity.

Phospholipid extraction and separation

Radiolabeled lipids were extracted following specifications by Racagni-Di Palma et al., (2002). The extracted phospholipids were separated by TLC. Samples were spotted on silica gel TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) previously impregnated with 1% w/v of potassium oxalate in 2 mM EDTA and $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:3 v/v). Plates were heated at 110°C for 60 min just before use. The chromatoplate was developed with $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (45:45:4:11 v/v). The phosphorylated lipids obtained in the PI3K assay were extracted as described by Stack et al., (1993) and separated in a boric acid system (Walsh et al., 1991). The position of radiolabeled phosphoinositides was determined by autoradiography on NEMTM (Life Science Products, Boston, MA, USA) film and exposure in a GS-525 Molecular Imager (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). The products were identified by the relative flow of commercial standards on the same plate. Phosphomolybdic acid was used as the cold developer solution (Kirchner, 1978). Spots were scraped off the plate and counted in a scintillation counter with EcoLume, a liquid scintillation cocktail (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA).

Effect of wortmannin on lipid kinase activity *in vitro*

The membrane fraction from the preglobular stage (PREG), isolated as previously described (20 μg of protein), was incubated with different concentrations of wortmannin diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 min at room temperature prior to the lipid kinase assay.

Effect of wortmannin on somatic embryogenesis

When the first differentiated structures (PREG) were formed, approximately 11 days after induction of somatic embryogenesis, different concentrations of wortmannin diluted in DMSO were added to the culture medium. After 19 and 49 days, the number of normal and abnormal embryos of each development stage was counted.

RESULTS

Characterization of somatic embryogenesis and lipid kinase activities

Somatic embryos were obtained by indirect embryogenesis as described in Materials and methods. After 11 days in the induction medium, preglobular structures were formed, the first indication of a differentiated stage. After 60 days, all stages of embryogenesis were found: globular-shaped, heart-shaped, torpedo-shaped and cotyledonary embryos. The different stages were identified (Figure 3.1) according to different characteristics as previously described (Quiroz-Figueroa et al., 2001).

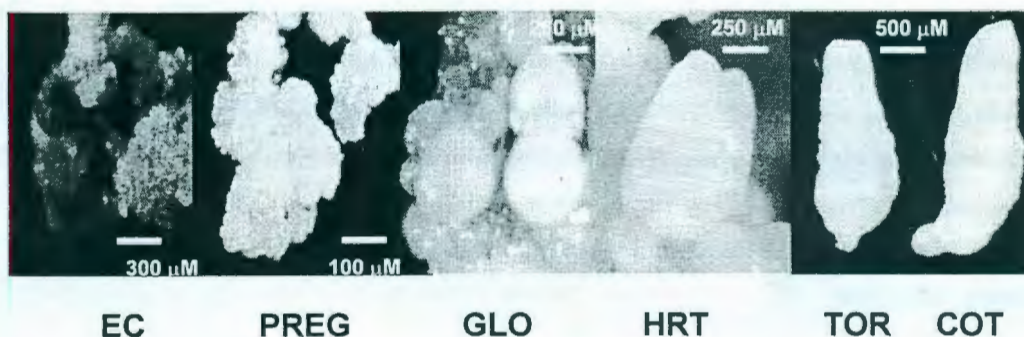


Figure 3.1. Developing somatic embryos of *Coffea arabica* L. EC, Embryogenic calli after 8 days in maintenance medium without induction of embryogenesis. PREG, Preglobular structures formed after 11 days in induction medium. GLO, Globular-shaped embryo. HRT, Heart-shaped embryo. TOR, Torpedo-shaped embryo. COT, Cotyledonary embryo.

The embryogenic calli (Figure 3.1, EC) were friable, brownish non-differentiated structures. However, 11 days after induction of somatic embryogenesis, a yellowish tissue (Figure 3.1, PREG) was formed. These preglobular (PREG) structures formed

the first differentiated tissue and were more friable than EC. The first evident stage of embryo development was the globular-shaped structure (Figure 3.1, GLO). This was characterized by its circular-shaped and a shiny, compact appearance. The heart-shaped structure (Figure 3.1, HRT) was characterized by the formation of two lobules at one end of the embryo, where the cotyledons would later be formed. The torpedo-shaped structure (Figure 3.1, TOR) was longer and had more developed cotyledons than the heart-shaped. The cotyledonary embryos (Figure 3.1, COT) had the most developed cotyledons.

Membrane protein was obtained from the stages described in Figure 3.1 and lipid kinase activity was measured as described in Materials and methods. Several products were detected after *in vitro* [32 P] phosphorylation and TLC separation (Figure 3.2).

Phosphatidylinositol monophosphate (PIP) and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI 4,5- P_2) were clearly identified, on the basis of their chromatographic mobility in the solvent mixture used (Figure 3.2A). PI 4,5- P_2 was probably not the only PIP $_2$ isomer formed. Two others yet unidentified compounds were also present (X, Y; Figure 3.2A).

We have focused the analysis on the formation of PIP and PI 4,5- P_2 as our interest was to look for phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) and phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase (PIP5K) activities. When these activities were analyzed during the different stages of somatic embryogenesis, PIP and PI 4,5- P_2 were formed mainly in EC and PREG while a very low formation of PIP and almost no detectable PI 4,5- P_2 were observed in the late development stages (GLO, HRT, TOR and COT) (Figure 3.2B). Specific activities (Figure 3.2B) showed that the PIK activity in PREG was 3.6 times greater than in EC and was much higher than in the other somatic stages analyzed. In these stages it decreased until the last stage. PIPK activity showed a similar tendency. It was 4.2 times greater in PREG than in EC and very much higher than in the other stages.

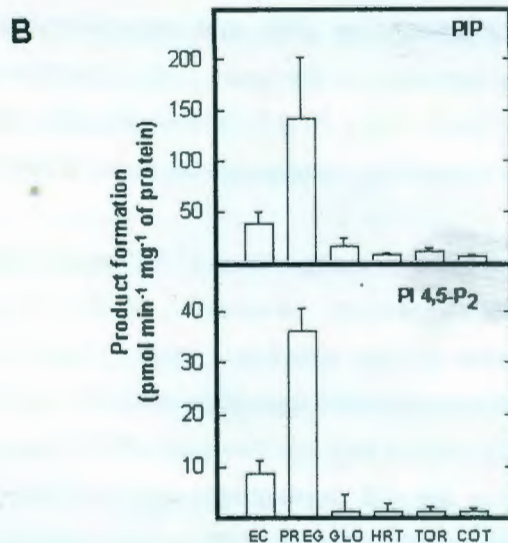
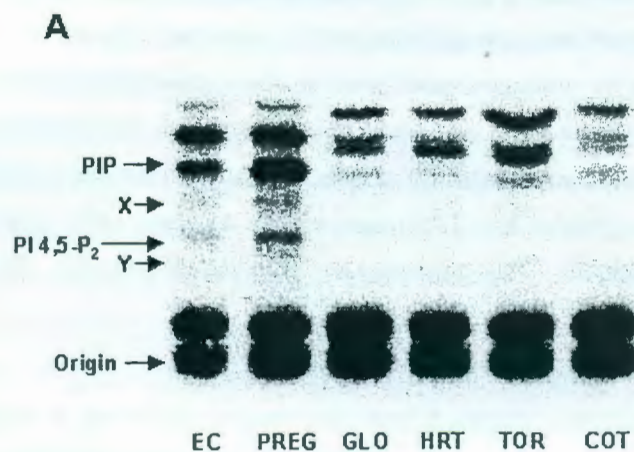


Figure 3.2. Changes in lipid kinase activities during somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. **A)** Total membrane extracts (20 µg) from different stages of somatic embryogenesis were incubated in the presence of [³²P] γ-ATP as described in Materials and methods. The results shown are representative of 3 separate experiments. The identity of the phosphoinositides was verified using co-migration with commercial standards (X and Y, not identified) **B)** Plots correspond to the formation of PIP and PI 4,5-P₂. Each data point represents the mean ± SE of 3 independent experiments.

Effect of exogenous lipid substrates on lipid kinase activities

From the results above it is clear that there was high activity of PI and PIP kinases in the EC and PREG stages (Figure 3.2). These experiments were performed using endogenous substrates. In order to see if they were limiting factors in the assay, a series of experiments adding exogenous PI and PI 4-P were also performed. When 500 μ M PI was added (Figure 3.3A), an increase in the formation of PIP (3-fold) and PI 4,5-P₂ (5-fold) was seen in EC. For PREG there was almost the same increase for PIP, but a smaller (2-fold) increase for PI 4,5-P₂. Other developmental stages (GLO, HRT, TOR, COT) also showed increased activity.

In some cases, as for PIP formation in the COT stage, the increase was more than 10-fold. This result is uncertain however since the activity without the addition of PI was very low (7 pmol min⁻¹ mg⁻¹) compared to EC and PREG (39 and 121 pmol min⁻¹ mg⁻¹ respectively) and SE were very high. When 500 μ M PI 4-P was added (Figure 3.3B), the increase in the formation of PI 4,5-P₂ was 2.5- and 2-fold in EC and PREG, respectively, with still higher increases in the later stages (3-, 6-, 4-, 4- fold for GLO, HRT, TOR, and COT, respectively).

Effect of wortmannin on PIK activity *in vitro*

To analyze for the possible presence of PI3K activity, the extracted lipids were separated in a boric acid system (Walsh et al., 1991). Yeast membrane homogenates were used to obtain PI 3-P and PI 4-P references. The results show the formation of PI 4-P and PI 3-P, using EC and PREG extracts (Figure 3.4). In EC, the formation of PI 3-P accounted for 65% of all PIP formed and PI 4-P for 35%. In PREG the formation of PI 3-P was 20% of the total PIP and PI 4-P was 80%.

As these results suggest that PIK activity is regulated in some way in the different development stages, experiments were performed to test this, using an inhibitor of PIK activity. We used wortmannin, a hydrophobic steroid-related product of the fungus *Talaromyces wortmanni* (Cardenas et al., 1998). Lipid kinase assays using a membrane fraction from the PREG stage, were assayed in the absence or presence of

increasing concentrations of wortmannin (Figure 3.5). A dose-dependent inhibition of both PI 3-P (IC_{50} of 30 nM) and PI 4-P (IC_{50} of 6 nM) was observed.

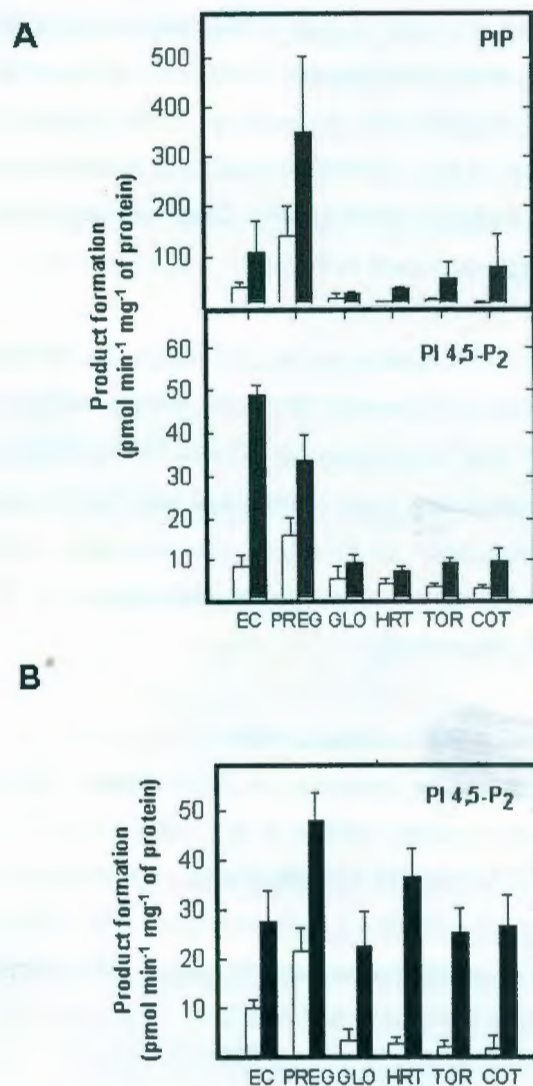


Figure 3.3. Effect of the addition of exogenous substrates on phosphoinositide kinase activities during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. Total membrane extracts (20 μg) from different development stages were incubated in the absence (□) or the presence (■) of A) 500 μM PI or B) 500 μM PI 4-P as described in Fig. 3.2A. The results shown are representative of three separated experiments.

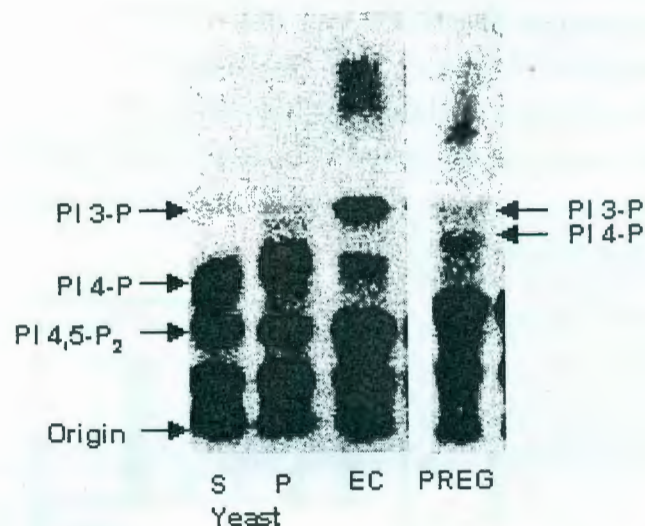


Figure 3.4. Separation of phosphorylated lipids using a boric acid system. Yeast soluble (4 μ g) (S) and membrane homogenates (4 μ g) (P) were used to generate reference markers for PI 3-P and PI 4-P. EC and PREG membrane extracts (20 μ g) were used as described in Materials and methods.

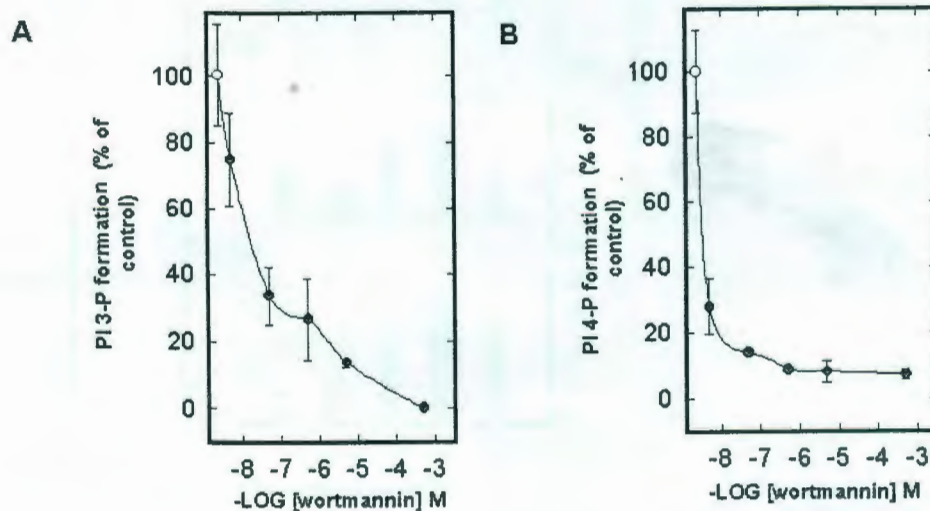


Figure 3.5. Effect of wortmannin *in vitro* PI3K (A) and PI4K (B) activities. PREG membrane extracts (20 μ g) were pre-incubated for 2 min with increasing concentrations of wortmannin, after which the lipid kinase assay was started. Results are expressed as the percentage of basal specific activity, which were 46 and 168 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein for PI3K and PI4K respectively. Each data point represents the mean $\pm$ SE of 3 independent experiments.

Effect of wortmannin on the somatic embryogenesis process

From the results shown in Figure 3.5, we concluded that *in vitro* wortmannin affected PIK activity. We therefore explored its effect on somatic embryogenesis by adding different concentrations of wortmannin to the induction medium as described in Materials and methods. The number of normal embryogenic structures formed in each development stage is shown in Figure 3.6.

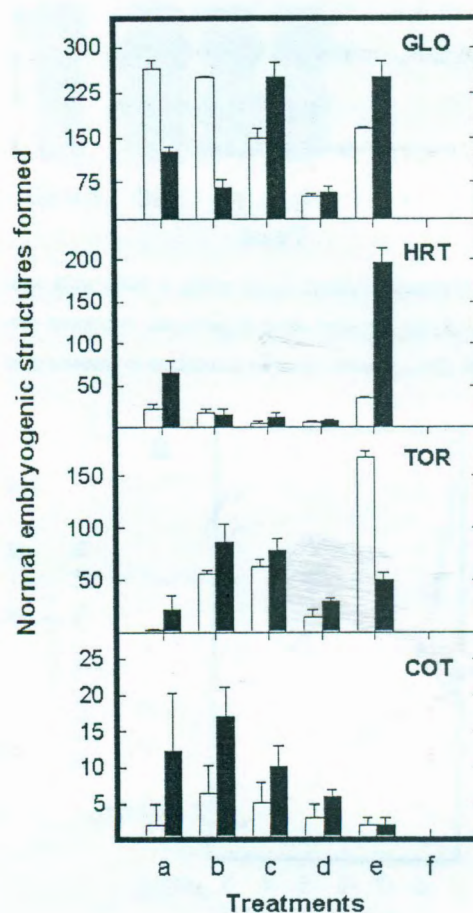


Figure 3.6. Eleven days after induction of somatic embryogenesis, when PREG were formed, different concentrations of wortmannin (c, 5nM; d, 50 nM; e, 5 μ M) diluted in DMSO were added to the culture medium. Control without DMSO or wortmannin (a); or in the presence of DMSO (b). At day 19 (□) or day 49 (■) the normal embryogenic structures were counted (GLO, HRT, TOR, COT). Each data point represents the mean $\pm$ SE of 3 independent experiments.

Under normal conditions the time of PREG formation occurred about 11 days after induction and all development stages were formed at 19 days after PREG formation. The highest percentage of normal somatic embryos, especially cotyledonary embryos (COT), was formed 49 days after PREG formation.

Since wortmannin has to be diluted in DMSO, the effect of this compound was included. When DMSO alone was added, at day 19, no significant effect was seen except for on the TOR stage. At day 49, DMSO decreased the formation of GLO and HRT stages but increased TOR whereas the number of COT was not significantly affected. In the treatments with different concentrations of wortmannin, the number of somatic embryos of late development stages differed depending on the concentration used (Figure 3.6). Four concentrations of wortmannin were used; however the highest concentration (500 μ M) was apparently toxic since no developmental stages (GLO, HRT, TOR or COT) were observed. At day 19, the effect of wortmannin did not follow a particular pattern, for example the formation of TOR stage was doubled, while GLO diminished. A similar effect was seen at day 49, with the exception of COT formation that was markedly inhibited by wortmannin.

DISCUSSION

Phosphoinositides are involved in many cellular processes, such as vesicular traffic (De Camilli et al., 1996), membrane formation (Coté and Crain, 1994), intracellular location of proteins (Franke et al., 1997), dynamics and regulation of the cytoskeleton (Banfic et al., 1998) and cellular signaling (Fruman et al., 1998). Recently the interest in studying phosphoinositides in plant cells has increased (Parmar and Brearley, 1995; Munnik et al., 1998; Meijer et al., 1999; Stevenson et al., 2000; Bunney et al., 2000). The processes in plants have been related to similar processes in other organisms such as yeast and animal cells (Fruman et al., 1998).

We found that the formation of PIP and PI 4,5- P_2 depends on the somatic embryogenesis stage analyzed, with the highest levels being found in the embryogenic calli (EC) and the preglobular structures (PREG).

In PREG, the levels were very high compared to those in EC. PREG is the first differentiated structure in the process of somatic embryogenesis and is formed by changes in the genetic program that have to be regulated. Perhaps the different phosphoinositides, the products of the kinase activities, are involved in this process. This appears to be supported by the analysis of the late development stages. The PIK activity progressively diminished from the globular stage (GLO) to the cotyledonary stage (COT) and the PIPK activity was very low in the globular-shaped embryos. Thus PIPK activity is apparently present mainly in EC and PREG development stages.

These results were obtained using endogenous substrates. The very low activity seen during the late development stages could be due either to a specific regulation of the enzymes or because the concentration of the endogenous substrate was limiting the process. When exogenous substrates were used, the results indicate that the endogenous concentration of PI is limiting the formation of both PIP and PI 4,5-P₂ in EC and PREG. In late development stages apparently, there is also a difference in the formation of the two compounds. However, because of the very low activity in the absence of PI, these results should be taken with caution. Thus, the low PIP formation observed in late stages in Figure 3.2 could be due to an inhibition in PIK activity that would affect the formation of PI 4,5-P₂ because of low substrate PIP concentration. This suggestion is supported by the results in Figure 3.3B where the concentration of PI 4-P is limiting the formation of PI 4,5-P₂ in all stages of development. In the same way, it was important to determine if PI3K or PI4K were present in our model system. Using EC and PREG samples and a boric acid system, it was possible to detect PI3K and PI4K activities (65 and 35%, respectively, of total PIK activity detected) (Figure 3.4). However, for PREG the ratio changed, with the PI4K activity being higher (20% of PI3K and 80% of PI4K).

Several lines of evidence illustrate the importance of the phosphoinositide pathway in plant growth. For example, a high rate of PI and PIP biosynthesis and turnover during germination of *Lilium longiflorum* pollen was related to an intensive membrane flow (Helsper et al., 1986). Also, *in situ* phospholipid kinase activities were strongly

correlated with cell division of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* cell suspensions (Heim and Wagner, 1989).

A few PI3K homologues have been cloned in plant models. In *Arabidopsis thaliana* a PI3K cDNA has been identified. The protein product of this cDNA (AtVPS34) has a considerable amino acid sequence identity to yeast VPS34, however very low PI3K activity was detected. Plants that expressed antisense AtVPS34 mRNA grew extremely poorly and in many cases died, indicating that loss of AtVPS34 function results in a lethal phenotype (Welters et al., 1994). In soybean, two cDNAs have been cloned and characterized and the evidence suggests the expression of a distinctive form of PI3K during nodule organogenesis (Hong and Verma, 1994). Recently, Bunney et al., (2000) provided new evidence on the role of PI3K in plant cells. They demonstrated that both PI 3-P and PI 4-P are present in isolated soybean nuclei and that PI4K activity is associated with the nuclear envelope, whereas PI3K activity and PI 3-P reside within the nuclear matrix. Our work is the first evidence of the presence of PI3K and PI4K activities during somatic embryogenesis. In the present study, a high PI3K activity was detected in EC and it is possible that both PI3K and PI4K activities have specific roles during somatic embryogenesis. However, these results also suggest that the enzyme PIK was present and that the endogenous concentration of the substrate was sufficient to detect enzymatic activity at all stages of development. Diminished PIK activity during late development stages may possibly be due to a regulation of the protein level.

To obtain more information on the PIK present in our model system, experiments were performed to explore the effect of an inhibitor of PIK activity on the formation of PIP. As stated above, wortmannin is a sterol compound that irreversibly inhibits the mammalian PI3K activity with an IC_{50} in the low nanomolar range (Fruman et al., 1998). This compound forms a covalent complex with an active-site residue of bovine PI3K, lysine 802, of the 110 kDa catalytic subunit. This active-site lysine residue is essential for PI3K activity and is conserved throughout all members of the PIK-related protein family (Wymann et al., 1996). Nevertheless, this compound does not inhibit only PI3K activity

because human PI4K is potently inhibited with an IC_{50} of 50 nM, and the PI4K yeast homologue (STT4) with an IC_{50} of 1 nM (Cardenas et al., 1998). In tobacco cells, 33 μ M wortmannin inhibited protein transport to the vacuole and blocked PI3K and PI4K activities *in vitro* (Matsuoka et al., 1995). The purified PI4K (QI) enzyme from spinach plasma membranes was inhibited with an IC_{50} of 7 μ M and the PI4K (QII) enzyme was only 30% inhibited with 10 μ M wortmannin (Westergren et al., 1999). In the present work, experiments *in vitro* using PREG structures showed that wortmannin inhibited the formation of PI 3-P and PI 4-P with IC_{50} of 31 and 6 nM respectively (Figure 3.5), similar to that observed for the mammalian PI3K class III (Fruman et al., 1998).

The effect of wortmannin on somatic embryogenesis *in vivo* was examined and the results in Figure 3.6 show that in samples treated with wortmannin, there was a decrease in the formation of cotyledonary embryos. In general, the addition of wortmannin decreased the percentage of normal embryos. These results indicate that inhibition of the PIK activity is important in the formation of late development stages and, although more experiments are necessary, these are the first indications that the two processes are related. The effect of DMSO observed in the experiments presented in Figure 3.6 should be pointed out DMSO is a highly polar organic liquid and is able to penetrate plant and animal tissues, as well as cell membranes, and to preserve living cells during freezing. DMSO may affect the early development stages during direct somatic embryogenesis in *Drosera rotundifolia* L. (Bobak et al., 1999). In that system, the effect of compounds that affect cytoskeleton polymerization, named trifluralin and colchicine, was partially reversed by the addition of DMSO. This was related to the correct formation of an extracellular matrix surface network during proembryo formation.

In conclusion, this work presents the first evidence for the presence of PI and PIP kinases during somatic embryogenesis in plants and suggests that these enzymes may play an important role in this process.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Victor Loyola's laboratory for the FM line and Dr Alfonso Larqué for the *Saccharomyces cerevisiae* strain. We also acknowledge the support by CONACYT (33646-N) to S.M.T.H.S., the Cátedra Patrimonial to G.R.D.P. (990419-R) and the Doctoral Fellowship to M.J.E.R. (126282).

REFERENCES

Anil VS, Harmon AC and Rao KS (2000) Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. *Plant Physiol* **122**: 1035-1043

Banfic H, Tang X, Batty IH, Downes CP, Chen C and Rittenhouse SE (1998) A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem* **273**: 13-16

Barizza E, Lo Schiavo F, Terzi F and Filippini F (1999) Evidence suggesting protein tyrosine phosphorylation in plants depends on the developmental conditions. *FEBS lett* **477**: 191-194

Blanckaert A, Belingheri L, Vaseeur J and Hilbert J (2000) Changes in lipid composition during somatic embryogenesis in leaves of *Chichorium*. *Plant Sci* **157**: 165-172

Bobak M, Hlavacka A, Ovecka M and Samaj J (1999) Effect of trifluralin and colchicine on the extracellular matrix surface networks during early stages of direct somatic embryogenesis of *Drosera rotundifolia* L. *J Plant Physiol* **155**: 387-392

Bunney TD, Watkins AC, Beven A, Shaw PJ, Hernández L, Lomonossoff GP, Shanks M, Peart J and Drobak BK (2000) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with nuclear transcription sites in higher plants. *Plant Cell* **12**: 1679-1687

Cardenas ME, Sanfridson A, Cutler NS and Heitman J (1998) Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. *Trends Biotech* **16**: 427-433

Chen Q and Boss WF (1990) Short-term treatment with cell wall degrading enzymes increase the activity of the inositol phospholipid kinase and the vanadate-sensitive ATPase of carrot cells. *Plant Physiol* **94**: 1820-1829

Coté GG and Crain RC (1994) Why do plants have phosphoinositides? *Bioessays* **16**: 39-46

De Camilli P, Emr SD, McPherson PS and Novick P (1996) Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* **271**: 1533-1539

Dutta PC and Appelqvist L (1991) Lipids and fatty acid patterns in developing seed, leaf, root and in tissue culture initiated from embryos of *Daucus carota* L. *Plant Sci* **75**: 177-183

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC and Toker A (1997) Direct regulation of the *Akt* proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate. *Science* **275**: 665-668

Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507

Gawer M, Norberg P, Chervin D, Guern N, Yaviv Z, Mazliak P and Kader JC (1999) Phosphoinositides and stress-induced changes in lipid metabolism of tobacco cells. *Plant Sci* **141**:117-127

Halperin W (1995) *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe T.A. (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-16

Heim S and Wagner KG (1989) Inositol phosphates in the growth cycle of suspension cultured plant cells. *Plant Sci.* **63**:159-165

Helsper JPF, De Groot PFM, Linskens HF and Jackson JF (1986) Phosphatidylinositol monophosphate in *Lilium* pollen and turnover of phospholipid during pollen tube extension. *Phytochemistry* **25**: 2193-2199

Hecht V, Vielle-Calzada J, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U and De Vries SC (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* **127**: 803-816

Hong Z and Verma DPS (1994) A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9617-9620

Islas-Flores IR, Chan JL, Oropeza C and Hernández-Sotomayor SMT (2000) Occurrence of phosphorylated proteins and kinase activity in coconut tissues cultured *in vitro* in medium that induces somatic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem* **38**: 825-836

Kirchner JG (1978) Detection of colorless compounds. In: Weissberger A (ed) *Techniques of Chemistry Vol. XIV Thin Layer Chromatography*. Second edition. Wiley-Interscience Publishers, USA pp 193-264

Liu L, Hammond EG and Wurtele ES (1994) Accumulation of petroselinic acid in developing somatic carrot embryos. *Phytochemistry* **37**: 749-753

Matsuoka K, Bassham DC, Raikel NV and Nakamura J (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**: 1307-1318

Meijer HJG, Divecha N, Van den Ende H, Musgrave A and Munnik T (1999) Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta* **208**: 294-298

Munnik T, Irvine RF and Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* **1389**: 222-272

Nato A, Fresneau C, Moursalimova N, De Buyser J, Lavergne D and Henry Y (2000) Expression of auxin and light regulated arrestin-like proteins, G proteins and nucleoside diphosphate kinase during induction and development of wheat somatic embryos. *Plant Physiol Biochem* **38**: 483-490

Parmar PN and Brearley CA (1995) Metabolism of 3- and 4- phosphorylated phosphoinositides and inositol phosphates in stomatal guard cells. *Plant J* **8**: 425-433

Quiroz-Figueroa F, Méndez-Zeel M, Larqué-Saavedra A and Loyola-Vargas VM (2001) Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep* **20**: 679-684

Racagni-Di Palma G, Brito-Argáez L and SMT Hernández-Sotomayor (2002) Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* L. cells. *Plant Physiol Biochem* **40**: 899-906

Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ and De Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**: 2049-2062

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85

Stack JH, Herman PK, Schu PV and Emr SD (1993) A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J* **12**: 2195-2204

Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S and Boss WF (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci* **5**: 252-258

Waldo GL, Morris AJ and Harden TK (1994) Purification of G-protein-regulated phospholipase C from turkey erythrocytes. *Methods Enzymol* **238**: 195-201

Walsh JP, Caldwell KK and Majerus PW (1991) Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11398-11401

Welters P, Takegawa K, Emr SD and Chrispeels MJ (1994) ANVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11398-11401

Westergren T, Ekblad L, Jergil B and Sommarin M (1999) Phosphatidylinositol 4-kinase associated with spinach plasma membranes. Isolation and characterization of two distinct forms. *Plant Physiol* **121**: 507-516

Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD and Panayotou G (1996) Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* **16**: 1722-1733

CAPÍTULO IV

Optimización de la metodología para medir la actividad de lípido cinasas eliminando los lípidos endógenos presentes en los extractos membranales crudos de *Coffea arabica* L.

María Julissa Ek-Ramos, Graciela Racagni-Di Palma and S.M. Teresa Hernández-Sotomayor

ABREVIATURAS

CE, callo embriogénico; GLO, embriones en estadio globular; OGP, n-octil β -D-glucopiranosido; LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; PI, fosfatidilinositol; PIP, fosfatidilinositol monofosfato; PI 3-P, fosfatidilinositol 3-monofosfato; PI 4-P, fosfatidilinositol 4-monofosfato; PI 4,5-P₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIK, fosfatidilinositol cinasa; PI4K, fosfatidilinositol 4-cinasa; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PIPK, fosfatidilinositol monofosfato cinasa; PIP5K, fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa; PMSF, fenil metil sulfonil-fluoruro; PREG; estructuras preglobulares; PVP, polivinil pirrolidona; TLC, cromatografía de placa fina.

RESUMEN

Se hicieron experimentos donde se solubilizó la proteína membranal utilizando el detergente n-octil β -D-glucopiranosido y posteriormente, la solución que contenía a la proteína solubilizada se pasó a través de una columna empacada con la resina AG 1-X8, la cual tiene afinidad por los inositol fosfatos, por lo tanto, los lípidos que contienen estos compuestos, fueron retenidos en la columna y la fracción que no se pegó a la columna se tomó como fuente de proteína.

Con esta metodología se logró eliminar prácticamente la totalidad de los lípidos endógenos y recuperar un porcentaje de proteína suficiente para lograr detectar

diferentes actividades de lípido cinasas, de acuerdo al tipo de sustrato exógeno que se utilizó.

INTRODUCCIÓN

En los estudios realizados de la actividad de lípido cinasas se han seguido dos estrategias básicas: 1) utilizar extractos membranales donde se encuentren los lípidos endógenos que serán utilizados como sustrato (Zbell y Walter-Back, 1988; Heilmann et al., 1999) y 2) utilizar sustratos comerciales adicionados a la poza de lípidos endógena (Hanenberg et al., 1995; Bunney et al., 2000).

En células en suspensión de *Coffea arabica* L., se ha detectado la actividad de lípido cinasas (Racagni et al., 2002), sin embargo, no se han podido estudiar por separado, por lo tanto, se pensó que se debería de estandarizar una metodología en la cual se pudiera medir la actividad de lípido cinasas sin la interferencia de los lípidos endógenos, lo cual nos ayudaría a realizar estudios de actividad enzimática más específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los estándares de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5-P₂) y fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI 4-P) fueron purificados de lípidos de extracto de cerebro (Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizando una columna de neomicina como describen Waldo et al., (1994). El reactivo [γ -³²P] ATP (1.85×10^{10} Bq) fué proporcionado por Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England). El reactivo para la determinación del contenido de proteína utilizando ácido bicinonínico (BCA) fue obtenido de Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill., USA). El fosfatidilinositol (PI) y el detergente n-octil β -D-glucopiranosido fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA). La resina AG 1-X8 fue obtenida de los laboratorios BIORAD (Hercules, CA, USA). Todos los solventes y reactivos fueron grado analítico.

Preparación de extractos membranales crudos

La proporción para la extracción fue de 2.5 mL de amortiguador (50 mM NaCl, 1 mM de EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sacarosa, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 10 mM pirofosfato de sodio, 0.2 mM ortovanadato de sodio y 2% PVP) por g de tejido pulverizado con nitrógeno líquido. El homogenado se centrifugó a 23,700 g durante 30 min a 4°C. Para obtener las fracciones membranal y citosólica se tomó el sobrenadante de la primera centrifugación y se centrifugó nuevamente a 100,000 g durante 45 min a 4°C.

Eliminación de los lípidos endógenos

La pastilla obtenida como se describió anteriormente fue resuspendida en 20 µL de amortiguador al 0.5% de n-octil β-D-glucopiranosido. Se homogenizó utilizando el vórtex durante 2 min y se sonicó durante 30 seg. La solución obtenida fue centrifugada a 100,000 g por 45 min a 4°C.

La columna para la eliminación de los lípidos se preparó previamente empacando la resina AG 1-X8 en una columna de cromatografía poliprep marca BIORAD de 0.8 x 4 cm hasta el nivel correspondiente a 0.6 de la siguiente manera: la resina se suspendió en agua destilada, esta suspensión se pasó a la columna y se centrifugó dos veces durante 15 min a 1,000 g a 4°C hasta que la columna estuvo perfectamente empacada.

El sobrenadante obtenido de la centrifugación a 100,000 g se agregó a la columna empacada con la resina y se centrifugó por 15 min a 1000 g a 4°C. La fracción que no se pegó a la columna fue tomada como fuente de proteína. La cuantificación de proteínas se hizo con el método del ácido bicinónico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Smith et al., 1985).

Ensayo de lípido cinasas

Las actividades de lípido cinasas se ensayaron utilizando muestras de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. obtenidos como mencionan Ek-Ramos et al., sin publicar. La fracción que no se pegó a la columna (FNC) (10 µg de proteína) se

agregó a un amortiguador térmicamente equilibrado a 30°C (40 mM HEPES pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 0.4 mM EGTA, 50 mM NaCl, 0.2 mM ortovanadato de sodio junto con fosfatidilinositol (PI) 500 µM o fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI 4-P) 500 µM, dependiendo del experimento, y [γ -³²P] ATP/ATP (370 MBq/1 mM por ensayo). Después de 5 min, la reacción fue detenida con 1.25 mL de una mezcla de CH₃OH/CHCl₃/HCl 2.4 N (2:2:1, v/v). La extracción de los lípidos se realizó como describen Racagni et al., 2002.

Separación de los lípidos fosforilados

Los lípidos fueron separados por TLC. Las muestras se aplicaron sobre placas de gel de sílica pretratadas con una solución de oxalato de sodio 1% y precalentadas a 110°C durante 60 min antes de utilizarlas. Se utilizó la siguiente mezcla de disolventes para separar los productos: metanol: cloroformo: hidróxido de amonio: agua (45:45:4:11, v/v). La posición de los lípidos radioactivos se determinó por autorradiografía junto con una película NEMTM (Life Science Products, Boston, MA. USA) y por la exposición en un fosforimager GS-525 (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA., USA).

Se utilizó la solución de revelado del ácido fosfomolibdico para la identificación de los estándares. Una vez identificados los productos, se rasparon de la placa y se cuantificó la radiactividad incorporada utilizando un contador de centelleo y EcoLume, una mezcla de líquidos de centelleo (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA., USA).

RESULTADOS

En la figura 4.1 se muestran los resultados obtenidos de la estandarización de la metodología. En la figura 4.1A se muestra el contenido de lípidos presente en cada una de las etapas de la metodología y en la figura 4.1B el contenido total de proteína.

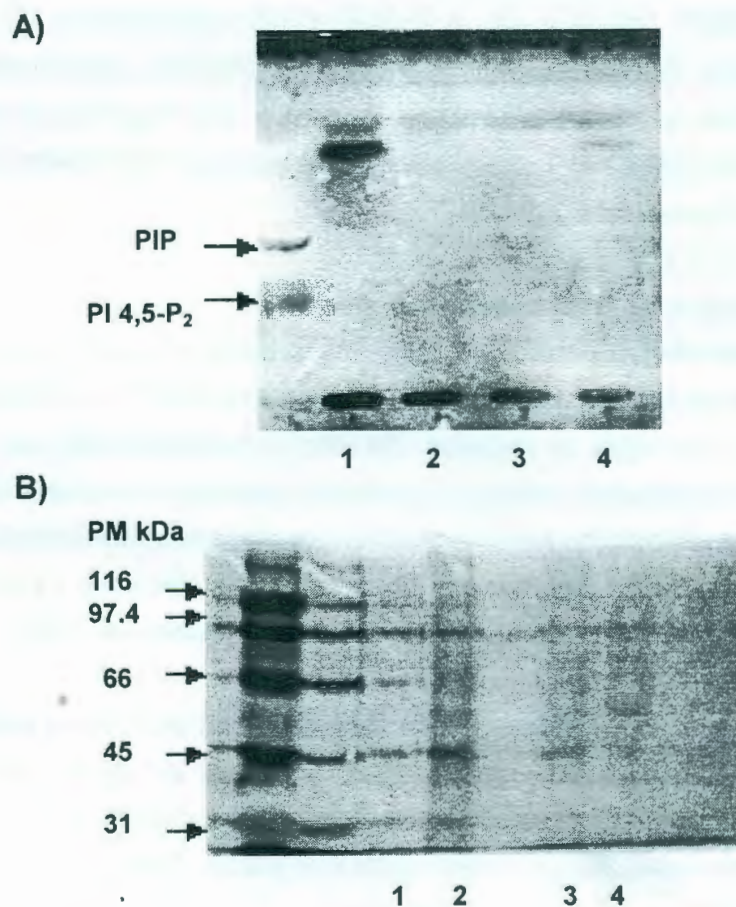


Figura 4.1. Análisis del contenido de lípidos y proteínas de las diferentes fracciones obtenidas durante la estandarización de la metodología de eliminación de lípidos endógenos. **A)** Cromatoplaqueta teñida con ácido fosfomolibdico de los lípidos extraídos con MeOH:CHCl₃ (2:1[v/v]), HCl 2.4N y MeOH: HCl 1N (1:1 [v/v]) y separados en el sistema de disolventes que se describe en materiales y métodos. Las muestras correspondieron a la etapa preglobular y representan el contenido de lípidos presentes en 100 µg de proteína. **B)** Gel SDS-PAGE al 10% de las proteínas contenidas en cada muestra analizada. Se utilizaron 10 µg de proteína por carril. 1. Sobrenadante del tratamiento del extracto membranal crudo con 0.5% del detergente n-octil β-D-glucopiranosido. 2. Extracto citosólico. 3. Extracto membranal crudo. 4. Fracción que no se pegó a la columna.

La cantidad de lípidos endógenos detectados en cada fracción disminuyó de acuerdo al tratamiento aplicado. En el sobrenadante obtenido después de solubilizar las proteínas, se observó que todavía contuvo un cierto porcentaje de lípidos, el cual disminuyó después de pasarlo por la columna. Sin embargo, en la última fracción se detectó la presencia de un lípido que aumentó su concentración después de pasar la muestra por la columna. Este compuesto no fue identificado.

Cuando se comparó el contenido de proteína de la parte solubilizada con la fracción que no se pegó a la columna, no se observaron grandes diferencias. Únicamente se observó la disminución en la concentración de una proteína de alrededor de 45 kDa. Sin embargo, en general, al pasar la proteína solubilizada a través de la columna, no se observó la pérdida de una cantidad considerable de proteína.

En la figura 4.2 se muestra la autorradiografía de la cromatoplaaca con los productos del ensayo de lípido cinasas utilizando la fracción que no se pegó a la columna (FNC) como fuente de proteína. Cuando se midió la actividad de lípido cinasas sin la adición de sustratos exógenos, se observó la formación de un compuesto que corresponde con el ácido lisofosfatídico (LPA) reportado por Racagni et al., 2002. Esto indica que en FNC se encuentran tanto el sustrato como la enzima, que son necesarios para su síntesis.

Por otra parte, cuando se agregó PI 500 μ M, se observó la formación del PIP y la formación del LPA no cambió, por lo tanto, esta metodología es buena para observar cambios en la actividad de PIK.

Cuando se hizo el ensayo con PI 4-P 500 μ M no se observó la síntesis del PI 4,5-P₂, por lo que esto sugiere 1) que posiblemente la cantidad de proteína utilizada en el ensayo no fue la suficiente para detectar la actividad enzimática, 2) que al haber pasado la proteína por la columna, posiblemente se eliminó algún factor necesario para su actividad o quizás se desnaturizó y 3) que posiblemente la cantidad de sustrato exógeno no fue suficiente para detectar la actividad enzimática.

De igual manera, en el testigo con sustrato endógeno, cuando se adicionaron 500 μM de PI 4-P, se observó la formación de una banda que se separó por debajo de la banda correspondiente al PIP. En los experimentos realizados con FCN, se observó únicamente la formación de este producto cuya movilidad relativa es similar a la observada para el PI 3-P en este mismo sistema de disolventes. Con experimentos posteriores y utilizando la metodología para la separación de los dos isómeros del PIP utilizando el sistema del ácido bórico (Walsh et al., 1991) se podrá determinar si la síntesis de este compuesto se ve afectada por PI 4-P.

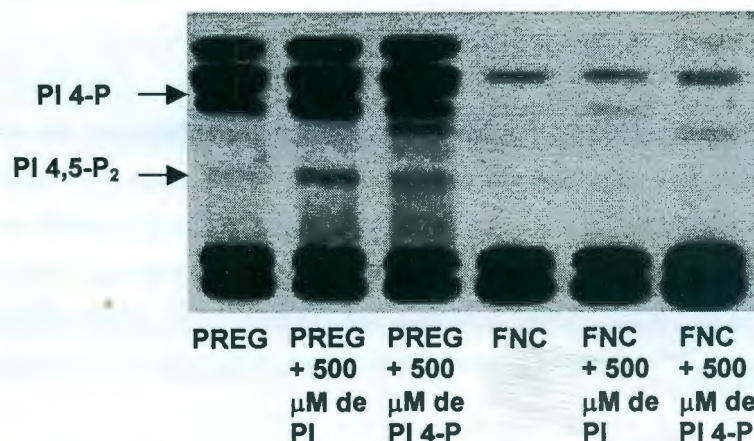


Figura 4.2. Autorradiografía de la cromatoplaqueta con los productos obtenidos del ensayo de lípido cinasas utilizando la fracción que no se pegó a la columna de resina AG 1-X8 (FNC). Se utilizaron como testigos los extractos membranales crudos de PREG. Se utilizaron 20 μg de proteína por ensayo. El sistema de disolventes fue $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (45:45:4:11 [v/v]). Se utilizaron como sustratos exógenos 500 μM de PI y 500 μM de PI 4-P. Esta autorradiografía es la representativa de 3 experimentos independientes.

De igual manera, se realizaron determinaciones de la actividad de lípido cinasas, utilizando esta metodología, de las muestras correspondientes al callo embriogénico (CE) y a los embriones en estadio globular (GLO) (Figuras 4.3A y 4.3B respectivamente).

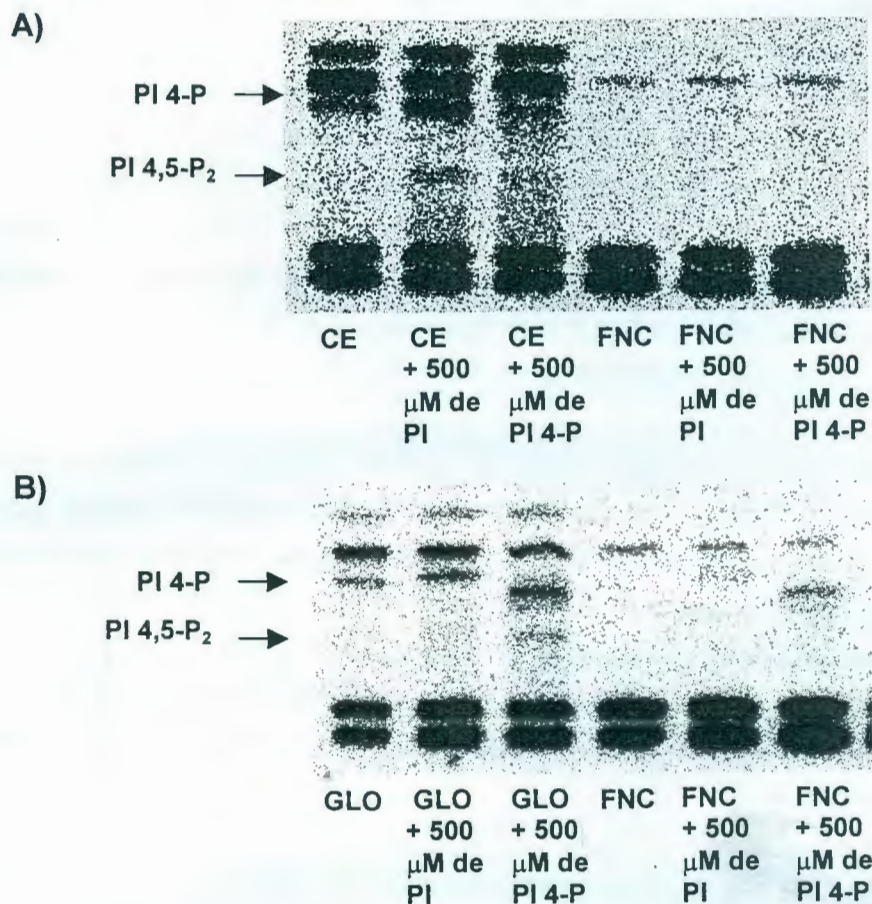


Figura 4.3. Autorradiografía de la cromatoplaaca con los productos obtenidos del ensayo de lípido cinasas utilizando la fracción que no se pegó a la columna de resina AG 1-X8 (FNC). Se utilizaron como testigos los extractos membranales crudos de A) CE y B) GLO. Se utilizaron 20 μ g de proteína por ensayo. La reacción y la separación de los productos se hizo como se describe en la figura 4.2. Esta autorradiografía es la representativa de 3 experimentos independientes.

Los resultados indican que esta metodología es reproducible, además de que se aportaron resultados que apoyan los obtenidos anteriormente utilizando sustrato endógeno y adicionado sustratos exógenos (Figura 4.3).

DISCUSIÓN

Al principio se pensó en utilizar detergentes para solubilizar las proteínas de los extractos membranales crudos, sin embargo, esta estrategia no garantiza la eliminación de una gran cantidad de lípidos endógenos, debido a que por su naturaleza química, los lípidos podrían solubilizarse junto con las proteínas, además de que existen reportes en la literatura que indican que algunos tipos de detergentes como el Tritón X-100, influyen sobre la actividad de las fosfoinosítido cinasas que se han encontrado en diferentes organismos (Steinert et al., 1994; Okpodu et al., 1995; Fruman et al., 1998; Westergren et al., 1999).

Con base en esto se decidió usar la siguiente estrategia: primero se solubilizó la proteína con un detergente que no tuviera antecedentes de influir sobre la actividad de lípido cinasas y posteriormente se pasó la parte soluble a través de una columna con afinidad por los compuestos que podrían interferir en las actividades enzimáticas que se requieren medir. Por lo tanto se decidió utilizar el detergente n-octil β -D-glucopiranosido y una columna empacada con la resina AG 1-X8, la cual tiene afinidad por los inositol fosfatos (AG1, AG MP-1 and AG2 strong anion exchange resin introduction manual-BIORAD).

Se determinó que la concentración adecuada del detergente fue del 0.5% y que al utilizar la columna con la resina AG 1-X8, se logró eliminar un gran porcentaje de lípidos endógenos. Sin embargo, no se logró eliminar a los lípidos en su totalidad, se encontró la presencia de un lípido que aún no ha sido identificado. Al utilizar la fracción que no se pegó a la columna (FNC) y al adicionar PI, únicamente se observó la formación del PIP, por lo que este sistema puede ser utilizado para estudiar específicamente a la PIK. Por otra parte, al agregar el PI 4-P, no se observó la formación del PI 4,5-P₂, lo que indicó que posiblemente esta metodología no podría ser utilizada para medir la actividad de la PIPK, sin embargo, también se observó un efecto sobre la formación del PIP, por lo que esto sugiere que de alguna manera, la PIK o PIKs presentes en FNC están siendo reguladas por PI 4-P y esto también nos indica que esta metodología podría ser una buena herramienta para estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

Bunney TD, Watkins AC, Beven A, Shaw PJ, Hernández L, Lomonossoff GP, Shanks M, Peart J and Drobak BK (2000) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with nuclear transcription sites in higher plants. *Plant Cell* **12**: 1679-1687

Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507

Hanenberg A, Wissing JB and Wagner KG (1995) Properties of phosphatidylinositol 4-kinase I from suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **112**: 53-63

Heilmann I, Perera IY, Gross W and Boss WF (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* **119**: 1331-1339

Okpodu CM, Gross W, Bukhart W and Boss WF (1995) Purification and characterization of a soluble phosphatidylinositol 4-kinase from carrot suspension culture cells. *Plant Physiol* **107**: 491-500

Racagni-Di Palma G, Brito-Argáez L and SMT Hernández-Sotomayor (2002) Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* L. cells. *Plant Physiol Biochem* **40**: 899-906

Steinert P, Wissing JB and Wagner KG (1994) Manganese-stimulated phosphatidylinositol 4-kinase from *Dunaliella parva*: purification and characterization. *Plant Sci* **101**: 105-114

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85

Waldo GL, Morris AJ and Harden TK (1994) Purification of G-protein-regulated phospholipase C from turkey erythrocytes. *Methods Enzymol* **238**: 195-201

Walsh JP, Caldwell KK and Majerus PW (1991) Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11398-11401

Westergren T, Ekblad L, Jergil B and Sommarin M (1999) Phosphatidylinositol 4-kinase associated with spinach plasma membranes. Isolation and characterization of two distinct forms. *Plant Physiol* **121**: 507-516

Zbell B and Walter-Back C (1988) Signal transduction of auxin on isolated plant cell membranes: indications for a rapid polyphosphoinositide response stimulated by indolacetic acid. *Journal of Plant Physiol* **133**: 353-360

CAPÍTULO V

Discusión general

En este capítulo se presenta una discusión general acerca de los resultados obtenidos al analizar la presencia de la actividad de lípido cinasas durante el ciclo de cultivo de células en suspensión y durante los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de *Coffea arabica* L. Los resultados indican la presencia de la actividad de la PI3K, de la PI4K y de diferentes miembros de la familia de las PIPKs y las evidencias encontradas sugieren que podrían tener una función importante en la regulación de procesos de proliferación y diferenciación celular.

ACTIVIDAD DE LÍPIDO CINASAS ENCONTRADAS EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Coffea arabica* L.

El trabajo se inició midiendo la actividad de lípido cinasas de las células en suspensión de la línea L-7 de *Coffea arabica* L. Los resultados mostrados en el capítulo II revelan la presencia de la actividad de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) y de la fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K), las cuales cambian durante el ciclo de cultivo de las células en suspensión; particularmente, en las etapas donde las células presentan una alta tasa de proliferación. Estos resultados concuerdan con información encontrada en la literatura que señala la existencia de una alta tasa de recambio de fosfoinosítidos durante el crecimiento de células en suspensión de diferentes modelos vegetales (Heim y Wagner, 1986; Falkenau et al., 1987), incluyendo células en suspensión de *Coffea arabica* L. (Racagni et al., 2002). Con los resultados presentados en el capítulo II se aportan evidencias que indican que el mayor porcentaje de actividad de la fosfatidilinositol cinasa (PIK) corresponde a la PI4K, al menos en el día 7 de cultivo, en el que las células se encuentran en la etapa lineal de crecimiento y en el que las actividades de lípido cinasas analizadas fueron las mas altas. De igual manera, se encontró la formación de diferentes isómeros del fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) y aunque se requiere de más estudios para confirmar su identidad, los resultados indican la posible formación del PI 3,4-P₂ o del PI 3,5-P₂ en

las células en suspensión de *Coffea arabica* L., compuestos que han sido reportados en muy pocos modelos vegetales (Parmar y Brearley, 1995; Meijer et al., 1999).

Por otra parte, durante procesos de desarrollo vegetal, se habían reportado la presencia de la actividad de la PIK y de la fosfatidilinositol monofosfato cinasa PIPK durante la germinación del polen de *Lilium longiflorum* (Helsper et al., 1986). Sin embargo, durante la embriogénesis somática, no se había estudiado el sistema de los fosfoinosítidos.

LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Coffea arabica* L.

El café es una planta tropical de gran importancia económica. La propagación *in vitro* de este cultivo ha sido ampliamente estudiada. Starinsky (1970) obtuvo éxito en la primera regeneración de café por embriogénesis somática, a partir de secciones de brotes ortotrópicos de *Coffea canephora*. Después, Söndahl y Sharp (1977) obtuvieron embriones somáticos utilizando el callo embriogénico que se formó a partir de secciones de hojas de *Coffea arabica* L. Desde entonces, varios investigadores han seguido trabajando con esta especie con el objetivo de optimizar el proceso (Dublin, 1981; Yasuda et al., 1985; García y Menéndez, 1987; Acuña y De Peña, 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992). Recientemente, el grupo del Dr. Loyola en CICY fue capaz de inducir la embriogénesis somática en forma directa, tanto en *C. arabica*, como en *C. canephora* y demostró que el origen de los embriones es unicelular (Quiroz-Figueroa et al., 2002b). De igual manera, se ha determinado la presencia de proteínas específicas del tejido embriogénico (Menéndez et al., 1994), la expresión de una quitinasa ácida en los primeros estadios del desarrollo embriogénico (Rojas-Herrera y Loyola-Vargas, 2002) y la presencia de proteínas extracelulares que parecerían tener una función en la inhibición de la embriogénesis somática y en el desarrollo de los embriones (Quiroz-Figueroa, comunicación personal). Además, también se ha estudiado la composición de las proteínas intracelulares de los callos embriogénicos y no embriogénicos. Se ha encontrado que en el callo embriogénico existen proteínas de 130, 100, 32 y 13.3 kDa, que no se encuentran en el callo no embriogénico (Quiroz-Figueroa et al., 2002a). Sin embargo, hasta la fecha, no se había reportado la presencia de componentes de rutas de transducción de señales

durante la inducción de la embriogénesis somática o durante el desarrollo embriogénico en esta especie.

Con base en lo anterior, en este trabajo se investigó la posibilidad de que durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. se encontraran evidencias de la presencia de uno de los componentes de las rutas de transducción de señales conocido como sistema de los fosfoinosítidos, debido a que éste ha sido relacionado, en células vegetales, con la percepción y la respuesta a señales externas como los inductores fúngicos, el estrés osmótico y el estrés hídrico, la luz, los reguladores del crecimiento, etc. (Munnik et al., 1998; Heilmann et al., 1999; Stevenson et al., 2000). En este sistema, se encuentran involucradas una serie de enzimas que incluyen lipasas, lípido fosfatasas y lípido cinasas. Las lípido cinasas, específicamente las fosfoinosítido cinasas, son el grupo de enzimas de las cuales se tiene más información (Fruman et al., 1998; Stevenson et al., 2000) y en las cuales se enfocó el estudio.

CLASIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Coffea arabica* L.

El trabajo se inició caracterizando el proceso embriogénico durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. (realizado según lo reportado por Quiroz-Figueroa et al., 2002b) y separando cada estadio de desarrollo de acuerdo a sus características morfológicas. En reportes anteriores se ha mencionado la existencia de cinco estadios de desarrollo claramente diferenciados (Menéndez-Yuffá y García, 1997), si bien recientemente se han podido caracterizar los seis estadios de desarrollo esperados (Quiroz-Figueroa et al., 2002b). Después de la transferencia de los callos embriogénicos al medio de inducción de la embriogénesis somática, las primeras estructuras diferenciadas que se han observado en café y en otras especies como *Elaeis guineensis* (Touchet et al., 1991), *Quercus suber* (El Maataoui et al., 1990) y *Picea abies* (Mo y Von Arnold, 1991) son las estructuras preglobulares (PREG), las cuales también han sido llamadas agregados proembriogénicos o proembriones (Quiroz-Figueroa et al., 2002b).

Las PREG están formadas por células pequeñas, relativamente isodiamétricas, con citoplasma denso, núcleo prominente y paredes celulares gruesas, algunas de ellas rodeadas por una epidermis. El color de estas estructuras es blanco o amarillo brillante, en contraste con el color café oscuro de los callos embriogénicos de los cuales se originaron (Menéndez-Yuffá y García, 1997; Quiroz-Figueroa et al., 2002b).

Posteriormente y debido a divisiones celulares sucesivas de las PREG, se originan los estadios característicos de desarrollo de la embriogénesis somática en plantas dicotiledóneas: el estadio globular, que se caracteriza por su estructura esférica, su superficie lisa, y su color blanco y brillante (Söndahl y Sharp, 1977; Dublin, 1981; Neuenschwander y Baumann, 1992; Quiroz-Figueroa et al., 2001); el estadio de corazón, en el que se observa la formación de dos dominios laterales en el extremo apical y el inicio de la diferenciación en el extremo basal, lo cual establecerá la polaridad y el patrón morfológico que posteriormente caracterizará a los embriones maduros; el estadio de torpedo, en el que se observa la elongación del extremo basal, el cual posteriormente formará la raíz y el estadio cotiledonario, en el que los dos dominios del extremo apical han crecido y han formado los cotiledones. Posteriormente, otra serie de procesos de diferenciación celular formarán las hojas, a partir de los cotiledones, en tanto que la raíz se formará a partir del extremo basal de las plántulas (Golberg et al., 1994).

En este trabajo, los diferentes estadios de desarrollo encontrados durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L., desde el estadio globular hasta el de torpedo muestran las características mencionadas anteriormente además de que son morfológica e histológicamente similares a los reportados para la embriogénesis cigótica en *Coffea canephora* (Moens, 1965). Así que, como lo muestra la figura 3.1, los embriones somáticos se clasificaron como: el callo embriogénico (CE) antes de la inducción de la embriogénesis somática, seguida de las estructuras preglobulares (PREG) los embriones en estadio globular (GLO), corazón (COR), torpedo (TOR) y cotiledonario (COT).

ACTIVIDAD DE FOSFOINOSÍTIDO CINASAS PRESENTES EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Coffea arabica* L.

En café, se ha demostrado la presencia de los fosfoinosítidos y la actividad de fosfolipasas (Martínez-Estévez et al., 2001), fosfoinosítido fosfatasas (Racagni-Di Palma, comunicación personal) y fosfoinosítido cinasas en células en suspensión (Racagni-Di Palma et al., 2002).

Los resultados mostrados en el capítulo III muestran que la actividad de las fosfoinosítido cinasas se encuentran presentes también durante la embriogénesis somática. Así mismo, estas actividades cambian de acuerdo con el estadio de desarrollo analizado. Las fosfoinosítido cinasas identificadas fueron la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) y la fosfatidilinositol monofosfato 5-cinasa (PIP5K).

Durante la formación de PREG, las actividades de la PI4K y la PIP5K fueron las más altas, posteriormente, la actividad de la PIK fue disminuyendo gradualmente hasta el estadio cotiledonario.

Estos resultados sugieren que la regulación de la actividad de la PIK podría ser importante durante el proceso embriogénico debido a que se observó el aumento de su actividad, especialmente de la PI4K desde CE a PREG, lo cual fue muy similar a lo observado en el día 7 de cultivo de las células en suspensión de *Coffea arabica* L. (Figura 2.3). Además, se observó una correlación entre la disminución en la actividad de PIK y la formación de embriones en estadios avanzados de desarrollo. De igual manera, el producto de esta enzima, el PI 4-P, al ir disminuyendo gradualmente, limita la formación del PI 4,5-P₂, si bien la PIP5K se encuentra activa en todos los estadios de desarrollo analizados.

Evidencias reportadas en la literatura indican que la actividad de PI4K se encuentra en diferentes compartimentos celulares y se ha visto relacionada con procesos de respuesta a condiciones de estrés y a la presencia de reguladores del crecimiento

(Stevenson et al., 2000). Por lo tanto, esta enzima podría estar involucrada en la regulación de los cambios en el programa genético que deben producirse para la formación de PREG y los estadios de desarrollo más avanzados.

Para conocer más acerca de la PIK encontrada en nuestro sistema, se realizaron experimentos utilizando la wortmanina, un inhibidor de la actividad de PIK en células animales, levaduras y plantas (Fruman et al., 1998). Los resultados indican que la wortmanina tiene una IC_{50} 31 nM para la PI3K y una IC_{50} 6 nM para la PI4K.

De igual manera y con la hipótesis de que la inhibición de la actividad de PIK encontrada en PREG podría regular la formación de embriones en estadios de desarrollo avanzados, se agregaron diferentes concentraciones de wortmanina al medio de inducción de la embriogénesis somática cuando las estructuras preglobulares ya se encontraban formadas.

¿QUÉ OCURRE CON EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA SI SE AGREGAN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE WORTMANINA AL MEDIO DE INDUCCIÓN?

Aunque estos son los primeros experimentos realizados utilizando la wortmanina en el proceso de embriogénesis somática, existen evidencias de que, al utilizar células en suspensión de tabaco, varias proteínas que se localizan comúnmente en la vacuola, son secretadas al medio de cultivo en presencia de 33 μ M de wortmanina (Matsuoka et al., 1995). Estos resultados sugieren que, al menos en tabaco, este compuesto afecta el transporte de proteínas. De igual manera, cuando la wortmanina ha sido empleada en células animales, se inhibe la estimulación, mediada por antígenos, de los neutrófilos, la secreción de histamina por las células basofílicas afectadas por leucemia y la producción de óxido nítrico en macrófagos de pollo. Así mismo, existen evidencias de que este compuesto inhibe la respuesta a factores del crecimiento (Cardenas et al., 1998).

En nuestro sistema, al utilizar diferentes concentraciones de wortmanina, la eficiencia en la formación de embriones somáticos fue menor que en los testigos, por lo que este

compuesto podría estar interviniendo en los procesos relacionados con la morfogénesis de los embriones, sin embargo se requiere de experimentos más finos para conocer las actividades enzimáticas que están siendo modificadas por los tratamientos con wortmanina.

Por otra parte, en el tratamiento en el que se agregó únicamente al dimetil sulfoxido (DMSO), se observó que el contenido de PREG fue mayor que en el de todos los demás tratamientos. Existen evidencias de que durante los estadios tempranos de la embriogénesis somática en *Drosera rotundifolia* (Bobak et al., 1999)), específicamente en los proembriones, se forma una estructura parecida a una red, la cual fue hidrolizada por proteasas y por enzimas que degradan la pared celular y posteriormente restaurada con tratamientos con DMSO (Bobak et al., 1999).

Las características reportadas para los proembriones por Söndahl et al. (1979) y Bobak et al. (1999) son muy parecidas a las observadas en las PREG descritas en este trabajo (Capítulo III), por lo tanto, el aumento en el número de PREG, con el tratamiento con DMSO, podría estar relacionado con el efecto del DMSO sobre la restauración de esta red.

Por otra parte, es importante puntualizar que el DMSO es un compuesto orgánico altamente polar y ampliamente utilizado como crioprotector debido a su habilidad para proteger los tejidos celulares de los daños provocados por el congelamiento, además de que, por su naturaleza química, tiene la habilidad de penetrar fácilmente las membranas celulares, por lo que se utiliza como agente disolvente de muchos compuestos en análisis *in vivo*.

De igual manera, en estudios realizados con células animales se ha establecido que el DMSO actúa como protector de las respuestas mediadas por especies reactivas de oxígeno, ya que es un atrapador de radicales libres (particularmente radical hidroxilo) (Arita et al., 2001; Zhang et al., 2002). Así mismo, se le han atribuido múltiples funciones como el de agente antiinflamatorio y como regulador de crecimiento en células vegetales por lo que, durante la embriogénesis somática, es posible que se encuentre modificando alguno de los eventos claves para la formación de los PREG y

probablemente actúa utilizando un proceso en donde se encuentran involucradas especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, se requiere de mayores estudios, por lo que la información reportada en la literatura, utilizando células animales, proporcionan la base para establecer estrategias experimentales que permitan conocer la posible función del DMSO durante la embriogénesis somática.

Así que, con base en todo lo anterior, podemos decir que en este trabajo se presentan las primeras evidencias que muestran una correlación entre un aumento en la actividad de las fosfoinosítido cinasas y la formación de embriones en diferentes estadios de desarrollo. De igual manera, la actividad que aparentemente tiene una función clave en este proceso es la PI4K, cuya actividad aumenta en PREG.

En la figura 5.1 presentamos un esquema que resume los eventos que se encontraron en los diferentes estadios de desarrollo de la embriogénesis somática analizados.

En esta figura se muestra que en el callo embriogénico (CE), existen actividades basales de PIK (PI3K y PI4K) y de PIP5K, las cuales aumentan en las estructuras preglobulares (PREG) (PI4K y PIP5K). El aumento en la actividad de estas enzimas podría formar parte de las señales que se encienden como respuesta a las condiciones de inducción de la embriogénesis somática, sin embargo, aun queda por determinar si el aumento en estas actividades es causa o consecuencia de los procesos de formación y proliferación de dichas estructuras, o bien, se trata de dos eventos paralelos, pero no necesariamente relacionados causalmente.

Por otra parte, una vez formadas las PREG, deben promoverse otra serie de procesos para la formación de los diferentes estadios de desarrollo embriogénico.

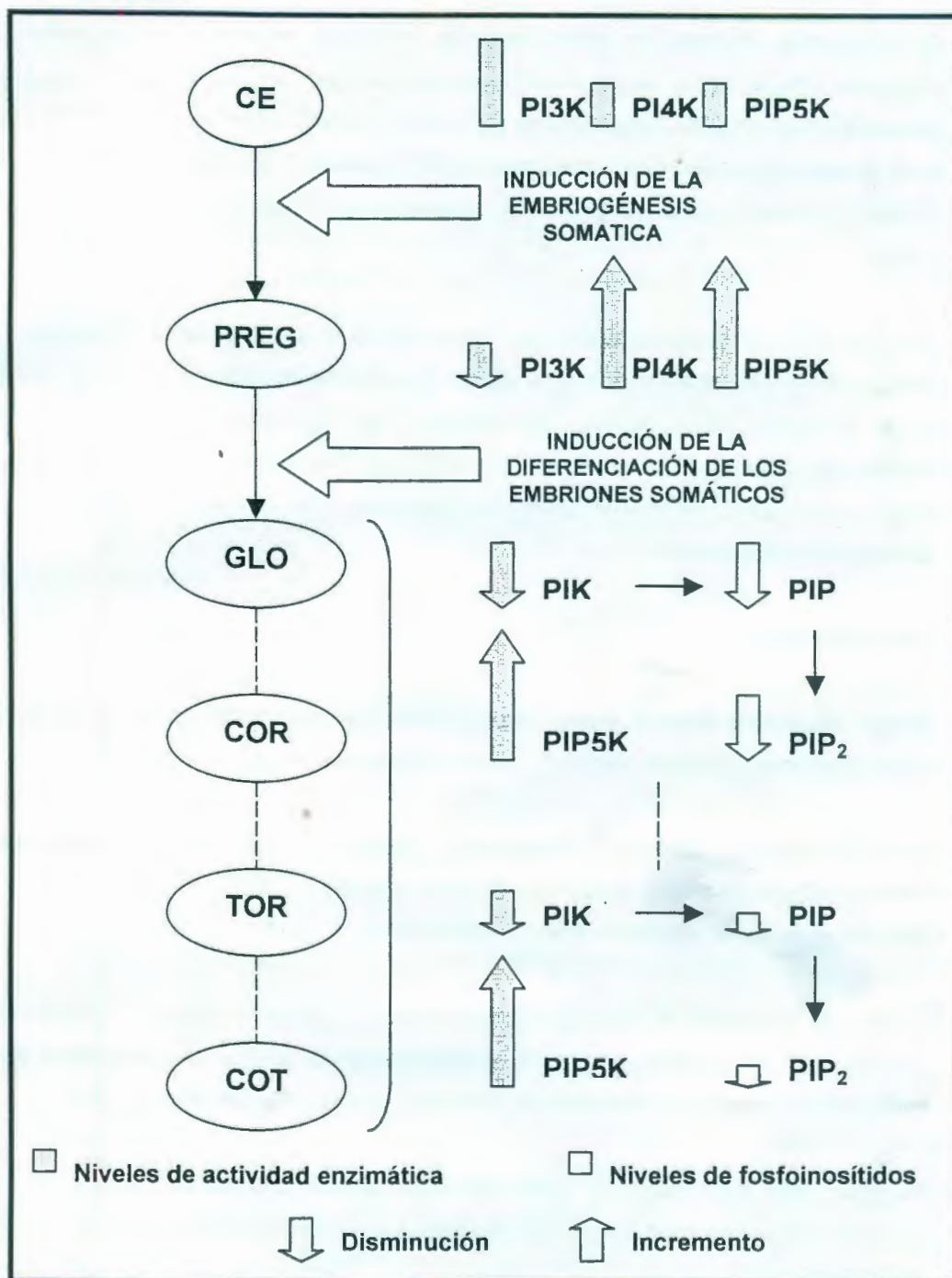


Figura 5.1. Esquema de los eventos que se encontraron en los diferentes estadios de desarrollo de la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L. Se muestra la inducción de la actividad de fosoinositido cinasas y los cambios en los niveles de actividad de acuerdo al estadio de desarrollo analizado.

En el esquema planteado se indica que en los embriones globulares, primer estadio de desarrollo embriogénico claramente diferenciado, la actividad de la enzima PIK (muy probablemente la PI4K), disminuye en comparación con la observada en PREG y que la disminución en la formación del producto de la actividad de esta enzima, el PIP, es limitante para la formación del PI 4,5-P₂, a pesar de que la enzima PIP5K se encuentra activa.

Así mismo, en los siguientes estadios de desarrollo la actividad de la PIK disminuye gradualmente y se observa el mismo efecto de la disminución de la formación del PIP en la formación del PI 4,5-P₂. Sin embargo, aun queda por determinar si esta disminución gradual en la actividad de la PIK está involucrada en la inducción de la diferenciación de los diferentes estadios de desarrollo o es un efecto de la disminución de la proliferación celular.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña JR and De Peña M (1991) Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. Plant Cell Reports **10**: 345-348

Arita K, Kobuchi , Utsumi T, Takehara Y, Akiyama J, Horton AA and Utsumi K (2001) Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. Biochemical Pharmacology **62**: 821-828

Bobak M, Hlavacka A, Ovecka M and Samaj J (1999) Effect of trifluralin and colchicine on the extracellular matrix surface networks during early stages of direct somatic embryogenesis of *Drosera rotundifolia* L. J Plant Physiol **155**: 387-392

Cardenas ME, Sanfridson A, Cutler NS and Heitman J (1998) Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. Trends in Biotech **16**: 427-433

Dublin P (1981) Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de cafétier Arabusta. Café Cacao Thé **25** : 237-242

El Maataoui M, Espagnac H and Michaux-Ferriere N (1990) Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. *Ann Bot* **66** : 183-190

Falkenau C, Heim S and Wagner KJ (1987) Effect of cytokinins on the phospholipid phosphorylation of the suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **50**: 173-178

Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507

García E de and Menéndez A (1987) Embriogénesis somática a partir de explantes foliares de cafeto "catimor". *Café Cacao Thé* **31**: 15-22

Golberg RB, Paiva GD and Yadegari R (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* **266**: 605-614

Heilmann I, Perera IY, Gross W and Boss WF (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* **119**: 1331-1339

Heim S and Wagner KG (1986) Evidence of phosphorylated phosphatidylinositols in the growth cycle of suspension cultured plant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 1175-1182

Helsper JPF, De Groot PFM, Linskens HF and Jackson JF (1986) Phosphatidylinositol monophosphate in *Lilium* pollen and turnover of phospholipid during pollen tube extension. *Phytochem* **25**: 2193-2199

Martínez-Estévez M, Muñoz-Sánchez JA, Loyola-Vargas VM and Hernández-Sotomayor SMT (2001) Phospholipase C activity in a cellular suspension of coffee (*Coffea arabica* L.): Aluminum effect. En: Martínez-Estévez M. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Meijer HJG, Divecha N, Van den Ende H, Musgrave A and Munnik T (1999) Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta* **208**: 294-298

Menéndez-Yuffá A, García E de and Segura-Nieto M (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* L cv. catimor. *Plant Cell Reports* **13**: 197-202

Menéndez-Yuffá A and García E de (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "catimor". *Protoplasma* **199**: 208-214

Matsuoka K, Bassham DC, Raikel NV and Nakamura J (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**: 1307-1318

Mo LH and Von Arnold S (1991) Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of norway spruce (*Picea abies*). *J Plant Physiol* **138**: 223-230

Moens P (1965) Développement de l'ovule et embryogénese chez *Coffea canephora* Pierre. *Cellule* **65**: 129-147

Munnik T, Irvine RF and Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* **1389**: 222-272

Neuenschwander B and Baumann TW (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Plant Cell Reports* **10**: 608-612

Quiroz-Figueroa F, Méndez-Zeel M, Larqué-Saavedra A and Loyola-Vargas VM (2001) Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep* **20**: 679-684

Quiroz-Figueroa F, Méndez-Zeel M, Sánchez-Teyer F, Rojas-Herrera R and Loyola-Vargas VM (2002a) Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*. J Plant Physiol, in press

Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R and Loyola-Vargas VM (2002b) Histological studies on ontogenesis, development stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Rep 20: 1141-1149

Parmar PN and Brearley CA (1995) Metabolism of 3- and 4- phosphorylated phosphoinositides and inositol phosphates in stomatal guard cells. Plant J 8: 425-433

Racagni-Di Palma G, Brito-Argáez L and SMT Hernández-Sotomayor (2002) Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* L. cells. Plant Physiol and Biochem 40: 899-906

Rojas-Herrera R and Loyola-Vargas VM (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. Plant Sci, in press

Söndahl MR and Sharp WR (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 81: 395-408

Söndahl MR, Salisbury JL and Sharp WR (1979) SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 94: 101-108

Starinsky G (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot Neerl 19: 509-514

Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S and Boss WF (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Sc* **5**: 252-258

Touchet B de, Duval Y and Pannetier C (1991) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports* **10**: 529-532

Yasuda T, Fujii Y and Yamaguchi T (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol* **26**: 595-597

Zhang YW, Yao XS, Murota S and Morita I (2002) Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on the hypoxia/reoxygenation-induced tyrosine kinase activation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Prostaglandins, Leucotrienes & Essential Fatty Acids* **67**: 253-261

CAPÍTULO VI

Conclusiones

Resumen de resultados

Las principales contribuciones de este trabajo son:

- 1.- En las estructuras preglobulares (PREG) se detectaron las actividades más altas de PI4K y PIP5K. En este trabajo se presentan las primeras evidencias de la presencia de la actividad de fosfoinosítido cinasas en las diferentes etapas de desarrollo durante la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L.
- 2.- La actividad de PIK encontrada en el callo embriogénico (CE) tuvo una relación de PI3K (65%) y PI4K (35%), la cual cambió en PREG, con una relación de PI3K (20%) y PI4K (80%).
- 3.- La wortmanina, un inhibidor de la actividad de PIK en células animales, levaduras y plantas, tuvo un efecto sobre la disminución en la formación de embriones normales en estadios tardíos del desarrollo, específicamente de embriones cotiledonarios (COT).
- 4.- Colateralmente, se confirmó que la adición de DMSO a los cultivos embriogénicos de algunas especies modifica el desarrollo de los embriones, sin embargo, no se profundizó mayormente en este aspecto.

Conclusiones generales

El hecho de que los niveles de actividad de diversas fosfoinosítido cinasas cambie durante la embriogénesis somática, aunado al efecto de la wortmanina sobre la inducción de embriones, sugiere que dichas enzimas participan en los mecanismos de inducción o establecimiento de los embriones en cultivo.

Aunque la embriogénesis somática es un modelo *in vitro*, los resultados muestran que al parecer las fosfoinosítidos cinasas podrían jugar papeles importantes en la regulación de la diferenciación celular en plantas, tal como parece suceder en otros organismos eucariotes.

CAPÍTULO VII

Perspectivas

Durante el proceso de embriogénesis somática se ha reportado que se encuentran involucrados varios componentes de rutas de transducción de señales. Con este trabajo se aporta nueva información acerca de la presencia de fosfoinosítido cinasas, componentes de rutas de transducción de señales que no se habían estudiado con anterioridad durante este proceso, pero que ya habían sido relacionadas con procesos fisiológicos como la regulación de la transcripción, respuesta a condiciones de estrés y regulación del crecimiento y desarrollo celular.

Los resultados obtenidos sugieren que la regulación de la actividad de la PI4K podría ser importante durante la inducción y el desarrollo de los embriones somáticos en *Coffea arabica* L., por lo que esta información podría ser la base para futuras investigaciones cuyas perspectivas son:

El callo embriogénico (CE) es una fuente de material para la purificación de la PI3K, la PI4K y la PIP5K debido a que las actividades encontradas fueron altas y además se puede disponer de una gran cantidad de material biológico. El contar con las proteínas puras nos permitiría caracterizarlas bioquímicamente y secuenciarlas para que, posteriormente, se obtengan anticuerpos específicos para utilizarlos en estudios bioquímicos más finos y, por otra parte, se puedan diseñar oligonucleótidos degenerados que se utilizarían para intentar clonar los genes que codifican para dichas proteínas. La información generada nos permitiría comparar a estas enzimas con las reportadas para otras especies y podría dar pistas para dirigir la experimentación que permita elucidar sus posibles funciones durante la embriogénesis somática y, paralelamente, se podrían extender los estudios a la embriogénesis cigótica, en café, o en otros modelos convenientes.

La secuenciación y clonación de los genes, ayudaría también a realizar estudios de expresión para determinar los factores que regulan los niveles de estas proteínas en

los diferentes tejidos y etapas del desarrollo. De igual manera, estos genes podrían ser utilizados para realizar estudios de expresión transitoria y quizá generar organismos transgénicos, lo que permitiría explorar su participación en la regulación de la inducción y desarrollo de la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L.