

Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas

Efecto del aluminio sobre la regulación del ciclo celular en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

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

Juan Gualberto Colli Mull

Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

Mérida, Yucatán, México

2003



Fosforado en Ciencias y Biotecnología de
Plantas

Efecto del aluminio sobre la regulación del ciclo
celular en suspensiones celulares de Coffea
arabica L.

Se requiere para obtener el grado de Maestro en Ciencias
Presenta

Juan Guadalupe Coll Mull

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Mérida, Yucatán, México

2003



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 a quien agradezco la amistad, el apoyo y la confianza que me brindó durante la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (33646-N) y una beca de Maestría (165120) para Juan Gualberto Colli Mull

AGRADECIMIENTOS

Especialmente,

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su apoyo incondicional, por su amistad, por la manera de encaminarme hacia el camino de la ciencia y la investigación y por haber confiado en mi.

A los Doctores S. M. Teresa Hernández Sotomayor, José Juan Zúñiga Aguilar, Enrique Castaño de la Serna, Víctor Manuel Suárez Solís y Rafael Rojas Herrera por sus valiosas sugerencias y la revisión crítica con la que enriquecieron este escrito.

Al Dr. Carlos Oropeza Salin y al Dr. Luis Sáenz Carbonel por la sonda y los oligos proporcionados para cdc2a.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por los anticuerpos proporcionados para PCNA y las sugerencias técnicas en cuanto a síntesis de ADN.

A la Q. I. Ángela Ku González por promocionarme el material biológico durante la realización de este trabajo.

A mi familia; por todo su apoyo incondicional y por estar siempre conmigo en todo momento y por tenerme la suficiente paciencia en mis momentos difíciles, los amo.

A Manuel, Ileana, Ligia, Ángela y Anne por ser buenos amigos y compañeros y por tenderme la mano siempre que lo necesite.

Al grupo de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por todas las facilidades prestadas durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de clase y de laboratorio, Anne, Manue, Erika, Roberto, Fredy, Clelia, Analy, Diana, Nina, Rosy, Elda y Armando por los momentos compartidos.

A todos mis profesores por hacerme ver el lado bueno y malo de la Investigación, pero sobre todo por estar siempre dispuestos a enseñar.

Y a todos los que de alguna forma u otra ayudaron o estuvieron presentes durante la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

- ADN.**- Ácido Desoxirribonucleico
- Al.**- Aluminio
- ATP.**- Adenosin trifosfato
- CAKs.**- Cinasas que activan a cinasas dependientes de ciclina
- CDKs.**- Cinasas dependientes de ciclina
- CKIs.**- Inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina
- CKS.**- subunidad de la cinasa dependiente de ciclina
- CTD.**- Dominio carboxilo terminal
- Cyc B.**- Ciclina B
- Cyc 3.**- Ciclina 3
- Cyc A.**- Ciclina A
- Cyc D.**- Ciclina D
- E2F.**- Familia de factores de transcripción E2F
- kDa.**- Kilodaltones
- MAPK.**- Proteína cinasa activada por mitógenos
- ORC1.**- Origen de la replicación
- PCNA.**- Antígeno nuclear de proliferación celular
- PLC.**- Fosfolipasa C
- Pol δ .**- ADN polimerasa delta
- pRB.**- Proteína del retinoblastoma
- RBRs.**- Proteínas similares a la proteína del retinoblastoma
- RF-C.**- Factor de replicación C
- TCA.**- Ácido tricloracético.
- Thr-14.**- Treonina 14
- Tyr-15.**- Tirosina 15

CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	xi
CAPÍTULO 1	
Antecedentes	1
Aluminio	1
Síntomas de la toxicidad por aluminio	2
exudación de ácidos orgánicos	2
Toxicidad a nivel celular	3
Inhibición de la división celular	4
El ciclo celular	5
Regulación del ciclo celular	7
Cinasas dependientes de ciclinas	7
Ciclinas	9
Fosforilación de CDKs	12
Interacción con otras proteínas	12
Proteína retinoblastoma	13
Factores de transcripción	14
El antígeno nuclear de proliferación celular	15
El café como modelo de estudio	17
Hipótesis	19
Objetivos	20
Bibliografía	21

CAPÍTULO 2

Efecto del aluminio sobre la síntesis de ADN en un cultivo de células en suspensión de <i>Coffea arabica</i> L.	33
Introducción	33
Materiales y métodos	35
Resultados	37
Discusión	41
Bibliografía	44

CAPÍTULO 3

Detección, clonación y efecto del aluminio sobre la actividad de cinasa de la proteína cdc2a en cultivos celulares de <i>Coffea arabica</i> L.	46
Introducción	46
Materiales y métodos	48
Resultados	50
Discusión	63
Bibliografía	66

CAPÍTULO 4

Inmunodetección de la proteína antígeno nuclear de proliferación celular y efecto del aluminio sobre la cantidad de proteína presente en células en suspensión de <i>Coffea arabica</i> L.	68
Introducción	68
Materiales y métodos	68
Resultados	70
Discusión	74
Bibliografía	76

CAPÍTULO 5

Discusión general

78

Bibliografía

81

CAPÍTULO 6

Perspectivas

83

RESUMEN

El aluminio (Al) es el metal más abundante en la corteza terrestre, ya que representa alrededor del 7 % de todos los elementos. La disponibilidad del Al^{3+} para poder ser absorbido por las raíces de las plantas depende de la acidez del suelo porque esta determina la disponibilidad del Al, a medida que el pH del suelo se torna más ácido, mayor es su disponibilidad. El principal síntoma de la toxicidad por el Al^{3+} es la inhibición del crecimiento de las raíces, por lo que se podría inferir que el aluminio está afectando algunos procesos involucrados en la división celular.

En el presente trabajo se determinó el efecto del aluminio sobre algunos componentes involucrados en la regulación del ciclo celular en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. El aluminio inhibió hasta un 50% la síntesis de ADN durante los días 6 y 7 del ciclo de cultivo cuando las células fueron tratadas con 100 μM de AlCl_3 durante 24 horas. También se pudo inmunodetectar a una proteína tipo antígeno nuclear de proliferación celular en los extractos proteicos totales y se observó que el tratamiento con AlCl_3 por 24 horas no indujo cambios en la cantidad de proteína.

También, se detectó actividad de cinasa de la proteína cdc2a, empleando a la proteína p13 acoplada a sefarosa para precipitar a cdc2a y utilizando a la histona H1 como sustrato. Los parámetros evaluados para determinar las condiciones óptimas del ensayo de cinasa fueron: cantidad de proteína en los extractos totales, concentración de la histona H1 y el tiempo de incubación de la reacción del ensayo de cinasa; los parámetros seleccionados para monitorear la actividad de cdc2a fueron 100 μg de proteína total, 50 μg de la histona H1 y 15 minutos de la reacción de cinasa.

En cuanto al efecto provocado por el AlCl_3 sobre la actividad de cinasa de la proteína cdc2a, se observó una inhibición de la actividad cuando las células fueron tratadas con 100 μM de AlCl_3 y este efecto observado fue dependiente del tiempo de tratamiento.

Por último, logramos la amplificación y la clonación de un ADN complementario correspondiente a un fragmento de alrededor de 600 pares de bases que pertenece a

una parte de la región amino terminal de la proteína cdc2a en donde se encuentra el motivo PSTAIRE, característico de estas proteínas cinasas.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que el AI tiene un efecto sobre algunos de los principales componentes de la división celular como es el caso de la síntesis del ADN y sobre la principal proteína reguladora del ciclo celular, la cinasa cdc2a.

ABSTRACT

Aluminum (Al) is the most abundant metal in the earth crust, comprising approximately 7 %. Ability of Al to be absorbed by plants depends on the acidity of the soil, as pH of the soil becomes more acid, it becomes more available. The principal symptom of Al-toxicity is the inhibition of root growth, because of this, it has been suggested that aluminum is affecting some processes involved in cell division.

In the present work we determined the effect of aluminum on some components involved in the cell cycle regulation in *Coffea arabica* L cellular suspensions. There was a strong inhibition of DNA synthetic activity on 6 and 7 days of culture, the level of inhibition being proportional to the time of treatment with AlCl_3 . At 24 h, there was more than 50% inhibition in the incorporation of [^3H]-thymidine into DNA when cells were treated with 0.1 mM Al. We immunodetected a PCNA-like protein in coffee cell suspensions, and showed that Al produced no changes in the concentration or amount of this protein.

We detected cdc2a kinase activity in the protein extracts from cells of the 7-day of culture using histone H1 as substrate. The detection of the kinase activity was performed by affinity precipitation of cdc2a with the protein p13 conjugated to agarose. The activity evaluated parameters were amount of the protein in the extracts, concentration of the histone H1, and the time of incubation of the kinase assay. Parameters selected of the kinase assay to determine the effect of aluminum were 100 μg of the protein extracts, 50 μg of the histone H1 substrate and 15 minutes of incubation of the kinase assay. We found a reduction of cdc2a kinase activity in cells treated with 100 μM AlCl_3 when compared to control.

Finally, we report the isolation of an homologous cdc2a cDNA fragment of 600 bp from *C. arabica*. This fragment has the PSTAIRE motif characteristic of CDK-A type proteins.

INTRODUCCIÓN

El aluminio (Al) es uno de los minerales más abundantes en la corteza terrestre. Se encuentra comúnmente formando complejos con el oxígeno y los silicatos en los suelos alcalinos y poco ácidos. Sin embargo, cuando el pH del suelo es menor que 4.5, el Al^{3+} se solubiliza pasando a su forma fitotóxica, la cual puede ser absorbida por las raíces de las plantas (Kochian, 1995). Entre los principales síntomas de la toxicidad por el Al^{3+} se encuentran la inhibición en el crecimiento de las raíces, la toma de agua y de algunos nutrientes (Delhaize y Ryan, 1995). Dos décadas atrás los estudios de la toxicidad por Al^{3+} se enfocaron a la búsqueda y la obtención de plantas resistentes a este elemento. Sin embargo, en la actualidad los estudios realizados sobre la toxicidad del Al^{3+} se han encaminado a conocer y a entender los mecanismos por los cuales las células vegetales son capaces de tolerar a este elemento. Entre los estudios más importantes se encuentran los relacionados con los procesos de transducción de señales, con los procesos de crecimiento, división celular y con los posibles mecanismos de resistencia de las plantas al Al^{3+} , como es la exudación de ácidos orgánicos (Delhaize *et al.*, 1993).

Con respecto a los estudios de la toxicidad del Al^{3+} sobre la elongación y la división celular, Horts y Klotz (1990) atribuyeron que la inhibición del crecimiento de la raíz se debía a la inhibición de la elongación más que a la inhibición de la división celular. Sin embargo, hasta el momento no hay un mecanismo detallado para saber si el Al^{3+} interfiere con procesos relacionados con la división o la elongación celular.

El crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos dependen del crecimiento y la multiplicación de sus células, así como de la percepción de señales extracelulares e intracelulares. Esta multiplicación sucede en el ciclo celular, el cual es un conjunto ordenado de eventos que culmina con la división en dos células hijas idénticas. El ciclo celular es el proceso completo de la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis. En eucariontes, el ciclo celular está definido por 4 fases, los eventos de la replicación del ADN (fase S) y la mitosis (fase M) las cuales son separadas por las fases G_1 y G_2 (Nurse y Susan, 1991).

La disposición de una célula individual para entrar al ciclo celular, mantenerse en forma proliferativa, quiescente, expandirse, diferenciarse o morir depende entre otras

cosas de la fidelidad de la replicación del ADN y de la percepción de varias señales. Estas señales pueden incluir hormonas, nutrientes, luz, temperatura, y de los programas intrínsecos de la célula (Griffith y Boniotti, 2002).

En la actualidad ya se han identificado, clonado, secuenciado y caracterizado algunos de los componentes claves que participan en la regulación del ciclo celular en plantas. Entre los mejor caracterizados podemos mencionar a las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), a las ciclinas propiamente dichas, a la proteína retinoblastoma, a factores de transcripción e inhibidores de CDKs, por mencionar solamente algunos.

En el presente estudio se presentan los resultados del efecto de la toxicidad del Al^{3+} sobre algunos de los componentes involucrados en la regulación del ciclo celular, usando como modelo suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

CAPÍTULO 1

Antecedentes

ALUMINIO

El Al es el metal más abundante en la corteza terrestre, representando alrededor del 7% en masa. A pH neutros o poco ácidos, el Al existe en forma de óxidos o de aluminosilicatos los cuales son insolubles en el suelo. Sin embargo, cuando el pH del suelo se torna ácido, el Al se solubiliza en su forma fitotóxica. Las formas químicas del Al soluble pueden ser clasificadas en diferentes grupos: en forma mononuclear o libre (Al^{3+}) y polinuclear (Al) el cual se encuentra formando complejos de bajo peso molecular (Kochian, 1995). Cuando el pH del suelo se incrementa, el $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ cambia a las formas $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. A pH neutros, el Al^{3+} se encuentra en forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (gibbsite) la cual es insoluble y en forma de aniones de aluminato $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ los cuales se encuentran en mayor proporción en los suelos alcalinos (Matsumoto, 2000).

Debido a que el Al^{3+} interactúa con un gran número de compuestos extra e intracelulares, se han descrito diferentes mecanismos mediante los cuales el Al^{3+} genera efectos tóxicos en las plantas. Estos mecanismos incluyen la interacción del Al^{3+} con la pared celular, con los procesos de transporte a través de las membranas y con los constituyentes del simplasto. Por otra parte, se han descrito una gran cantidad de síntomas provocados por la toxicidad del Al^{3+} en las plantas. Estos desórdenes están generalmente divididos en dos categorías: (1) respuestas a largo plazo, las que requieren al menos horas para desarrollarse, las cuales están relacionadas con la inhibición del crecimiento de la raíz, y (2) respuestas a corto plazo, que son observadas a los pocos minutos o aún a los pocos segundos después de la exposición con Al^{3+} (Taylor, 1988).

Síntomas de la toxicidad por aluminio

El síntoma más representativo de la toxicidad por Al^{3+} es la inhibición de la elongación de la raíz (Delhaize y Ryan, 1995). En genotipos de maíz sensibles al Al^{3+} la inhibición

de la elongación de la raíz ocurre a los 30 minutos de exposición a concentraciones micromolares de Al^{3+} (Llugany *et al.*, 1995). De igual forma se ha visto que el Al^{3+} no solo inhibe la elongación de la raíz, sino también la curvatura de los ápices radiculares y el transporte de las auxinas (Hasentein y Evans, 1988).

El Al^{3+} , en general, provoca en las plantas síntomas similares a los producidos por la deficiencia de fósforo (hojas pequeñas de color verde oscuro, maduración tardía, amarillamiento y muerte de los ápices de las hojas); también provoca síntomas similares a los producidos por la deficiencia o reducción del transporte de calcio (enrollamiento de las hojas jóvenes y colapso de los meristemos). También las raíces de las plantas que son afectadas por Al^{3+} son pequeñas y quebradizas, los ápices de estas raíces y de las raíces laterales se vuelven delgadas y se tornan de color café. Como consecuencia, las raíces se tornan ineficientes en la toma de nutrientes y agua (Thawornwong y Van Diest, 1974).

Entre los estudios que se han realizado sobre toxicidad por Al^{3+} se encuentran los relacionados con procesos de crecimiento y división celular (Minocha *et al.*, 1992), los mecanismos de transducción de señales que involucran a la enzima fosfolipasa C (PLC) (Piña-Chablé y Hernández Sotomayor, 2001; Martínez-Estévez *et al.*, 2003), la cinética de la toma de algunos nutrimentos, como la inhibición de la toma de calcio por las células vegetales (Huang *et al.*, 1992a) y los posibles mecanismos de resistencia de las plantas al Al^{3+} , como es el caso de la exudación de ácidos orgánicos (Delhaize *et al.*, 1993, De la Fuente *et al.*, 1997).

Otros de los estudios que han sido realizados para analizar la toxicidad del Al^{3+} son los involucrados en el recambio de los fosfoinosítidos (Jones y Kochian, 1995) y la fosforilación de proteínas (Martínez-Estévez *et al.*, 2002), cuyos resultados sugieren que el Al^{3+} podría estar afectando a los mecanismos de transducción de señales en las células vegetales.

Exudación de ácidos orgánicos

Existe una gran cantidad de reportes, respecto al proceso por el que las células de las raíces son capaces de exudar ácidos orgánicos como un mecanismo de tolerancia a

la presencia de Al^{3+} ; estos ácidos orgánicos que son exudados son capaces de quelar al Al^{3+} y de esta forma no se encuentra disponible para ser absorbido por las raíces de las plantas. Se ha reportado que la adición de Al^{3+} a una solución nutritiva, estimula la exudación de ácido málico y ácido succínico, por las raíces de las plantas tolerantes de trigo, de 5 a 10 veces más que las plantas sensibles (Delhaize *et al.*, 1993). La interacción con otros iones que coexisten con el Al reduce su toxicidad provocando un cambio de la carga eléctrica en la superficie de la raíz afectando la accesibilidad del Al^{3+} al interior de las células (Bennet y Breen, 1991).

En otros estudios se observó también que la exposición al Al^{3+} estimula la exudación de citrato en el meristemo de las raíces de plantas de maíz tolerantes a este metal (Pellet *et al.*, 1995). Zheng *et al.*, (1998a), reportaron que el Al^{3+} en concentraciones de 150 μM induce la excreción de ácido oxálico en *Fagopyrum esculentum*. La excreción de ácido oxálico también fue estimulada cuando estas plantas tolerantes fueron tratadas con Al^{3+} y esta tolerancia estuvo dada por la formación de un complejo Al-oxalato, el cual resultó no ser tóxico para la planta (Zheng *et al.*, 1998b).

Por último, la acumulación de Al^{3+} en las raíces de las mutantes de *Arabidopsis* (*alr*) es menor que en los genotipos silvestres debido a que la quelación del Al^{3+} con los ácidos orgánicos (citrato, malato y piruvato) evita la entrada del Al^{3+} y por lo tanto no se acumula en las raíces (Larsen *et al.*, 1998).

Toxicidad a nivel celular

Para poder entender las bases del mecanismo de la toxicidad del Al^{3+} en las raíces, se requiere tener la información acerca del daño que puede ocasionar a nivel de la membrana plasmática, en el citosol y en el núcleo. El Al^{3+} puede unirse a los componentes de la pared celular y formar un complejo estable; por lo que se esperaría que el Al^{3+} atravesara la membrana plasmática a través de un transportador y que su difusión hacia el citosol fuera mínima. Por lo que generalmente la mayor cantidad de Al^{3+} en la raíz es extracelular y reside en la pared o en el mucilago alrededor del ápice de la raíz (Clarkson, 1965).

El hecho de que el Al^{3+} a pesar de su aparente lenta absorción inhiba el crecimiento de las raíces y altere ciertos procesos fisiológicos (ej. el flujo de Ca^{2+}) en cuestión de minutos (Huang *et al.*, 1992a), ha llevado a postular que el sitio de la toxicidad del Al^{3+} son los transportadores de iones o los diferentes eventos de transducción de señales que inician en la membrana plasmática (Huang *et al.*, 1992b; Rengel, 1992).

Inhibición de la división celular

En estudios respecto a la toxicidad del Al^{3+} en la división y la elongación celular, Horts y Klotz (1990) atribuyeron que la inhibición de la elongación de la raíz causada por el Al^{3+} era resultado de la inhibición en la elongación celular más que de la división celular (Sivaguru y Horts, 1998). Sin embargo, esto no ha sido demostrado aún a causa de que no se han desarrollado técnicas para detectar bajo estas condiciones la inhibición de la división celular.

Desde hace mucho tiempo se determinó que el Al^{3+} se acumulaba en los núcleos de las células de las raíces de guisante tratadas con Al (Naora *et al.*, 1961). Una posible razón por la que él Al^{3+} se acumula en los núcleos, es por la atracción con las cargas negativas de los grupos fosfatos en el ADN. Clarkson (1965) reportó que la inhibición de la división celular podría ser la manera de la toxicidad del Al^{3+} ya que existe una correlación entre la inhibición del crecimiento de la raíz y la disminución del índice mitótico. Uno de los trabajos pioneros en aspectos bioquímicos sobre la asociación del Al^{3+} con el ADN sugirió que la inhibición de la división celular es el punto clave de la toxicidad por el Al^{3+} (Matsumoto *et al.*, 1977).

En núcleos aislados de células de raíces de guisante tratadas con 1mM de AlCl_3 a pH 5.5 por una hora, se encontró que el 73% del total del AlCl_3 que había sido incorporado al núcleo se encontraba en la fracción de la cromatina (Matsumoto *et al.*, 1977) y de este, el 93% se recuperó en el ADN. Esta preferencia del Al^{3+} para unirse al ADN comparado con las proteínas ha sido demostrada *in vitro* lo cual se debe probablemente a la presencia de los grupos fosfatos en el ADN (Matsumoto, 2000).

En cultivos celulares de *Catharanthus roseus*, la incorporación de [^3H] timidina en el ADN fue inhibida después de exponer a las células con el Al por 16 horas (Minocha *et*

al., 1992). Por el contrario, en raíces de cebada la síntesis de ADN continuó después de los tratamientos con el Al; sin embargo, el ADN sintetizado tenía una composición de bases inusual y era metabólicamente lábil (Sampson *et al.*, 1965). Naido *et al.*, (1978) encontraron que el Al³⁺ se localizaba en los núcleos de las raíces y sugirieron que el Al³⁺ reduce o inhibe la división celular al interferir con la replicación del ADN.

Sin embargo, hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual la toxicidad por el Al³⁺ inhibe la división celular.

EI CICLO CELULAR

El crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos dependen del crecimiento y la multiplicación de sus células. En los organismos unicelulares la división celular implica una verdadera reproducción, ya que por este proceso se producen dos células hijas. Los organismos multicelulares, sin embargo, derivan de una sola célula, el cigoto; la repetida división de esta célula y sus descendientes determina el desarrollo y crecimiento del individuo.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con la división de una célula madre en dos células hijas idénticas; la división celular es uno de las más conspicuas características de la vida y los mecanismos generales de su control son comunes en eucariontes y procariontes (Amon, 1998).

En eucariontes, el ciclo celular está definido por 4 fases; G₁, S, G₂ y M (figura 1.1). La fase G₁ se caracteriza por la expresión de genes y la síntesis de proteínas y es el principal punto de regulación por estímulos extracelulares (como mitógenos). Durante esta fase se habilita a la célula para producir todas las proteínas necesarias para la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN). Durante la fase G₁ se encuentra una etapa temprana en la que se revisa el estado metabólico de la célula antes de avanzar hasta una etapa tardía; ambas etapas están separadas por un punto de restricción (R), el cual marca el límite después del cual la célula está comprometida a completar íntegramente el ciclo celular.

Durante la fase S la célula replica su ADN, una vez completada la fase S, la siguiente fase (G_2) constituye también una fase de revisión donde se localizan controles moleculares que aseguran que las dos nuevas cadenas de ADN se encuentren intactas antes de entrar a la fase de división cromosómica o fase M.

Durante la fase M se lleva a cabo la citocinesis, fenómeno por medio del cual se obtienen dos células hijas idénticas. Una vez completado el ciclo, la célula puede comenzar el ciclo nuevamente entrando a la fase G_1 , o puede permanecer en un estado quiescente en la fase G_0 (Griffith y Boniotti, 2002).

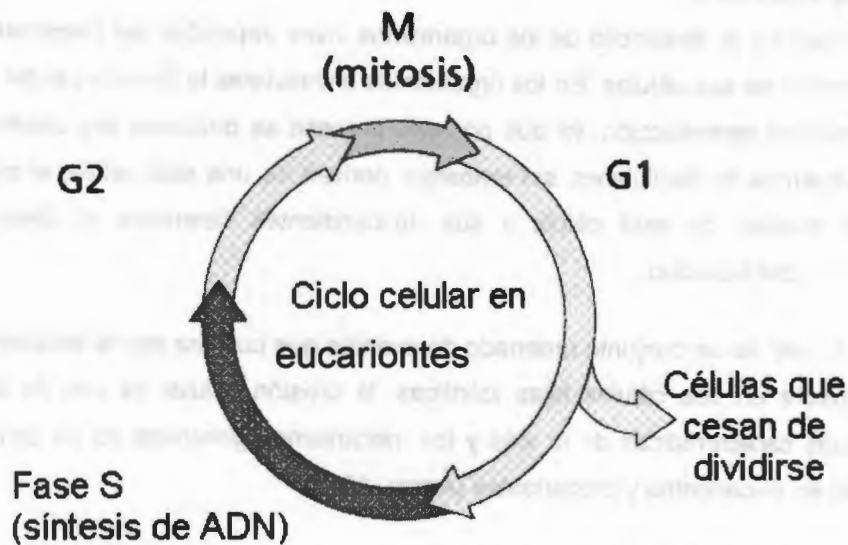


Figura 1.1 Representación esquemática de las diferentes fases del ciclo celular en eucariontes en donde se observan los principales puntos de revisión G_1/S y G_2/M . (www.whfreeman.com.)

Regulación del ciclo celular

Cinasas dependientes de ciclinas

La progresión del ciclo celular es controlada en parte por la acción ordenada de cinasas dependientes de ciclinas o CDKs (por sus siglas en inglés). Las CDKs son una familia de proteínas cinasas de serina/treonina que tienen una función clave en la regulación del ciclo celular (Donan y Fober, 1997). Las CDKs pueden separarse en dos grupos principales de acuerdo a un dominio conservado de unión a ciclinas, como se observa en el cuadro 1.1 (Minorov *et al.*, 1999). Estudios realizados en *Arabidopsis*, tabaco y alfalfa han demostrado que existen al menos cinco clases diferentes de CDKs que pueden ser distinguidas con base en sus secuencias (Segers *et al.*, 1998). Las CDKs mejor caracterizadas son las del tipo A, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas en animales, levaduras y plantas. Por otra parte, se ha encontrado un grupo único de CDKs en plantas que posee un motivo PPTALRE, conocidas como CDKs del tipo B (cuadro 1.1).

Cuadro 1.1 Clasificación de las CDKs en plantas (Minorov *et al.*, 1999)

CLASE	MOTIVO DE UNIÓN A CICLINAS	FASE ASOCIADA	MIEMBROS	HOMÓLOGOS EN MAMÍFEROS
Tipo A	PSTAIR	S, G ₂ y M	CDC2aAt CDC2aMs CDC2bMs CDC2aZm	CDK1, cdk2
Tipo B	PPTALRE PPTTLRE	M	CDC2bAt CDC2fMs	Desconocido
CDKs NO clasificadas	NFTALRE	?	R2	CDK7 (CAK)
	PITAIR SPTAIR	?	CDC2cMs CDC2eMs	CDK8? CHED Cinasa?

En levaduras, animales y plantas la actividad de las CDKs está regulada a diferentes niveles los cuales incluyen expresión génica, localización subcelular y diferentes modificaciones postraduccionales como la unión a una subunidad regulatoria (ciclina), la unión de subunidades inhibitorias, la fosforilación (figura 1.2) y la proteólisis (Morgan, 1995). Experimentos de inmunolocalización, y más recientemente el uso de técnicas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) a la CDK-A (CDKA-GFP) han revelado información de su localización intracelular durante el ciclo celular (Weingartner *et al.*, 2001). Durante la interfase, CDKA-GFP se detecta en los núcleos y en el citoplasma; durante la fase G₂ tardía, CDKA-GFP se encuentra asociada a la porción cortical de la banda de la profase y durante los estados de la telofase se localiza asociada a la cromatina, lo que sugiere que la CDK-A participa en la dinámica de los microtubulos y en el avance de la mitosis (Steinborn *et al.*, 2002).

La actividad de las CDKs en plantas ha sido detectada utilizando como sustrato a la Histona H1 (Jacobs, 1995; Sánchez *et al.*, 2002). En particular, la actividad de cinasa sobre la Histona H1 se ha asociado con CDKs del tipo A en células en suspensión de alfalfa parcialmente sincronizadas (Magyar *et al.*, 1997), de *Arabidopsis* y de tabaco (Menges y Murray 2002; Sorell *et al.*, 2001) Estos estudios mostraron una alta actividad de cinasa en las fases S, G₂ y M, con una disminución en G₁. Por el contrario, la actividad de las CDKs tipo B está asociada con la fase M. La expresión de las CDKs y de las ciclinas han sido estudiadas preferentemente por la acumulación de sus transcritos (Minorov *et al.*, 1999).

1995	1995	1995	1995	1995
1995	1995	1995	1995	1995
1995	1995	1995	1995	1995

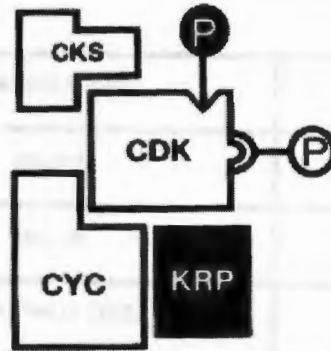


Figura 1.2 Representación esquemática de los niveles de regulación posttraduccional de las CDKs. La actividad de las CDKs puede ser regulada a través de su fosforilación por CAKs y por su unión a una ciclina (CYC). Por otra parte su actividad puede ser inhibida por su fosforilación por otras cinasas o por la unión de proteínas inhibitorias (KRP). Otra subunidad de las CDKs (CKS) pueden interaccionar en el reconocimiento del sustrato (Dewitte y Murray 2002).

Ciclinas

Las ciclinas son proteínas de alrededor de 45 kDa y deben su nombre a que su permanencia en el ciclo celular es cíclica. Las ciclinas forman complejos con las CDKs, regulan su actividad y localización subcelular. Las ciclinas que se han reportado en plantas se han agrupado en 4 clases, A, B, D y H (cuadro 1.2). Se ha demostrado que las ciclinas tipo D controlan el reinicio del ciclo celular; como ejemplo pueden citarse dos ciclinas tipo D1 en *Arabidopsis* que son inducidas por sacarosa, mientras que la *CycD3* se induce específicamente por citocininas (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). También, otros datos demuestran que los transcritos de dos ciclinas tipo D (*CycD2:1*, *CycD2:2*) se acumulan durante la mitosis en cultivos sincronizados de células en suspensión de tabaco (BY-2) (Sorell *et al.*, 1999).

Cuadro 1. 2 Clasificación de las ciclinas en plantas (Minorov *et al.*, 1999)

CLASE	FASE ASOCIADA
A1	S/G2/M
A2	S/G2/M
A3	S/G2 TEMPRANA
B1	G2/M
B2	G2/M
D1	NO CONOCIDO
D2	NO ESPECÍFICO
D3	NO ESPECÍFICO
D4	NO CONOCIDO

Las ciclinas de igual manera, son reguladas por los niveles de expresión de sus genes y por el recambio de proteínas. La destrucción de las CycA y CycB es clave durante la fase M, lo cual se lleva a cabo por medio de proteólisis dependiente de ubiquitina (Renaudin *et al.*, 1997). Además, una gran cantidad de ciclinas contienen secuencias PEST, las cuales son regiones ricas en aminoácidos como prolina, glutamato, serina y treonina, y son los sitios de reconocimiento para su proteólisis.

En años recientes se ha demostrado que las ciclinas tienen una función importante en el reconocimiento del sustrato, como se ha visto la preferencia por diferentes sustratos cuando la cdk2 se encuentra unida a la ciclina E, A o B (Pan *et al.*, 1993). Además, se ha demostrado que un gran número de proteínas pueden formar complejos con la

ciclina-CDK, sugiriendo que las interacciones proteína-proteína tienen una función en el reconocimiento del sustrato (Vlach *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2000).

De igual forma, se ha visto que la ciclina A se asocia con una cdk2 durante la fase S y con una cdc2 durante la fase G₂ (Pagano *et al.*, 1992). Existen numerosas observaciones que sugieren que el complejo ciclina-cdk2 está involucrado en la regulación de la replicación del ADN. Primero, la ciclina A se sintetiza al inicio de la fase S y se requiere durante el transcurso de la misma (Pines y Hunter 1990). Segundo, la ciclina A está localizada en los sitios de la replicación del ADN y puede promover la replicación en sistemas libres de células (Cardoso *et al.*, 1993). Tercero, la sobre-expresión de la ciclina A en células acelera la salida de la fase G₁. Finalmente, una mutante de cdk2 catalíticamente inactiva previene la salida de la fase G₁ (Van den Heuvel y Harlow 1993).

Fosforilación de CDKs

Estudios realizados sobre la regulación del ciclo celular han puesto énfasis en las modificaciones postraduccionales que ocurren en los complejos CDK/ciclina en plantas. La subunidad cinasa por ella misma es inactiva y requiere la unión de una ciclina y la fosforilación en un residuo conservado de treonina del asa "T" para ser activa (figura 1.2) (Yamaguchi *et al.*, 1998). La cinasa responsable de esta fosforilación ha sido llamada cinasa que activa CDKs o CAK (por sus siglas en inglés). Zhang *et al.* (1996) presentaron la primera evidencia de que la fosforilación de las CDKs puede actuar como un mecanismo de control del ciclo celular en plantas.

Durante el análisis de una mutante de CAK (Cak1p) en levaduras se observó que esta mutación dio como resultado un 70% de inhibición del ciclo celular en todas las células por la detención en la transición de la fase G₁/S y las células que continuaron con el ciclo celular de igual manera se observó una inhibición en la transición de G₂/M, demostrando claramente que estas CAKs son requeridas para la transición de G₁/S y de G₂/M (Thuret *et al.*, 1996).

En plantas han sido descritas dos CAKs: una en arroz (R2) y otra en *Arabidopsis* (*cat1At*) (Hata, 1991; Umeda *et al.*, 1998). La CAK de arroz fosforila a las CDKs *in vitro*, así como a un dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II (Yamaguchi *et al.*, 1998). La *cat1At* mostró actividad de cinasa (CAK) pero no para CTD *in vitro* (Umeda *et al.*, 1998). Los mecanismos de activación de las CDKs pueden variar entre especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Umeda *et al.*, 1998).

Interacción con otras proteínas

Muchas proteínas que no son ciclinas han sido encontradas formando complejos con las CDKs. En particular, se ha demostrado que una familia conservada de proteínas llamadas CKS (por sus siglas en inglés ciclin-dependent kinase subunit), son requeridas para el avance del ciclo celular en levaduras y vertebrados, aunque el mecanismo por el cual estas proteínas actúan no ha quedado bien establecido. Los resultados de los análisis cristalográficos y bioquímicos sugieren que las CKS actúan como reguladores positivos o negativos de las CDKs (Pines, 1996). CKS1At, un ortólogo de CKS en plantas, ha sido aislado por el sistema de doble híbrido utilizando como anzuelo CDC2aAt (De Veylder *et al.*, 1997). El gen *cks1At* es funcional en levaduras mientras que en *Arabidopsis*, el producto de este gen se asocia con CDKs tipo A y tipo B *in vivo* e *in vitro*. Mediante análisis de hibridación *in situ* se ha demostrado que *cks1At*, junto con *cdc2aAt* y *cdc2bAt* se transcriben en tejidos que se dividen activamente, lo que sugiere que estas proteínas pueden interactuar con los procesos de división celular en plantas (Jacqmard *et al.*, 1999).

Por otra parte, se ha puesto mucha atención en un grupo de proteínas que en animales y levaduras son conocidas como inhibidores de las CDKs (CKIs). Estas proteínas inhiben el avance del ciclo celular al asociarse con los complejos de CDK/ciclina (Nakayama y Nakayama, 1998). El primer aislamiento de un gen de plantas (*ick1*) similar a CKIs de mamíferos se hizo empleando el sistema de doble híbrido utilizando como cebo CDC2aAt (Wang *et al.*, 1997). Cabe mencionar que en plantas las funciones de estas proteínas parecidas a CKIs aún no han sido determinadas.

Los complejos CDK/ciclina pueden ser inhibidos de diferentes modos. La fosforilación en los residuos de treonina (Thr-14) y tirosina (Tyr-15) en la región amino terminal (figura 1.2) interfiere con la unión correcta del ATP y, de esta manera, queda inhibida la actividad de la CDK (Dunphy, 1994). De forma indirecta, la actividad de las CDKs también puede ser inhibida por la degradación de la subunidad reguladora de los complejos; la ciclina (Peters, 1998).

Proteína del retinoblastoma

La proteína del retinoblastoma supresora de tumores (pRb) es un componente importante del ciclo celular, involucrada en los procesos de transcripción (citado por Echevarria-Machado *et al.*, 2002). Hace algunos años fue demostrado que las plantas utilizan proteínas análogas a la proteína del retinoblastoma (RBRs), las cuales controlan la transición hacia la fase S del ciclo celular (Gutiérrez, 1998).

Gruissem (2002), reportó que existe una RBR en *Arabidopsis* y que tanto la sobre-expresión de la proteína como la inhibición por antisentido causan la formación de inflorescencias irregulares y meristemas distorsionados, sugiriendo que las RBRs tienen funciones importantes en el control de la diferenciación y división celular. Por analogía con sistemas animales, se piensa que la actividad de las RBRs es dependiente de su estado de fosforilación y de su asociación específica con otras proteínas. Específicamente, una o más CDKs aún no identificadas pueden fosforilar RBRs en plantas, modificando su afinidad por factores de transcripción y promoviendo la liberación de factores parecidos a E2F (Kosugi y Ohashi, 2002).

La pRb se une e inactiva a algunos factores de transcripción (como E2F), los cuales regulan a un número de genes involucrados en la progresión del ciclo celular (figura 1.3). De manera que la fosforilación de pRb por el complejo CDK/ciclina D libera al factor de transcripción y éste lleva a cabo la activación transcripcional de las ciclinas E y A, las cuales se unen a cdk2. Ambos complejos son requeridos para entrar a la fase S y para la iniciación de la replicación del ADN.

En la actualidad ya se han aislado varios genes de maíz, tabaco, *Chenopodium* y *Arabidopsis* (citado por Echevarría-Machado *et al.*, 2002) que codifican proteínas que,

basado en estudios estructurales y funcionales, se encuentran relacionadas estrechamente con la familia de las pRb de mamíferos.

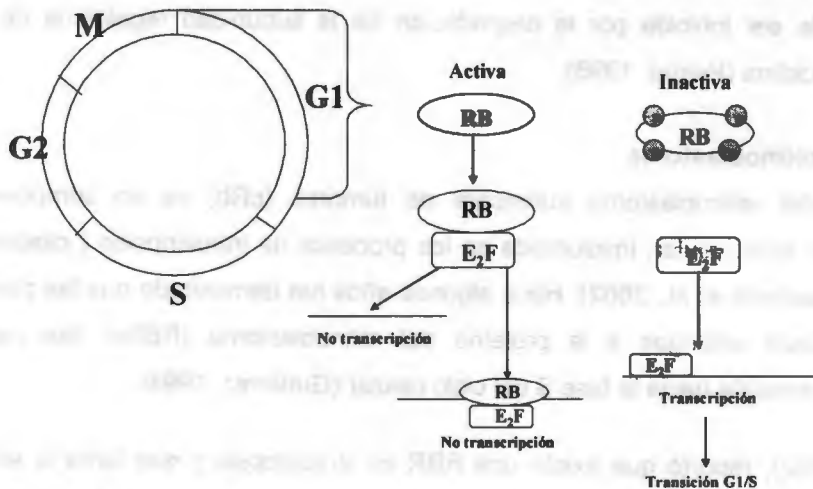


Figura 1. 3 Modelo de la regulación del ciclo celular por pRb. pRb en un estado fosforilado es representada por P, de esta forma se encuentra en un estado inactivo que no permite su unión con E2F, por lo que el mismo puede unirse a los promotores y permitir la transcripción de los genes. La pRb activa (defosforilada) puede unirse a E2F impidiéndole la transcripción de los genes directa o indirectamente (Tomado de Echevarría-Machado *et al.*, 2002).

Factores de transcripción

La función coordinada de los productos génicos involucrados en el ciclo celular es esencial para la división y la diferenciación celular en los organismos eucariontes, incluyendo plantas superiores (den Boer y Murray, 2000). Entre los diferentes productos génicos reguladores del ciclo celular, el factor de transcripción E2F y la proteína retinoblastoma son componentes clave para este proceso y la pérdida de su regulación causa la formación de tumores en células animales (Harbour y Dean, 2000).

Recientemente se ha demostrado que las plantas poseen ortólogos de E2F (Albani *et al.*, 2000; Magyar *et al.*, 2000). En contraste con los eucariontes unicelulares, las

plantas y los animales utilizan la ruta de pRb-E2F para la regulación del ciclo celular (Du *et al.*, 1996).

E2F representa una familia de proteínas relacionadas. En humanos se han identificado 6 miembros (E2F1 a E2F6) y dos distintas proteínas relacionadas con DP (DP1 y DP2) (Trimarchi y Lees, 2002). La familia de los factores de transcripción E2F en animales tiene una función importante en el control de la progresión del ciclo celular regulando la expresión de genes involucrados en la proliferación celular. Entre estos genes se encuentran los responsables para el control del ciclo celular como la ciclina tipo E, *cdc2*, *dcd25A*, Rb y p107, los involucrados en la iniciación de la replicación como ORC1, *cdc6*. La expresión de muchos de estos genes, incluyendo todos los relacionados con la síntesis de ADN se induce en la transición G₁/S (De Veylder *et al.*, 2002; Rossignol *et al.*, 2002).

Ortólogos de E2F y de DP han sido identificados en diferentes especies de plantas incluyendo trigo, tabaco, zanahoria, *Arabidopsis* y arroz (Ramírez y Gutierrez, 2000; Albani *et al.*, 2000; Magyar *et al.*, 2000; Kosugi y Ohashi, 2002).

El antígeno nuclear de proliferación celular

Como se mencionó anteriormente, en la fase G₁ se encuentran dos importantes puntos de control: el paso sobre el punto de restricción R que separa G₁ temprano de G₁ tardío, que compromete a la célula a la división celular, y la transición de G₁ tardía hacia la fase S. La estimulación de la división en células vegetales quiescentes con fitohormonas como auxinas y citocininas, lleva a las células a entrar a la fase G₁ del ciclo celular. Muchos genes que son expresados durante la transición G₁/S han sido aislados y estudiados sus niveles de expresión; entre estos se encuentran las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Jonak *et al.*, 1993), histonas H4 (Lepetit *et al.*, 1992) y H3 (Terada *et al.*, 1993) y diversos promotores (Ito *et al.*, 1994). También se han estudiado proteínas asociadas a la síntesis del ADN como la timidina cinasa, la timidilato sintasa, la ADN polimerasa δ y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA); estas proteínas son expresadas durante la transición de G₁/S, independientemente de la replicación del DNA (Kosugi *et al.*, 1995).

PCNA es una proteína auxiliar de la ADN polimerasa δ (pol δ) estimulando su procesividad durante la replicación (Tsurimoto y Stillman 1990; Lee y Hurwitz, 1990). Además, es un factor esencial para la replicación del ADN durante la síntesis de la cadena complementaria (Tsurimoto y Stillman 1990) y para la escisión de nucleótidos en la reparación del ADN (Shivji *et al.*, 1992). PCNA forma un homotrímero alrededor del ADN; el mecanismo de acción propuesto para PCNA es en forma de "patín deslizante", aumentando la procesividad de la pol δ , a la que se une por medio de un factor C de replicación (RF-C) (Stillman, 1994). Diversos estudios han demostrado que en células de mamíferos PCNA existe en forma de un complejo cuaternario (Xiong *et al.*, 1992; Waga *et al.*, 1994) junto a una ciclina, una CDK y una proteína inhibidora de CDK (p21) (Harper *et al.*, 1993). Recientemente se demostró que en plantas PCNA puede formar complejos con una cycD y una CDK-A (Herrera *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2002) Estas observaciones sugieren que PCNA puede participar en diversos eventos como la coordinación del avance del ciclo celular, la replicación y la reparación del ADN.

Los genes de PCNA están altamente conservados en eucariontes (Almendral *et al.*, 1987; Wasseem *et al.*, 1992). El primer gen aislado de PCNA en plantas fue el de arroz (Suzuka *et al.*, 1989); la secuencia deducida de aminoácidos tiene 62% de identidad con PCNA de rata (Suzuka *et al.*, 1991). Una PCNA recombinante estimula la síntesis de DNA catalizada por la pol δ de células de mamíferos (Matsumoto *et al.*, 1994). También, la PCNA purificada de chícharo es capaz de formar un complejo estable con la p21 de humano (Ball y Lane 1996). Todos estos datos sugieren que la PCNA se conserva estructural y funcionalmente en eucariontes.

La expresión de los genes de PCNA está relacionada con las etapas proliferativas de las células; en células quiescentes de mamíferos la cantidad de PCNA es muy baja pero se incrementa cuando la proliferación celular es estimulada con suero o con factores de crecimiento (Almendral *et al.*, 1987). López-Villaseñor *et al.*, (1995) clonaron un ADN complementario de maíz y recientemente identificaron una segunda clona de ADNc correspondiente a PCNA; los análisis moleculares han demostrado que esta familia de genes en maíz consiste de dos elementos y que ambos genes son

expresados de igual manera en tejidos proliferativos (López-Villaseñor *et al.*, 1997). No obstante, la regulación de la expresión de PCNA puede diferir entre organismos, pudiendo ocurrir a niveles transcricional o post-transcricional (Alder *et al.*, 1992; Matzukota *et al.*, 1994).

EL CAFETO COMO MODELO DE ESTUDIO

El caféto (*Coffea ssp.*) es cultivado en más de 50 países, siendo Brasil el principal productor a nivel mundial. En México es uno de los principales productos que otorgan mayor cantidad de divisas al país. México se encuentra en quinto lugar mundial en la producción de caféto (Consejo Mexicano del Café 2000). México produce caféto de excelente calidad, ya que sus condiciones climáticas y topográficas le permiten cultivar variedades consideradas entre las mejores del mundo.

A pesar de que hay muchas especies de este cultivo, sólo *Coffea arabica* y *Coffea canephora* son las de importancia económica (Marshal, 1975). La propagación de caféto es generalmente a través de las semillas y las plantas se cultivan en un sombreadero por un período de 6 a 24 meses hasta que puedan ser llevadas al campo (Cobley y Steele 1976).

En México, el caféto se produce sobre una superficie de 690 000 Ha, en 12 estados de la República situados en la parte centro-sur del país. Este cultivo genera empleos a más de tres millones de mexicanos involucrados en las actividades de cosecha, beneficiado y comercialización. En México se cultiva principalmente *Coffea arabica* L. que es la de mayor comercialización (Consejo Mexicano del Café, 2000).

El caféto es una planta que por sus requerimientos agronómicos, de manera general, se cultiva en suelos con una gran cantidad de materia orgánica, la cual en su proceso de descomposición hacen que las condiciones del suelo se tomen ácidas. El caféto se desarrolla bien en los suelos ácidos con valores de 4.5 a 5.5, sin embargo, es importante considerar las propiedades físicas del suelo y la disponibilidad de nutrientes bajo estas condiciones, el aluminio se encuentra en la forma química que es más fácilmente asimilable por las plantas (Pavan, 1983), convirtiéndose así en el

factor más importante que limita el crecimiento de las plantas de cafeto en los suelos ácidos (Foy, 1984).

Hasta el momento no se conoce un mecanismo exacto de la toxicidad por Al^{3+} , pero se ha sugerido que podría afectar la división celular. Para conocer más acerca de los procesos por los cuales las células vegetales responden a diversos factores bióticos y abióticos como un mecanismo de respuesta se han realizado una gran cantidad de estudios a nivel celular. Entre los estudios realizados se encuentran las modificaciones covalentes de las proteínas por fosforilación (Martínez-Estévez *et al.*, 2002) lo que indica que las proteínas cinasas podrían ser esenciales para los mecanismos de respuesta a este metal.

En nuestro grupo de trabajo, utilizando como modelos biológicos raíces transformadas de *C. roseus* y células en suspensión de *C. arabica* L., se han realizado estudios con relación al efecto provocado por el Al^{3+} en sistemas de transducción de señales. Piña-Chable y Hernández-Sotomayor (2001) demostraron que el Al^{3+} inhibe la actividad enzimática de la fosfolipasa C (PLC) cuando este es adicionado *in vitro* y que este efecto es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición con el Al^{3+} en las raíces transformadas de *C. roseus*; de igual manera, se determinó que el Al^{3+} provocó una disminución en el crecimiento de las raíces hasta de un 50% cuando eran tratadas al inicio del ciclo de cultivo.

Por otra parte, se demostró que la modificación del medio de cultivo de una línea celular de *Coffea arabica* provocó una mayor toxicidad del Al^{3+} con respecto al medio sin modificaciones y que la dosis letal media en estas condiciones fue 25 μM (Martínez-Estévez *et al.*, 2001). Recientemente Martínez-Estévez *et al.*, (2002) demostraron que el Al^{3+} incrementó la fosforilación de ciertas proteínas de manera dependiente de la concentración del Al^{3+} cuando las células eran tratadas *in vivo*. Estos resultados sugieren que el Al^{3+} podría regular la actividad de algunas proteínas cinasas como un mecanismo de respuesta por la toxicidad a este metal (Martínez-Estévez, 2001).

HIPÓTESIS

Si los efectos tóxicos del aluminio afectan a las células vegetales a nivel de la proliferación celular, entonces la presencia de aluminio en el medio de cultivo afectará a procesos involucrados en la regulación del ciclo celular en un cultivo de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto del aluminio sobre diferentes procesos involucrados en la regulación del ciclo celular durante un ciclo de cultivo en células en suspensión de *C. arabica* L.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el efecto del aluminio sobre la síntesis de ADN durante los diferentes días del ciclo de cultivo de células en suspensión de *Coffea arabica* L.
2. Determinar cómo afecta el aluminio a la cantidad de proteína del antígeno nuclear de proliferación celular, presente en las células en suspensión de *C. arabica* L.
3. Determinar si la actividad de cdc2a se ve afectada cuando las células en suspensión de *C. arabica* L. son tratadas con el aluminio.

BIBLIOGRAFÍA

Albani D., L. Mariconte., S. Ricagno., L. Pitto., C. Moroni., K. Helin and R Cella (2000) DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *J. Biol. Chem.* **275**: 19258-19267.

Alder H., M. Yoshinouchi., M. Prystowsky, P. Appasamy and R. Baserga (1992) A conserved region in intron I negatively regulates the expression of PCNA gene. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 1769-1775.

Almendral J., D. Huebsh, P. Blundell, H Macdonald-Bravo and R. Bravo (1987) Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1575-1579.

Amon A. (1998) Controlling cell cycle and cell fate: common strategies in prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 85-86.

Ball K. L. and D. P. Lane (1996) Human and plant proliferating-cell nuclear antigen have a highly conserved binding site for the p53-inducible gene product p21^{WAF1}. *Eur. J. Biochem.* **237**: 854-861.

Bennet R. J. and C. M. Breen (1991) The recovery of the roots of *Zea mays* L. from various aluminum treatments: Towards elucidating the regulatory processes that underlie root growth control. *Envir. Exp. Bot.* **31**:153-163.

Cardoso M. C., H. Leonhardt and B. Nadai-Ginard (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and cdc2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74**: 979-992.

Clarkson D. T. (1965) The effect of aluminum and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annu. Botany N. S.* **29**: 309-315.

Cobley L. S and V M. Steele (1976) An introduction to the botany of tropical crops. Longman, London, New York. pp. 234-246.

De la Fuente J. M., Ramírez-Rodríguez V., Cabrera-Ponce J. L. and L. Herrera-Estrrella (1997) Expression of a bacterial citrate synthase in the cytoplasm of transgenic plants leads to aluminum tolerance. *Science* **276**: 1566-1568.

De Veylder L., G. Segers, N. Glab, M. Van Montagu and D. Inzé (1997) Identification of proteins interacting with the *Arabidopsis* Cdc2aAt protein. *J. Exp. Bot.* **48**: 2113-2114.

De Veylder L., T. Beeckman, T. S. Gerrit, Beemster, J. de Almeida, E. S. Ormenese, S. Mirande, E. Van Der Schueren, A Jacqmard, G. Engler, and Dirk Inzé (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* **21**: 1360-1368.

Delhaize E. and P. R. Ryan (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107**: 315-321.

Delhaize E., P. R. Ryan and P. J. Randall (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology* **103**: 695-702.

den Boer and Murray J. A. (2000) Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* **10**: 245-250.

Dewitte W. and J. A. H. Murray (2002) The Plant Cell Cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 91-121.

Donan J. and P. Fober (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 824-830.

Du W., M. Vidal, J. E. Xie, and N. Dyson (1996) RFB, a novel Rb-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E. in *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **10**: 1206-1218.

Dunphy W. G. (1994) The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* **4**, 202-207.

Echevarria-Machado I., V. M. Loyola-Vargas y S. M. T. Hernández Sotomayor (2002) La proteína del retinoblastoma en las plantas. *Revista de la Sociedad Química de México.* **46**: 17-22.

Foy C. D. (1984) Physiological effects of hydrogen, aluminum, manganese toxicities in acid soil. In Adams F (ed) *Soil Acidity and Liming.* American Society of Agronomists, Madison, pp 57-97.

Gutierrez C. (1998) The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **1**: 492-497.

Griffith M. and M. Boniotti (2002) "Cross-Talk" between cell division cycle and development in plants. *The Plant Cell* **14**:11-16.

Gruissem W (2002) The cell cycle – now in plants. *Trends in Plants Science.* **7**: 49-55.

Harper J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge (1993) The p21 Cdk-interacting protein CiP1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.

Hasentein K. H. and M. L. Evans (1988) Effect of cations on hormone transport in primary roots of *Zea Mays*. *Plant Physiol.* **86**: 890-894.

Hata S. (1991) cDNA cloning of a novel cdc2+/CDC28-related protein kinase from rice. *FEBS Lett.* **279**: 149-152.

Harbour J. W. and Dean D. C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**: 2393-2409.

Herrera I., M. de la P. Sánchez., J. Molina., J. Plasencia and J. Vázquez-Ramos (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed

development and germinating: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum* **110**: 127-134.

Horts W. J. and F. Klotz (1990) Screening soybean for aluminum tolerance and adaptation to acid soil. Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover, Herrenhäuser. Plant and Soil, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 1-6.

Huang J. D., L. Grunes and L. V. Kochian (1992a) Aluminum effects on kinetics of calcium uptake into cells on the wheat root apex. *Planta* **188**: 414-421.

Huang J. D., J. Shaff, L. Grunes and L. V. Kochian (1992b) Aluminum effects on calcium fluxes at the root apices of aluminum tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* **98**: 230-237.

Ito M., M. C. Criqui, M. Sakabe, S. Hata, H. Kouchi, J. Hashimoto, H. Fukuda, A. Komanine and A. Watanabe (1994) Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant J.* **11**: 983-992.

Jacobs T. W. (1995) Cell cycle control: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 317-339.

Jacqmard A., L. De Veylder, G. Segers, J. Almeida Engler, G. Bernier, M. Van Montagu and D. Inzé (1999) CKS1At expression in *Arabidopsis thaliana* suggested a role for the protein in both mitotic and the endoreduplication cycle. *Planta* **207**: 496-504.

Jonak C., A. Páy, L. Bogre, H. Hirt and E. Heberle-Bors (1993) The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. *Plant J.* **3**: 611-617.

Jones D. L. and L. V. Kochian (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell* **7**: 1913-1922.

Kochian L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **46**: 237-260.

Kosugi S., S. Iwao and A. Yuko (1995) Two of three promoters elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression. *The Plant J.* **7**: 887-886.

Kosugi S. and Y. Ohashi (2002) E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *The Plant J.* **29**: 45-59.

Larsen P B., J. Degenhardt, C. Y. Tai, L. M. Stenzler, S. H. Howell and L. V. Kochian (1998) Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* **117**: 9-18.

Lee S. H. and J. Hurwitz (1990) Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ , proliferating-cell nuclear antigen, and activator I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5672-5676.

Lepetit M., M. Ehling, N. Chaubet and C. Gigot (1992) A plant histone gene promoter can direct both replication-dependent and independent gene expression in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 276-285.

Llugany M., C. Poschenrieder and J. Barcelo (1995) Monitoring of aluminum-induced inhibition of root elongation in four maize cultivar differing in tolerance to aluminum and proton toxicity. *Physiologia Plantarum* **93**: 265-271.

López-Villaseñor, K. Safina, J. Vázquez-Ramos and J. H. Patrick (1997) The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is composed of two members that have similar expression programmer. *Biochem. Biophys. Acta.* **1353**: 1-6.

López-Villaseñor, S. Khan, J. Vázquez-Ramos and P. J. Hussey (1995) molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochem. Biophys. Acta.* **1260**: 119-121.

Magyar Z., A. Atanassova, L. De Veylder, S. Rombauts and D. Inzé (2000) Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **486**: 79-87.

Magyar Z., T. Mészáros, P. Miskolczi, M. Deák, A. Fehér, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, M. Bilgin, L. Bakó, C. Koncz and D. Dudits (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**: 223-235.

Marshal C. (1975) Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. *Clifford M. N., Willson, K. C. (ed). Westport, CONN. AVI.* London Croom Helm. pp 251-283.

Martínez-Estevéz M. (2001) Estudios sobre la toxicidad del aluminio en suspensiones celulares de café. Tesis para obtener el grado de Doctor. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán México.

Martínez-Estevéz M., J. A. Muñoz-Sánchez, V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández-Sotomayor (2001) Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspension of Coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* **20**: 469-474.

Martínez-Estevéz M., V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández-Sotomayor (2002) Aluminum increases phosphorylation of particular proteins in cellular suspension cultures of coffee (*Coffea arabica* L.). *J. Plant Physiol.* **158**: 1375-1379.

Martínez-Estevéz M., G. R. De Di Palma, J. A. Muñoz-Sánchez, L. Brito-Argaez, V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández-Sotomayor (2003)

Aluminium differentially modifies lipids metabolism from the phosphoinositides pathway in *Coffea arabica* cells. J. Plant Physiol. (en prensa)

Matsukota S., Yamaguchi M. and Matsukage (1994) D-type cyclin-binding regions of proliferating-cell nuclear antigen. J. Biol. Chem. **269**: 11030-11036.

Matsumoto H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. International Review of Cytology **200**: 1-46.

Matsumoto H., S. Morimura and E. Takahashi (1977) Binding of aluminum to DNA of DNP in pea root nuclei. Plant Cell Physiol. **18**: 987-993.

Matsumoto T., S. Hata, I. Suzuka and J. Hashimoto (1994) Expression of functional proliferating-cell nuclear antigen from rice (*Oryza sativa*) in *Escherichia coli* in association with human DNA δ . Eur. J. Biochem. **223**: 179-187.

Menges M. and J. A. H. Murray (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell cycle genes activity. Plant J. **30**: 203-212.

Minocha R., S. C. Minocha, S. Long and W. C. Shortle (1992) Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthesis enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant, *Catharanthus roseus*. Physiologia Plantarum **85**: 417-424.

Minorov V., L. De Veylder, M. V. Montagu and D. Inzé (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants-the nexus. The Plant Cell **11**: 509-521.

Morgan D. O. (1995) Principles of CDK regulation. Nature **374**: 131-134.

Naido G., J. McD. Steward and R. J. Lewis (1978) Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. Agron. J. **70**: 489-492.

Nakayama K. I. and K. Nakayama (1998) Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors brakes of the cell cycle engine during development. Bioassays **20**: 1020-1029.

Naora H., H. Naora, A. E. Mirsky and V. G. Allfrey (1961) Magnesium and calcium in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiology.* **44**: 713-741.

Pagano M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge and G. Draetta (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**: 961-971.

Pan Z. Q., A. Amin and J. Hurtwitz (1993) Characterization of the *in vitro* reconstituted cyclin A or B1-dependent cdk2 and cdc2 kinase activities. *J. Biol. Chem* **268**: 20443-20451.

Pavan M. A. (1983) Aluminio em solos ácidos do paraná; relecao entre aluminio náu-trocável e soluble, com o pH. CTC, porcentagem de saturacao de Al e materia organica. *R. Bras. Ci. Solo.* **7**: 39-46.

Pellet D. M., L. Grunes and L. V. Kochian (1995) Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays*). *Planta* **196**: 788-795.

Peters J. M. (1998) SCF and APC: The yin and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 759-768.

Piña-Chable M. L. and S. M. T. Hernández-Sotomayor (2001) Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. *Prostaglandins and Other Lipids Mediators* **65**: 45-56.

Pines J. (1996) Cell cycle: Reaching for a role for the Cks proteins. *Curr. Biol.* **6**: 1399-1402.

Pines J. and T. Hunter (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin 13. *Nature* **346**: 760-763.

Ramirez-Parra E. and C. Gutierrez (2000) Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett.* **486**: 73-78.

Renaudin J. P., A. Savouré, H. Philippe, M. V. Montagu, D. Inze and P. Rouzé (1997) Characterization and classification of plant cyclin sequences related to A and B-type cyclins. Portland Press. London press 67-98.

Rengel Z. (1992) Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol.* **121**: 499-513.

Sampson M., D. Clarkson and D. D. Davies (1965) DNA synthesis in aluminum-treated root of barley. *Science* **148**: 1476-1477.

Riou-Khamlichi C., R. Huntley, A. Jacquard, and J. A. H. Murray (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544.

Riou-Khamlichi C., M. Menges, J. M. Healy and J. A. H. Murray (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell Biol.* **20**: 4513-4521.

Rosignol P. R Stevens, C Perennes, S Jasinski, R Cella, D Tremousaygue and C Bergounioux (2002) AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce *Arabidopsis* leaf cells to re-enter S phase. *Mol. Genet. Genet.* **266**: 995-1003.

Sánchez P., A. Torres., M. B. Bonnioti., C. Gutierrez and J. M. Vázquez-Ramos (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant. Mol. Biol.* **50**: 167-175.

Segers G., P. Rouzé, M. V. Montagu and D. Inzé (1998) Cyclin-dependent kinases in plants. In: *Plant cell proliferation and its regulation in growth and development* J. A., Bryant and D. Chiatente, (ed) John Wiley and Sons Ltd England. pp. 1-19.

Shivji M. K. K., M. K. Kenny and R. D. Wood (1992) Proliferating-cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**: 367-374.

Sivaguru M. V. and W. J. Horst (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* **116**: 155-163.

Sorell D. A., B. Combettes, N. Chaubet-Gigot, C. Gigot and J. A. H. Murray (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant level of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **119**: 343-351.

Sorell D. A., Menges M., Healy J. M., Deveaux Y. and C. Amano (2001) Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **126**: 1214-1223.

Steinborn K., C. Maulbetsch, B. Priester, S. Trautmann and Pacher T. (2002) The *Arabidopsis* PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev.* **16**: 959-971.

Stillman B. (1994) Smart machines at the DNA replication fork. *Cell* **78**: 725-728.

Suzuka I., H. Daidoji, M. Matsuoka, K. Kadokawi, Y. Takasaki, P. Nakane and T. Moriuchi (1989) Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plants genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3189-3193.

Suzuka I., S. Hata, M. Matsuoka, S. Kosugi and J. Hashimoto (1991) Highly conserved structure of proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) gene in plants. *Eur. J. Biochem.* **195**: 571-575.

Taylor G. J. (1988) The physiology of aluminum tolerance in higher plants *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **19**: 1179-1194.

Terada R., T. Nakayama, M. Iwabuchi and K. Shimamoto (1993) A wheat histone H3 promoters confer cell division-dependent and independent expression of the gus gene in transgenic rice plants. *Plant J.* **3**: 241-252.

Thawornwong N. and F. Van Diest (1974) Influences of high acidity and aluminum on the growth of low land rice. *Plant Soil* **41**: 141-159.

Thuret J. Y., J. G. Valay, G. Faye and C. Mann (1996) Civ1 (CAK *in vivo*), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* **86**: 565-576.

Tsurimoto T. and B. Stillman (1990) Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory protein from human cell and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 1023-1027.

Trimarchi J. M. and J. A. Lees (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 11-20.

Umeda M., R. P. Bhalearao, J. Schell, H. Uchimiya and C. Koncz (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 5021-5026.

Van Den Heuvel and E. Harlow (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**: 2050-2054.

Vlach J., S. Hennecke and B. Amati (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{KIP1}. *EMBO J.* **16**: 5334-5344.

Waga S., G. Hannon, D. Beach and B. Stillman (1994) The p²¹ inhibitor of cyclin-dependent kinase controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-578.

Wang H., L. C. Fowke and W. L. Crosby (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor genes. *Nature* **386**: 451-452.

Wassem N. H., K. Labib, P. Nurse and D. P. Lane (1992) Isolation and analysis of the fission yeast gene encoding polymerase δ accessory protein PCNA. *EMBO J.* **11**: 5111-5120.

Weingartner M., Binarova P., Drykova D., Schweighofer A. and J. P. David (2001) Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell* **13**: 1929-1943.

WWW.whfreeman.com

WWW.Consejomexicanodelcafe.com.

Xiong Y., H. Zhang and D. Beach (1992) D type cyclins associated with multiple protein kinase and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**: 505-514.

Yamaguchi M., M. Umeda and H. Uchimiya (1998) A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent kinases and the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *Plant J.* **16**: 613-619.

Zhang K., D. S. Letham and P. C. L. John (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta* **200**: 2-12.

Zheng S. J., J. F. Ma and H. Matsumoto (1998a) High aluminum resistance in buckwheat. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* **117**: 745-751.

Zheng S. J., J. F. Ma and H. Matsumoto (1998b) Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. *Physiologia Plantarum* **103**: 209-214.

CAPÍTULO 2

EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA SÍNTESIS DE ADN EN UN CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN DE *Coffea arabica* L.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 10 años se han venido realizando una gran cantidad de estudios sobre los mecanismos del control del ciclo celular en diferentes tipos de organismos eucariontes como levaduras, mamíferos y en plantas superiores. Hasta el momento, en plantas se han identificado la mayoría de los componentes que participan en la regulación del ciclo celular en animales y en levaduras, tales como proteínas cinasas dependientes de ciclina, ciclinas, la proteína Rb, cinasas que activan cinasas dependientes de ciclina, el antígeno nuclear de proliferación celular, factores de transcripción de la familia E2F e inhibidores de proteínas cinasas dependientes de ciclina.

Entre los estudios realizados sobre la inhibición del ciclo celular se conoce que diferentes tipos de factores como el estrés oxidativo, el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el etileno y el Al^{3+} actúan negativamente sobre la regulación de la división celular (Reichheld *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998; Swiatek *et al.*, 2002; Herbert *et al.*, 2001; Minocha *et al.*, 1992).

Con respecto a los trabajos realizados sobre el efecto provocado por el Al^{3+} sobre la inhibición de la división celular, se ha comprobado que el crecimiento de la raíz y el índice mitótico disminuyen rápidamente con un aumento en la vacuolación en la zona meristemática, en las raíces de *Avena sativa* cuando son tratadas con Al^{3+} (Marienfeld *et al.*, 1995). Del primer trabajo realizado sobre aspectos bioquímicos de la asociación del Al^{3+} con el DNA surgió la idea de que la inhibición de la división celular es el punto principal de la toxicidad por Al^{3+} (Matsumoto *et al.*, 1977).

Para conocer si el ciclo celular se ve afectado por diversos factores tanto bióticos como abióticos, se pueden evaluar los efectos provocados sobre los diversos parámetros involucrados en la regulación entre las diferentes fases del ciclo celular. Como se indicó anteriormente, en la fase S se lleva a cabo la síntesis del ADN y esta fase en particular se ha utilizado para determinar los niveles de crecimiento y proliferación celular, mediante la incorporación de compuestos radiactivos o por determinaciones colorimétricas. De manera particular, la incorporación metabólica de [³H] timidina al ADN se ha utilizado para monitorear los índices de la síntesis de ADN y los niveles de la proliferación celular.

En el presente trabajo, utilizando células en suspensión de *C. arabica*, se caracterizó la síntesis de ADN durante el ciclo de cultivo y se evaluó el efecto del AlCl₃ sobre la síntesis de ADN mediante la incorporación de [³H] timidina en los diferentes días del ciclo de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los cultivos celulares de la línea embriogénica (L2) de *C. arabica* var. Catuai se obtuvieron por disgregación de callos, los cuales fueron obtenidos de explantes de hojas de embriones zigóticos conseguidos a partir de semillas cultivadas *in vitro* en un medio MS modificado. Las suspensiones celulares se mantuvieron en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado por Santana (1993) a pH 5.8 incluyendo mio-inositol 100 mg/L; tiamina 10 mg/L; cisteína 25 mg/L; sacarosa 3%; 2,4-D ácido diclorofenoacético 3 mg/L y 6-bencilaminopurina 1 mg/L. Las suspensiones celulares fueron subcultivadas cada 14 días. Para obtener la toxicidad del Al, las suspensiones celulares se mantuvieron en un medio MS a la mitad de las sales a pH 4.3 (Martínez-Estévez *et al.*, 2001).

Incorporación de [³H] timidina en el ADN

Para la caracterización de la incorporación de [³H] timidina durante el ciclo de cultivo, las células fueron incubadas con 10 μ Ci de [³H] timidina (2.0 Ci/mmol) por 4 horas en cada día del ciclo de cultivo. La extracción de las fracciones solubles se realizó con el siguiente amortiguador; Hepes 50 mM; sacarosa 250 mM; KCl 5mM; EDTA 1mM. Para precipitar los ácidos nucleicos, el sobrenadante obtenido de las células se incubó con ácido tricloroacético (TCA 100%) a una concentración final del 10%. Finalmente el precipitado se filtró al vacío utilizando filtros de fibra de vidrio (GF/A). Para determinar la cantidad de radiactividad incorporada en las muestras, los filtros se colocaron en un vial que contenía 10 ml de líquido de centelleo y leídos durante 1 min en un contador de centelleo (Beckman LS-6500).

Para la determinación del efecto del AlCl₃ sobre la incorporación de [³H] timidina, se realizaron marcajes de 30 min de incubación con 10 μ Ci [³H] timidina (2.0 Ci/mmol), después del tiempo de incubación se agregaron 3 ml de ácido perclórico (PCA) al 4% y se incubaron por 15 min en hielo. Posteriormente al tiempo de incubación las células fueron filtradas al vacío con filtros de fibra de vidrio (GF/A) y lavadas con 3 ml de PCA frío al 4%, 15 ml de etanol frío al 70% y 15 ml de etanol frío al 100%. Para determinar

la cantidad de radiactividad incorporada en las muestras, los filtros se colocaron en un vial que contenía 10 ml de líquido de centelleo y se leyeron durante 1 min en un contador de centelleo (Beckman LS-6500).

RESULTADOS

Estudios realizados en cultivos de células en suspensión de *C. roseus* demostraron que la incorporación de [³H] timidina al ADN se redujo hasta un 50% comparado con el control cuando las células fueron incubadas con 0.5 y 1 mM de AlCl₃ después de 24 horas de tratamiento. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos por 24 h con 0.2 mM de AlCl₃ (Minocha *et al.*, 1992).

Para poder determinar el efecto del Al³⁺ sobre la síntesis de ADN, lo inicial fue caracterizar la capacidad de síntesis de ADN del sistema durante el ciclo de cultivo mediante la incorporación de [³H] timidina al ADN. Como se puede observar en la figura 2.1, el aumento en la incorporación de timidina inicia a partir del día 3 del ciclo de cultivo, observándose una mayor incorporación al día 6 del ciclo, este pico de incorporación comienza a disminuir a partir del día 7 el cual se encuentra en la fase lineal del ciclo de cultivo.

Los resultados muestran que entre los días 3 y 7 del ciclo de cultivo se detecta una mayor síntesis de ADN por gramo de tejido comparado con los demás días del ciclo de cultivo, lo que nos sugiere que en esta etapa se encuentra un mayor índice en la síntesis de ADN y probablemente una mayor proliferación celular. Sin embargo, en el día 15 se observa un segundo pico de síntesis de ADN, el cual como se puede observar en la figura 2.1 es mucho menor comparado con el que se observa en el día 6, probablemente debido a que en estos días las células entran nuevamente a una fase de mayor proliferación celular.

Estos resultados Podrían sugerir que de alguna manera las células han adquirido lo que se llama "memoria celular" y éstas se encuentran programadas para que cada 14 días reinicien nuevamente un ciclo de cultivo en un medio fresco. Sin embargo, como a los 14 días de cultivo las células han consumido la mayor cantidad de nutrientes, es muy difícil mantener todos los procesos biológicos que se requieren para poder conservar su población incluyendo la síntesis de ADN.

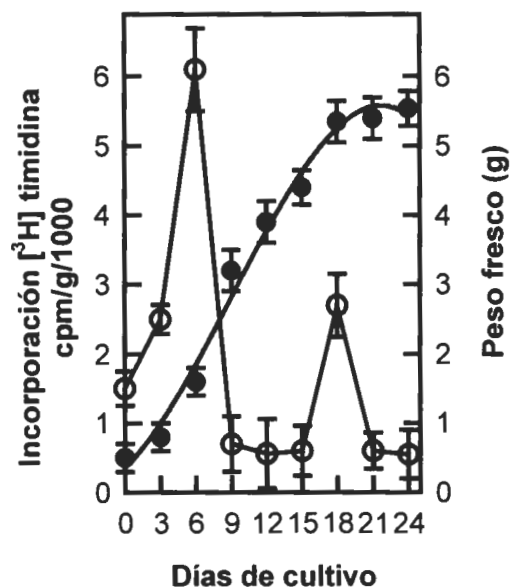


Figura 2.1 Caracterización de la incorporación de [³H] timidina al ADN durante un ciclo de cultivo en células en suspensión de *C. arabica* L. Las células fueron incubadas por 4 horas con 10 μ Ci de [³H] timidina. Posteriormente las células fueron cosechadas y se determinó su crecimiento con base en el peso fresco (\bullet). La cantidad de radiactividad incorporada se determinó utilizando 1 g de tejido fresco, los extractos obtenidos fueron incubados con TCA a una concentración final del 10% y finalmente en los precipitados obtenidos se detectó la cantidad de marca incorporada en un contador de centelleo (\circ). Los resultados que se presentan son el promedio de 3 experimentos \pm ES.

Basándonos en los resultados en la síntesis de ADN obtenidos anteriormente, se decidió evaluar el efecto del AlCl_3 en la incorporación de [³H] timidina al ADN mediante ensayos de pulso incubando las células con 10 μ Ci [³H] timidina durante 30 min y con 100 μ M de AlCl_3 durante diferentes tiempos iniciando por el día 3 hasta el día 7. Como se observa en la figura 2.2 el AlCl_3 tuvo un efecto poco marcado durante estos días en la síntesis del ADN. Sin embargo, se puede observar que en los mismos días hay tiempos (3 y 9 h) en los que hay una disminución en la incorporación de [³H] timidina.

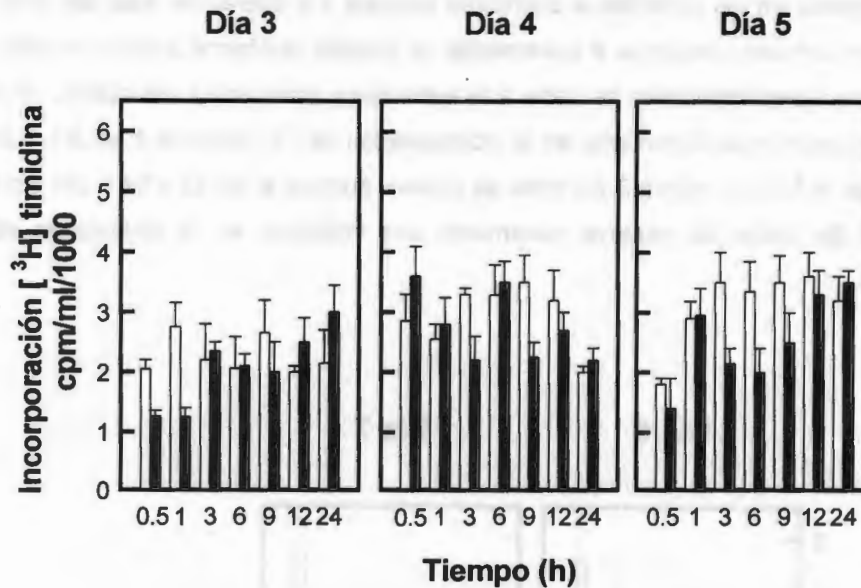


Figura 2.2 Efecto del AlCl_3 en la síntesis de ADN en células en suspensión de *C. arabica* L. El experimento se inició tomando células de los días 3, 4 y 5 del ciclo de cultivo. Las células fueron incubadas durante 4 horas con $10 \mu\text{Ci}$ de [^3H] timidina y con (■) o sin (□) $100 \mu\text{M}$ de AlCl_3 durante 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Después de este tiempo se determinó la incorporación de [^3H] timidina agregando PCA al 4% y posteriormente se detectó la radiactividad por medio de un contador de centelleo. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 experimentos \pm ES.

Por otro lado se puede observar en la figura 2.3 que conforme avanza el ciclo de cultivo la incubación de las células con el AlCl_3 provocó una disminución hasta de un 50% en la incorporación de [^3H] timidina al ADN con respecto al control después de 24 horas de incubación con $100 \mu\text{M}$ de AlCl_3 en los días 6 y 7.

De igual forma se puede observar que durante todos los días de tratamientos con el AlCl_3 , éste indujo un efecto heterogéneo (figura 2.2 y 2.3), lo que sugiere que el efecto del AlCl_3 depende del tiempo de incubación y del día del ciclo de cultivo para los tratamientos. Este efecto probablemente se deba a que conforme avanza los días del ciclo de cultivo, las células se encuentran en fases más uniformes, conjuntamente que el tiempo de duplicación de las células se encuentra entre los 5.6 ± 0.12 días de cultivo (Martínez-Estévez *et al.*, 2001).

También se puede observar en las figuras 2.2 y 2.3 que la incorporación de timidina fue heterogénea en los controles a diferentes tiempos y a diferentes días del ciclo de cultivo, pero con una tendencia a incrementar la síntesis conforme avanza el ciclo de cultivo, lo cual probablemente se debe a la naturaleza asincrónica del cultivo, lo que se correlaciona con un incremento en la incorporación de [³H] timidina a las 3 h y 24 h de adicionar el AlCl₃ en el día 3 del ciclo de cultivo, aunque a las 12 y 24 h del día 6 y 7 del ciclo de cultivo se observa claramente una inhibición en la síntesis de ADN (figura 2.3).

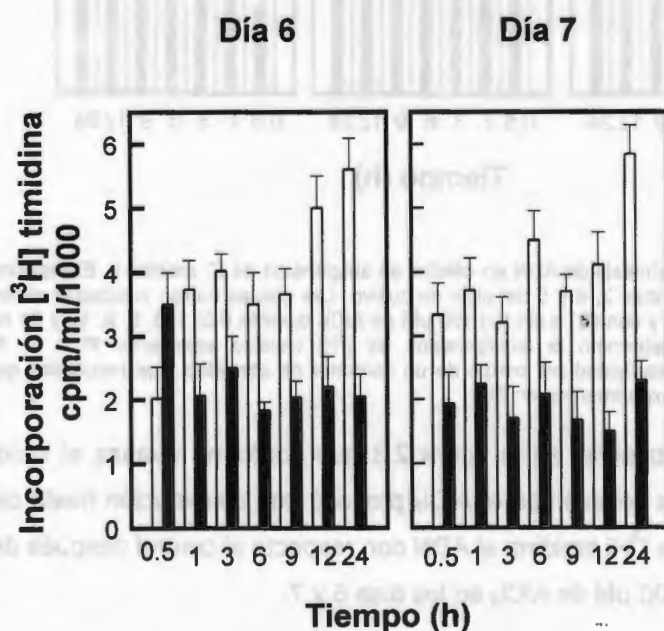


Figura 2.3 Efecto del AlCl₃ en la síntesis de ADN en células en suspensión de *C. arabica* L. El experimento se realizó tomando células de los días 6 y 7 del ciclo de cultivo. Las células fueron incubadas durante 4 horas con 10 μ Ci de [³H] timidina y con (■) o sin (□) 100 μ M de AlCl₃ durante 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Después de este tiempo se determinó la incorporación de [³H] timidina agregando PCA al 4% y posteriormente se detectó la radiactividad por medio de un contador de centelleo. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 experimentos +/- ES.

DISCUSIÓN

Se ha sugerido que el Al^{3+} podría estar inhibiendo la división celular al asociarse con el ADN en los núcleos de las células vegetales (Morimura *et al.*, 1978). Por otra parte la división celular es un proceso lento, y el ciclo celular dura alrededor de un día en los sistemas vegetales.

Dentro de los ápices de las raíces de las plantas, la división celular es básicamente un proceso asincrónico y puede existir o no una pequeña coordinación del tiempo de la división entre las células (Fobert *et al.*, 1994). Aunque ciertos aspectos celulares, incluyendo la localización intracelular de proteínas pueden ser estudiadas en células individuales y no se requiere de un tiempo estable de división entre las células, los análisis bioquímicos y moleculares de la división celular son previstos en la capacidad de los sistemas celulares que pueden tener poblaciones de células en un estado temporalmente sincronizado (Dewitte y Murray, 2002).

En el presente trabajo, utilizando un tejido asincrónico de células en suspensión de *C. arabica* L., los datos que se presentan son consistentes con otros trabajos realizados sobre los efectos inhibitorios del $AlCl_3$ sobre la síntesis del ADN. Debido a la asincronía del cultivo, se observó un pequeño pero consistente aumento en la síntesis del ADN a diferentes tiempos durante los días 3, 4 y 5 del ciclo de cultivo (figura 2.2), mientras que los tratamientos con $AlCl_3$ causaron una inhibición drástica en la síntesis de ADN a las 12 y 24 horas en los días 6 y 7 del ciclo de cultivo (figura 2.3).

Minocha *et al.*, 1992 demostraron que el $AlCl_3$ provocó una disminución drástica hasta de un 90% y 50% de la síntesis de ADN cuando las células eran tratadas con 1 mM y 0.5 mM de $AlCl_3$, en nuestro sistema utilizando una concentración de 0.1 mM se observó una disminución del 50% en la síntesis de ADN, lo que nos sugiere que nuestro sistema podría ser más sensible y tener una respuesta más rápida al Al^{3+} o que el efecto del Al^{3+} varía entre las diferentes especies y los diferentes tejidos de plantas.

En trabajos realizados sobre el efecto del Al^{3+} sobre la síntesis de ADN, se ha observado que el Al^{3+} se acumula en los núcleos de las células de las raíces de

guisante tratadas con AlCl_3 , aunque se cree que la entrada del Al^{3+} al simplasto esta muy limitada. Una razón posible de la preferencia del Al^{3+} de acumularse en los núcleos, es que en éste organelo celular se encuentra el ADN el cual esta cargado negativamente debido a la presencia de un alto contenido de fosfatos (Naora *et al.*, 1961). En base en los resultados obtenidos en nuestro sistema en el cual se observa hasta un 50% de inhibición en la síntesis de ADN cuando las células son tratadas con AlCl_3 y con datos en la literatura, podemos proponer que este efecto podría deberse a que el Al^{3+} de igual manera se está uniendo al ADN por atracciones electrostáticas y que de algún modo esta impidiendo o bloqueando la síntesis de ADN.

En trabajos realizados en la línea celular BY-2 de tabaco, se observó que cuando las células de 3 días del ciclo de cultivo fueron incubadas con diferentes concentraciones de menadiona, los niveles de síntesis de ADN disminuyeron rápidamente durante las primeras 5 horas de tratamiento, demostrando que el estrés oxidativo tiene un efecto marcado sobre la replicación del ADN. Para determinar el efecto del estrés oxidativo sobre alguna fase del ciclo celular la menadiona se aplicó a un cultivo sincronizado de la línea BY-2 y se observó que la menadiona tuvo un efecto claro en la transición de las fases G_1/S (Reichheld *et al.*, 1999).

En otros trabajo realizados sobre la línea celular BY-2 se observó que cuando las células eran tratadas con AJ no se observaron diferencias entre el control y las células tratadas. Por lo tanto realizaron experimentos para determinar el tiempo de la aplicación del ácido jasmónico (AJ) y se determinó que el efecto de esta hormona es dependiente de la fase del ciclo celular, observándose un mayor efecto en la fase S del ciclo de cultivo (Swiatek *et al.*, 2002).

La respuesta de si existe una relación entre los efectos tóxicos provocados por el Al en la síntesis del ADN y la inducción a la muerte celular, aun no se ha establecido. Sin embargo, realizando algunos estudios sobre las propiedades de la membrana plasmática cuando las células son tratadas con Al o sobre la acumulación del Al en el citosol de las células, nos daría una idea más clara de los efectos provocados por el Al sobre la inducción a la muerte celular. Así como también, realizar algunos estudios para verificar si el Al provoca cambios estructurales en los núcleos de las células, para

verificar si el AI tiene un efecto específico sobre el ADN. Todo lo anterior, con el fin de elucidar un mecanismo de respuesta provocado por el AI sobre la división celular.

BIBLIOGRAFÍA

Dewitte W. and J. A. H. Murray (2002) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 1-30.

Fobert P. R., E. S. Coens, G. J. P. Murphy and J. H. Doonan (1994) Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *EMBO J.* **13**: 616-624.

Herbert R. J., B. Vilhar, C. Evvet, C. B. Orchard and H. J. Rogers (2001) Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco BY-2 cell line. *J. Exp. Bot.* **52**: 1615-1623.

Marienfeld S., H. Lehmann and R. Stelzer (1995) Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil* **171**: 167-173.

Martínez-Estévez M., J. A. Muñoz-Sánchez, V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández-Sotomayor (2001) Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspension of Coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* **20**: 469-474.

Matsumoto H., S. Morimura and E. Takahashi (1977) Binding of aluminium to DNA of DNP in pea roots nuclei. *Plant Cell Physiol.* **18**: 987-993.

Minocha R., S. C. Minocha, S. Long and W. C. Shortle (1992) Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthesis enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant *Chataranthus roseus*. *Physiologia Plantarum* **85**: 417-424.

Morimura S., E. Takahashi and H. Matsumoto (1978) Association of aluminium with nuclei and inhibition of cell division in onion roots. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **88**: 395-401.

Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth on bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 608-612.

Naora H., H. Naora, A. E. Mirsky and V. G. Allfrey (1961) Magnesium and calcium in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiology.* **44**: 713-741.

Reichheld J. P., T. Vernoux, F. Lardon, M. Van Montagu and D. Inze (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.* **17**: 647-656.

Santana N. (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto. Tesis de Doctorado. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana Cuba.

Swiatec A. M. Lenjou, D. Van Bocksteale, D. Inze and H. Van Onckelen (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* **128**: 201-211.

Wang H., Q. Qi, P Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby, and L.C. Fowke (1998) ICK1, a cyclin dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both cdc2a and CyD3 and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**: 501-510.

CAPÍTULO 3

CLONACIÓN DEL GEN, DETECCIÓN Y EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CINASA DE LA PROTEÍNA *cdc2a* EN CULTIVOS CELULARES DE *C. arabica* L.

INTRODUCCIÓN

Los controles genéticos y bioquímicos que regulan la división celular en organismos eucariontes han sido estudiados en mucho detalle en levaduras y animales (Nurse, 1990; Pines y Hunter 1990). Un componente clave para este mecanismo de regulación es una proteína cinasa de 34 KDa codificada por el gen *cdc2*, conocida como p34^{cdc2} (Hindley y Phear 1984).

En *Arabidopsis*, se han identificado 5 tipos de proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad de cinasa de la proteína CDK tipo A, es regulada en la fase G₁ y continua en la fase S (Dewitte y Murray 2002). Resultados obtenidos en la línea celular BY-2 de tabaco sugieren que la actividad de cinasa permanece alta en la fase G₂ y continúa en la transición G₂ a M (Reichheld *et al.*, 1999; Sorell *et al.*, 2001). Mientras que en cultivos celulares de *Arabidopsis* parece haber una reducción en la actividad durante la fase G₂ y se observa un segundo pico en la transición de G₂ a M (Menges y Murray 2002).

En *S. Pombe* el producto del gen *suc1* es una proteína de 13 kDa que se encuentra asociada a la proteína *cdc2* formando un complejo estable (Brizuela *et al.*, 1987). En muchos sistemas vegetales se ha utilizado a la proteína p13 acoplada a la sefarosa (p13^{suc1}-sepharose) específicamente para unirse por afinidad a la proteína cinasa *cdc2* que se encuentra formando complejos con las diferentes ciclinas (Brizuela *et al.*, 1989).

Como se mencionó en el capítulo I, la progresión del ciclo celular es controlada en parte por la acción ordenada de CDKs, las cuales tienen una función clave durante el

transcurso del ciclo celular, por lo que la proteína CDK-A es una candidata para evaluar el efecto del $AlCl_3$ sobre la regulación del ciclo celular.

Por lo que en este capítulo, lo primero que se realizó fue detectar la actividad de cinasa de la proteína *cdc2a* utilizando a la proteína p13 para precipitar los complejos CDK/Cyc y estandarizar las condiciones del ensayo para medir su actividad de cinasa *in vitro* utilizando como sustrato a la histona H1. De igual manera se determinó el efecto del Al sobre la actividad de cinasa de la proteína *cdc2a*.

En este capítulo se reporta paralelamente, la clonación de un ADN complementario (ADNc) obtenido mediante la técnica de RT-PCR, este ADNc codifica a una región cercana al sitio catalítico de la enzima que presenta un alto grado de similitud con otras especies de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Actividad de *cdc2a*

La actividad de cinasa de *cdc2a* se determinó de acuerdo a la metodología de Magyar *et al.*, (1993) con algunas modificaciones. Las células de café fueron maceradas con N_2 líquido, homogeneizadas con la ayuda de un politrón en el amortiguador de extracción (25 mM Tris-HCl pH 7.5; 15 mM $MgCl_2$; 15 mM EGTA; 15 mM *p*-nitrofenilfosfato; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 1 mM vanadato de sodio; 20 μ g/ml aprotinina; 10 μ g/ml leupeptina; 1 mM PMSF y 0.1% Tween 20) y centrifugadas a 25 000 g/30 min. La concentración de proteína en los extractos se determinó por el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985) (BCA protein Assay Kit). Doseos de μ g de proteína del extracto total fueron incubados con 10 μ l de la proteína p13 acoplada a esferas de sefarosa toda la noche a 4 °C. Después del período de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 25 000 g/1min, lavadas 3 veces con el amortiguador de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 250 mM NaCl; 5 mM EGTA; 5 mM EDTA; 2 μ g/ml aprotinina y 0.1% Tween 20) y una vez más con el amortiguador de ensayo de cinasa (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 15 $MgCl_2$; 5 mM EGTA y 1 mM DTT).

El ensayo de cinasa se inició con la adición de 30 μ l de la mezcla de reacción (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 15 mM $MgCl_2$; 5 mM EGTA y 1 mM DTT; 10 μ Ci [γ - ^{32}P] ATP (3000 Ci/mmol) y 100 μ g histona H1 (tipo III) en un volumen final de 30 μ l) a las esferas de sefarosa, la reacción se incubó por 15 min a 28 °C y se detuvo con la adición de 15 μ l de amortiguador Laemmli 3X.

Las muestras fueron fraccionadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% a 100 volts durante 2 horas aproximadamente, posteriormente el gel fue secado y expuesto a una película Kodak K-Omat durante 7 días a temperatura ambiente.

RT-PCR

El ARN total de las células en suspensión de *C. arabica* L. fue extraído con el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Se utilizó 0.1 μ g del ARN total de los diferentes días del ciclo de cultivo para los ensayos de RT-PCR mediante el paquete comercial

SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum (Invitrogen). Los cebadores empleados, que corresponden a secuencias de cocotero amplifican un segmento de 611 pares de bases dentro del cual se encontraba el motivo PSTAIRE el cual es el motivo característico de unión a ciclina que se encuentra en las cinasas dependientes de ciclinas tipo A. Los cebadores empleados para la amplificación fueron los siguientes: directo 5'- TGGATCAGTATGAGAAGGTGGAGAAGAT -3' ; inverso 5'- TCGATCTCAGAATCTACAGGAAACAGTG -3'. Los productos de la reacción se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: (50 °C-30min; 94 °C-3min; 1 ciclo), (94 °C-30s; 55 °C-2min; 72 °C-1min; 40 ciclos), (72 °C-10min; 1 ciclo) y (4 °C). Los fragmentos amplificados se ligaron a un vector TOPO (TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

Detección de la actividad de cdc2a en células en suspensión de *C. arabica* utilizando a la histona H1 como sustrato

Estudios realizados sobre la regulación del ciclo celular en plantas, han demostrado que existen proteínas parecidas a p34^{cdc2}, utilizando anticuerpos contra el péptido PSTAIRE en una gran variedad de especies de plantas (Hirt *et al.*, 1991; Feiler y Jacobs 1990; Hemsley *et al.*, 2001).

Para comprobar la interacción de una proteína cdc2a con la proteína p13, los extractos proteicos de células en suspensión de *C. arabica* fueron incubados con la proteína p13 acoplada a sefarosa para aislar los diferentes complejos de la proteína cdc2a. Las proteínas aisladas de las suspensiones celulares de *C. arabica* se utilizaron para realizar los ensayos de cinasa (figuras 3.1, 3.2 y 3.3) utilizando como sustrato a la histona H1.

Para determinar las condiciones óptimas para los ensayos de actividad de cinasa se probaron diferentes concentraciones de los extractos proteicos (figura 3.1), diferentes concentraciones de la histona H1 (figura 3.2) y diferentes tiempos de incubación de la reacción del ensayo de cinasa (figura 3.3).

Como se puede observar en la figura 3.1, la actividad de cinasa de la proteína cdc2a depende de las concentraciones utilizadas de los extractos proteicos, mientras más cantidad de extracto proteico se incubó con la misma cantidad de la proteína p13 acoplada a la sefarosa fue mayor su actividad utilizando las mismas concentraciones de sustrato (figura 3.1A) comparadas con el control MR (mezcla de la reacción sin extracto proteico).

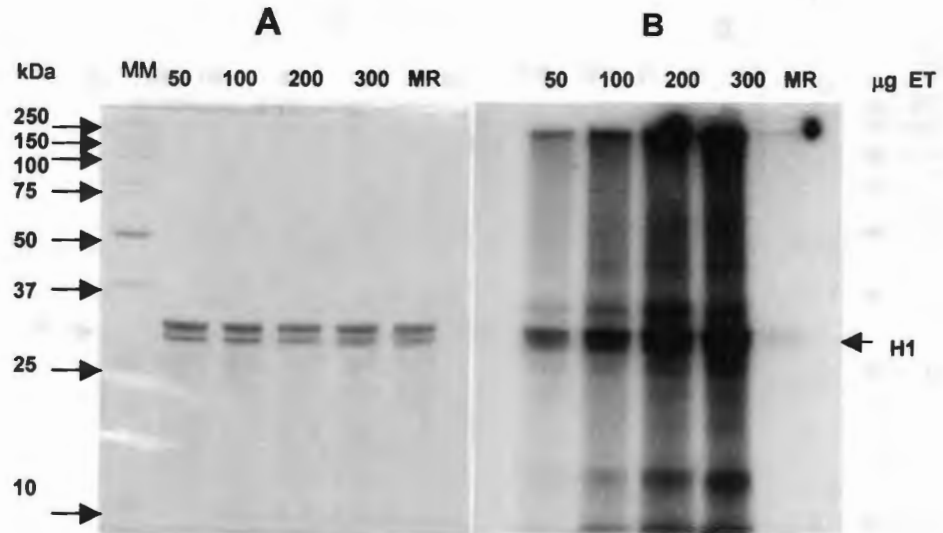


Figura 3.1 La actividad de cinasa de la proteína *cdc2a* depende de la concentración de proteína. Para determinar la actividad de la proteína *cdc2a* se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos proteicos (50, 100, 200 y 300 μg) los cuales fueron incubados con 10 μl de la proteína p13 acoplada a la sefarosa. Las fracciones precipitadas se utilizaron para detectar la actividad de cinasa por medio de la fosforilación *in vitro* de la histona H1 utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% y teñidos con una solución de azul de coomasie (A). Para visualizar los productos de la fosforilación el gel de poliacrilamida fue expuesto a una película durante 7 días (B). Los números y las flechas de la izquierda muestran los pesos moleculares (MM) en kilodaltones (kDa); ET; extracto proteico total; MR; mezcla de la reacción.

En cuanto a la determinación de la actividad de cinasa de la proteína *cdc2a* utilizando diferentes concentraciones de la histona H1, 200 μg de los extractos proteicos totales fueron incubados toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ con la misma cantidad de la proteína p13 acoplada a la sefarosa. Las fracciones precipitadas fueron utilizadas para los ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando 20, 30, 50 y 100 μg de la histona H1 como sustrato. Como se puede observar en la figura 3.2, para detectar la actividad de cinasa de la proteína *cdc2a* son suficientes 20 μg de la histona H1, y esta actividad aumenta conforme se incrementa la concentración del sustrato.

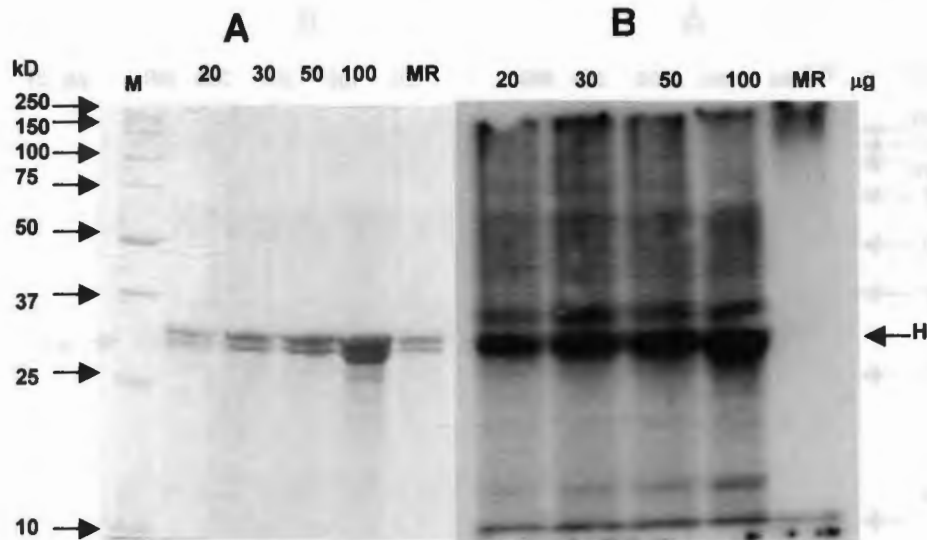


Figura 3.2 La actividad de cinasa de la proteína cdc2a depende de la concentración de la histona H1. Para determinar si la actividad de la proteína cdc2a es dependiente de la concentración del sustrato, se utilizaron diferentes concentraciones de la histona H1 (20, 30, 50 y 100 μg). Doscientos μg de los extractos totales fueron incubados con 10 μl de la proteína p13 acoplada a la sefarosa. Las fracciones precipitadas se utilizaron para detectar la actividad de cinasa por medio de la fosforilación *in vitro* de la histona H1 utilizando [γ - ^{32}P]-ATP. Los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% y teñidos con una solución de azul de coomasie (A). Para visualizar los productos de la fosforilación el gel de poliacrilamida fue expuesto en una película durante 7 días (B). Los números y las flechas de la izquierda muestran los pesos moleculares (MM) en kilodaltones (kDa); H1, histona H1; MR; mezcla de la reacción.

Otro de los parámetros establecidos para determinar las condiciones óptimas de la actividad de la proteína cinasa es el tiempo de incubación de la reacción del ensayo. Como se puede observar en la figura 3.3 la actividad de cinasa de la proteína cdc2a no fue dependiente del tiempo de incubación de la reacción en los intervalos probados, se observa una misma fosforilación de la histona H1 tanto a los 10 min de incubación como a los 30 min, lo que nos sugiere que para detectar la actividad de cinasa de la proteína cdc2a es suficiente incubar la reacción del ensayo solamente durante 10 min.

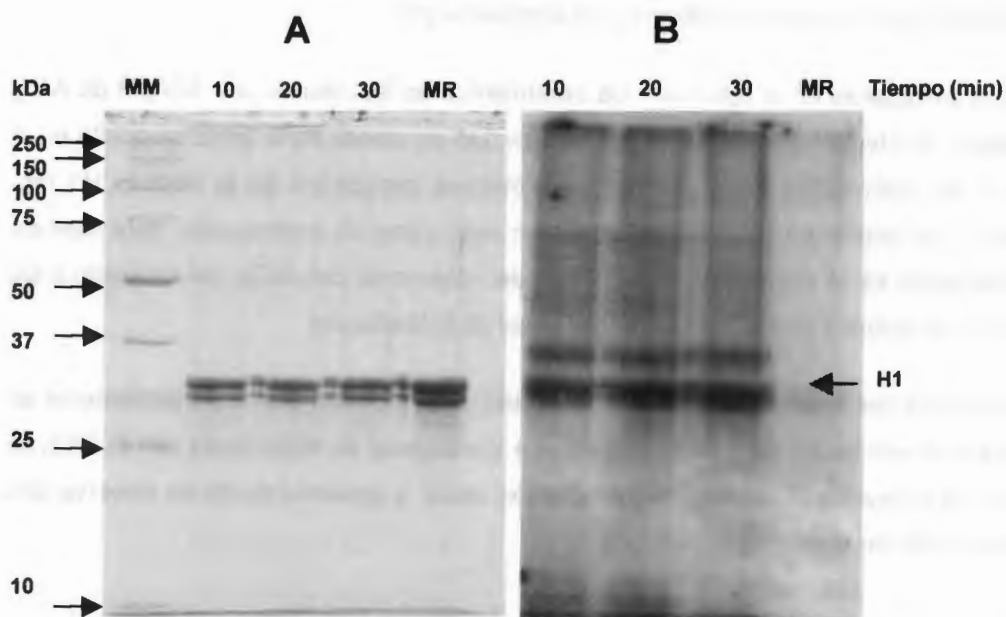


Figura 3.3 Actividad de cinasa de la proteína *cdc2a* a diferentes tiempos de incubación de la reacción. Para determinar la actividad de la proteína *cdc2a*, 200 μg de los extractos proteicos totales fueron incubados con 10 μl de la proteína p13 acoplada a sefarosa. Las fracciones precipitadas se utilizaron para detectar la actividad de cinasa por medio de la fosforilación *in vitro* de la histona H1 utilizando [γ - ^{32}P]-ATP durante 10, 20 y 30 minutos de incubación de la reacción del ensayo de cinasa. Los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% y teñidos con una solución de azul de coomasie (A). Para visualizar los productos de la fosforilación el gel de poliacrilamida fue expuesto en una película durante 7 días (B). Los números y las flechas de la izquierda muestran los pesos moleculares (MM) en kilodaltones (kDa); MR, mezcla de la reacción; H1, histona H1.

Efecto del Al^{3+} sobre la actividad de la proteína *cdc2a*

Una de las principales respuestas de los organismos cuando son sometidos a diferentes tipos de estrés es la detención de la división celular. En plantas hay pocos reportes acerca de una relación entre el ciclo celular y las respuestas a diferentes tipos de estrés.

Para determinar el efecto del Al sobre la actividad de cinasa de la proteína *cdc2a*, se obtuvieron los extractos proteicos de las células no tratadas y de las tratadas con 100 μM de AlCl_3 durante diferentes tiempos en los días 3 y 7 del ciclo de cultivo (figura 3.4

y 3.5) y la actividad de cinasa se determinó por la fosforilación *in vitro* de la histona H1 utilizando los extractos precipitados con la proteína p13.

Como se observa en la figura 3.4 los tratamientos de las células con 100 μM de AlCl_3 tuvieron un efecto heterogéneo sobre la actividad de cinasa de la proteína cdc2a en el día 3 de cultivo (fig. 3.4A) utilizando las mismas cantidades de la histona H1 (fig. 3.4B). Las células no tratadas presentan un nivel basal de fosforilación, este nivel de fosforilación se ve disminuido a los 15 min de tratamiento con AlCl_3 , sin embargo a los 30 min se observa nuevamente un nivel basal de fosforilación.

Este efecto del Al sobre la actividad de cinasa de la proteína cdc2a probablemente se deba a la asincronía del cultivo, dado que a las 6 horas de tratamiento con el AlCl_3 se observa nuevamente el nivel de fosforilación basal y posteriormente se observa una disminución en la actividad de cdc2a.

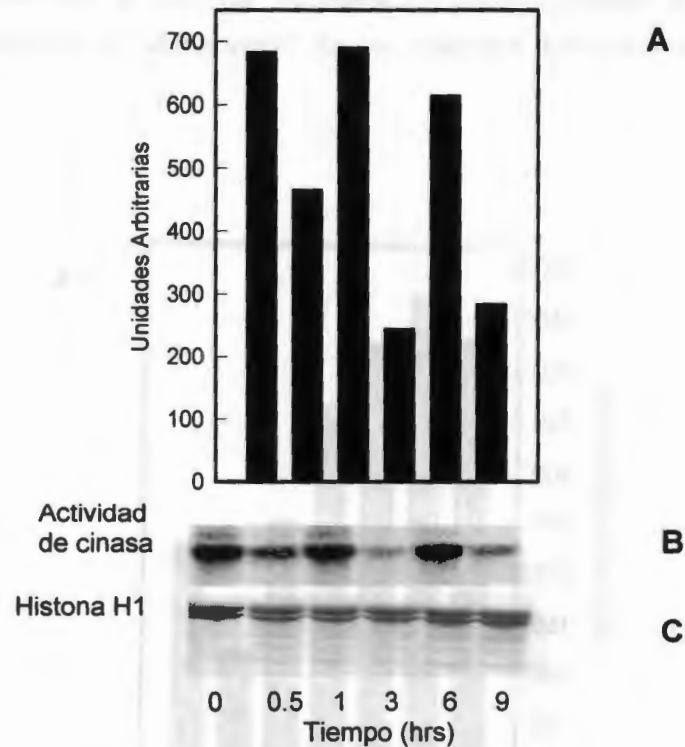


Figura 3.4 Efecto del AI sobre la actividad de cinasa de la proteína cdc2a. Células de 3 días de cultivo fueron tratadas con y sin 100 μM de AlCl_3 durante 0.5, 1, 3, 6 y 9 horas. Los extractos proteicos totales extraídos obtenidos fueron incubados con la proteína p13 acoplada a la sefrosa. Los extractos precipitados fueron utilizados para determinar la actividad de cinasa por medio de la fosforilación *in vitro* de la histona H1 utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Los productos de la fosforilación fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% y teñidos con una solución de azul de coomasie (C). Para visualizar los productos de la fosforilación el gel de poliacrilamida fue expuesto a una película durante 7 días (B). La imagen de la autoradiografía fue cuantificada en un molecular imager system G-125 (A).

Sin embargo, cuando células de 7 días de cultivo fueron tratadas con AlCl_3 se observa un perfil diferente en la fosforilación. Como se puede observar en la figura 3.5 las células control presentan un nivel de fosforilación basal de la histona H1. Sin embargo, se puede observar que los tratamiento con 100 μM de AlCl_3 causaron un ligero incremento en la actividad a los 30 min y una disminución hasta del 75% a las 9 horas de tratamiento con AlCl_3 (fig. 3.5A). Estos resultados sugieren que el AI podría

estar interactuando con algunos de los componentes involucrados en la regulación de la actividad de la proteína cdc2a inhibiendo su actividad y que esta proteína probablemente se encuentra implicada en los mecanismos de respuesta por la toxicidad del Al.

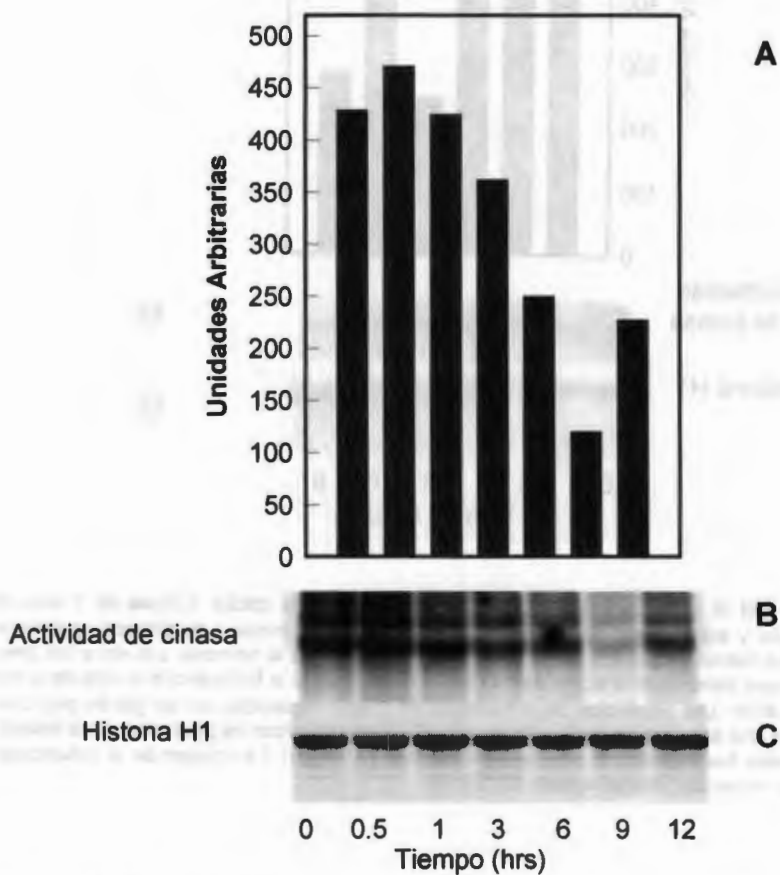


Figura 3.5 Efecto del Al sobre la actividad de cinasa de la proteína cdc2a.. Células de 7 días de cultivo fueron tratadas con y sin 100 μM de AlCl_3 durante 0.5, 1, 3, 6, 9 y 12 horas. Los extractos proteicos totales extraídos obtenidos fueron incubados con la proteína p13 acoplada a la sefrosa. Los extractos precipitados fueron utilizados para determinar la actividad de cinasa por medio de la fosforilación *in vitro* de la histona H1 utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Los productos de la fosforilación fueron separados en un gel de poliácridamida al 12% y teñidos con una solución de azul de coomassie (C). Para visualizar los productos de la fosforilación el gel de poliácridamida fue expuesto a una película durante 7 días (B). La imagen de la autoradiografía fue cuantificada en un molecular imager system G-125 (A).

Obtención y clonación de un ADN complementario de *cdc2a* de *C. arabica* L.

Con el fin de obtener un fragmento de ADN complementario de *cdc2a* de *Coffea arabica* L, para generar una sonda homóloga y aumentar las posibilidades de hibridación se utilizó la estrategia de la transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR), utilizando el ARN total de las células en suspensión de *C. arabica* L., empleando cebadores específicos diseñados para una región conservada en *cdc2a* de *Cocos nucifera*.

Como se puede observar en la figura 3.6A mediante esta técnica de RT-PCR logramos la amplificación de dos fragmentos, uno de alrededor de 620 pb igual al tamaño esperado para el control positivo y otro de alrededor de 400 pb. Para disminuir el número de productos inesperados, realizamos otra PCR cambiando la temperatura de alineación de los oligos de 55 °C a 65 °C, como se observa en la figura 3.6B con estas condiciones logramos amplificar un solo fragmento de alrededor de 620 pb que corresponde al tamaño esperado en el cual se encuentra la región cercana al sitio activo de la proteína *cdc2a*. Los fragmentos amplificados fueron ligados a un vector pCR-TOPO.

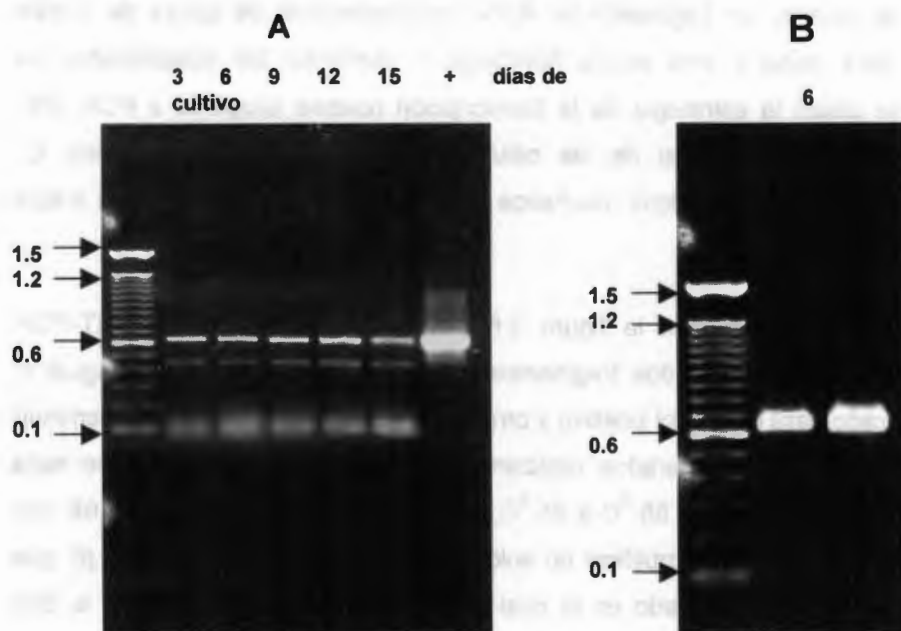


Figura 3. 6 Productos de la RT-PCR. Para la RT-PCR se utilizó el ARN total extraído de las células en suspensión de *C. arabica* de los días 3, 6, 9, 12 y 15 del ciclo de cultivo. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, A; productos de la RT-PCR con una temperatura de alineamiento de los oligos a 55 °C y B; a una temperatura de alineamiento de los oligos a 65 °C. Las números y las flechas de la izquierda muestran los pesos moleculares en kilo bases (Kb); e) escalera de 100 pares de bases ; +) Control positivo que contiene el fragmento de *cdc2a* de *Cococs nucifera* (pBlueSkrip).

Después de ligar el fragmento al vector se transformaron células de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico, las cuales fueron seleccionadas posteriormente en un medio selectivo con kanamicina. En total se obtuvieron 8 colonias blancas, las cuales fueron sometidas a análisis de extracción de plásmidos por lisis alcalina para obtener los plásmidos (figura 3.7A), la digestión de los plásmidos para liberar el fragmento ligado (figura 3.7B) y PCR para verificar la amplificación del fragmento (figura 3.8).

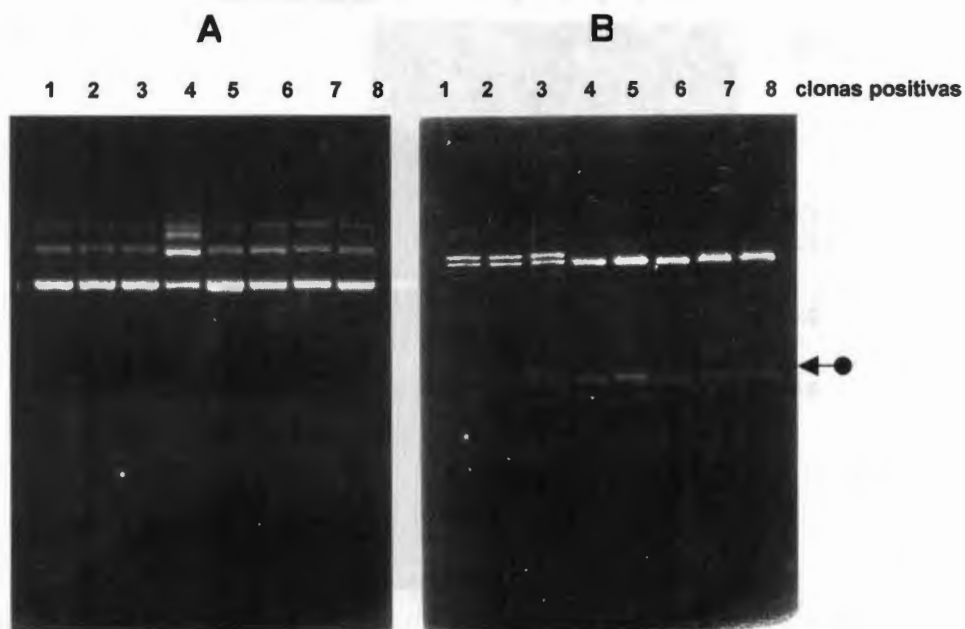


Figura 3. 7 Plásmidos extraídos de *E. coli* por lisis alcalina y digestión de los mismos con enzimas de restricción. Las colonias positivas (1-8) fueron seleccionadas para la extracción de los plásmidos mediante lisis alcalina y se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (A), los plásmidos fueron sometidos a una digestión con Eco R1 a 37 °C durante 2 horas para liberar el fragmento clonado y se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (B). La flecha de la derechas indica el fragmento liberado.

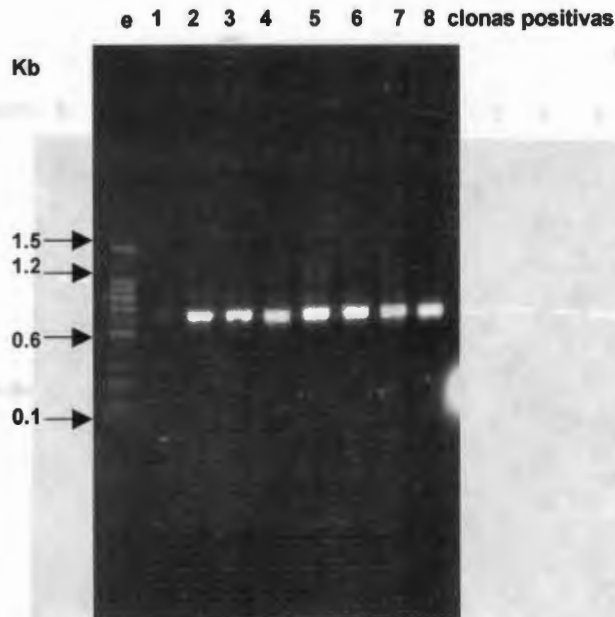


Figura 3. 8 Productos del PCR. Los plásmidos extraídos de las colonias positivas (1-8) fueron sometidos a una reacción de PCR para amplificar el fragmento clonado, utilizando los mismos oligos. Los productos fueron verificados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Los números y las flechas de la izquierda muestran los pesos moleculares en kilobases (Kb): e) escalera de 100 pares de bases (pb).

Después de todos los análisis realizados anteriormente, las 8 clonas se mandaron a secuenciar al CINVESTAV Irapuato, las cuales resultaron ser efectivamente *cdc2a* con un 100% de homología entre ellas mismas.

En la figura 3.9 se observa la alineación de la secuencia deducida de aminoácidos de *cdc2a* de *C. arabica* con sus ortólogos en diferentes especies de plantas. Como se puede observar todas las proteínas *cdc2a* reportadas en estas especies de plantas poseen un alto grado de identidad. De igual manera se puede observar que en esta región de 209 aminoácidos corresponde a la región amino terminal de la proteína en donde se encuentran los sitios de regulación por fosforilación y el de unión a ciclina. Además este fragmento clonado abarca una región del carboxilo terminal de la proteína en donde se encuentra el asa T, donde se lleva a cabo la fosforilación en un residuo conservado de treonina (T-160).

Cofar MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Picab MEQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Pinco MEQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Petr MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Phipa MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Dauca MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Lyces MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Poptr MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH
Heltu MEQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDRLTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIRESLLKEMQH

Cofar GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPELAKDPRLIKTFLYQILRGIAYCHS
Picab GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPELAKDPRLIKTFLYQILRGIAYCHS
Pinco GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPELAKDPRLIKTFLYQILRGIAYCHS
Petr GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPEFAKDPRLIKMFLYQILRGIAYCHS
Phipa GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPELAKDPRLIKTFLYQILRGIAYCHS
Dauca ENIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPEFAKDPRLIKMFLYQILRGIAYCHS
Lyces GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPEFSKDPRLVKMFLYQILRGIAYCHS
Poptr GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSSPEFAKDPRLIKTFLYQILRGIAYCHS
Heltu GNIVRLQDVVHSEKRLYLVEYLDLDLKKHMDSCPEFSKDPRLVKTFLYQILRGIAYCHS

Cofar HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Picab HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Pinco HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Petr HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Phipa HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Dauca HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Lyces HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Poptr HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH
Heltu HRVLHRDLKPNLLIDRRTNALKLADFGFLARAFGIPVRTFTHEVVTWYRAPEILLGSRH

Cofar YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Picab YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Pinco YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Petr YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Phipa YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Dauca YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Lyces YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Poptr YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI
Heltu YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQRPLFPGDSEI

Figura 3.9 Alineación de la secuencia de aminoácidos de *cdc2a* de *C. arabica* con otras especies de plantas. Las letras blancas con fondo negro representan aminoácidos idénticos; Las letras negras con fondo blanco representan aminoácidos diferentes y las letras negras con fondo gris representan aminoácidos similares. Los números de acceso de las secuencias se encuentran entre paréntesis *Coffea arabica*, cofar (AJ496622); *Picea abies*, Picab (Q43361); *Pinus contorta*, Pinco (Q40790); *Petroselinum crispum*, Petcr (Q40289); *Physcomitrella patens*, Phipa (Q84VT0); *Daucus carota*, Dauca (QL0T8); *Lycopersicon esculentum*, Lyces (Q65839); *Populus tremula*, Poptr (Q8WL03) y *Helianthus tuberosum*, Heltu (Q9AUH4). Los * representan sitios de fosforilación. La alineación múltiple se llevo a cabo con el programa BoxShade.

Comparando la secuencia obtenida para *cdc2a* de *C. arabica* en base a su secuencia de nucleótidos y de aminoácidos con otras especies de plantas se obtuvo entre un 92 y 95 % de identidad y entre un 80 y 81% de similitud (cuadro 3. 1). Lo que era de esperarse, dado que esta proteína cinasa se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariontes.

Cuadro 3. 2. Comparación de *cdc2a* de café con otras especies de plantas.

	% de identidad	% de similitud
<i>Picea abies</i>	95	81
<i>Pinus contorta</i>	95	81
<i>Petroselinum crispum</i>	95	81
<i>Physcomitrella patens</i>	94	81
<i>Daucua carota</i>	94	81
<i>Lycopersicon esculentum</i>	93	81
<i>Populus tremula</i>	94	81
<i>Helianthus tuberosus</i>	93	80
<i>Helianthus annuos</i>	93	80

DISCUSIÓN

El hecho de que algunos de los componentes en la regulación del ciclo celular se conservan en organismos que son evolutivamente distantes sugiere la existencia de un mecanismo de regulación que es común en todas los organismos eucariontes (Nurse, 1990).

El ciclo celular se encuentra regulado en diferentes puntos, pero la mayoría de éstos involucra la activación de proteínas cinasas de serina/treonina las cuales, requieren para ser activas la unión de una proteína reguladora conocida como ciclina, de ahí el nombre de cinasas dependientes de ciclinas o CDKs. En levaduras una sola CDK es responsable del control del ciclo celular y posee el motivo de unión a ciclina PSTAIRE. Esta CDK se encuentra conservada en todos los organismos eucariontes y se refiere su nombre como *cdc2a* (Dewitte y Murray 2002).

Sin embargo, en los eucariontes superiores se encuentran adicionalmente múltiples CDKs que tienen funciones en diferentes puntos del ciclo celular, estas CDKs no se encuentran conservadas entre plantas y animales ya que tienen secuencias variantes en los dominios de unión a ciclinas (Dewitte y Murray 2002).

Los datos presentados en este capítulo sugieren que la proteína *cdc2a* se encuentra en café, que hemos logrado detectar su actividad de cinasa *in vitro* y que posee los motivos conservados de las CDKs del tipo A.

La actividad de la CDKs, resulta en la adición covalente de un grupo fosfato a una proteína sustrato en un residuo de serina o treonina, el cual modifica las propiedades del sustrato. Uno de los sustratos más utilizados que son fosforilados en una fase específica del ciclo celular es la extensa fosforilación de la histona H1 (Dewitte y Murray 2002). Como se observa en las figuras logramos detectar la actividad de cinasa de la proteína *cdc2a* *in vitro* utilizando como sustrato a la histona H1.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, una de las formas de regulación de la actividad de las CDKs es la interacción con otras proteínas. *in vivo* las CDKs se encuentran formando grandes complejos con diferentes proteínas, entre

estas proteínas se hallan la proteína p13suc1, la cual forma parte de una familia de proteínas conocidas como CKS (por sus siglas en inglés) que se unen a la proteína cdc2. Como se puede observar en las figuras (3.1-3.5) empleando a la proteína p13suc1 acoplada a una resina de sefarosa logramos aislar un complejo CDK/ciclina capaz de fosforilar a la histona H1 *in vitro*.

Existen una gran cantidad de señales tanto bióticas como abióticas que inducen diferentes tipos de respuestas en las células vegetales, en particular el ácido jasmónico (AJ), el ácido abscísico (ABA), el aluminio (Al) y el estrés oxidativo inducen una inhibición de la división celular. En estudios realizados en la línea celular de tabaco conocida como BY-2, el AJ y el ABA produjeron una interrupción en la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G₁/S. Así como también, los tratamientos con AJ indujeron un decremento en la actividad de cinasa de la proteína cdc2a mientras que los niveles de la proteína se mantuvieron sin ser afectados (Swiatec *et al.*, 2002).

Por otro lado, utilizando estrés oxidativo se observó que en las células tratadas con menadiona una disminución de la actividad de cinasa de la proteína cdc2a a las 3 horas de tratamiento, sin embargo no se observaron cambios a nivel de la proteína confirmando que este tipo de estrés afecta la progresión del ciclo celular a nivel de la actividad de las CDKs y no de la cantidad de la proteína (Reichheld *et al.*, 1999).

Como se puede observar en la figura 3.5 el Al ocasionó un pequeño aumento en la actividad de la proteína cdc2a; sin embargo, se puede observar que a las 3 horas se empieza a observar una disminución de la actividad la cual continúa hasta las 9 horas de tratamiento con 100 μ M de AlCl₃. Estos resultados sugieren que el Al afecta la actividad de cinasa de la proteína cdc2a y estos datos concuerdan con los reportados en la literatura, de modo que el Al podría estar actuando como una señal que desencadena una cascada de señales que involucra a proteínas relacionadas con la regulación de la división.

Los productos del gen *cdc2* en levaduras y en mamíferos son proteína cinasas, y por lo tanto contienen motivos característicos que son comunes con otras proteínas cinasas (Hunter, 1987). La posición de la región PSTAIRE que se encuentra entre elementos conservados proporciona una secuencia de DNA confiable para la autenticidad de una clona para el gen *cdc2* (Feiler y Jacobs, 1990). Como se puede observar en la figura 3.9 logramos aislar y clonar un ADN complementario que codifica una región de la proteína cinasa *cdc2a* que abarca el extremo amino terminal y parte del carboxilo terminal. Los análisis de secuencias deducida de aminoácidos de *C. arabica* con otras especies de plantas mostraron una similitud entre un 93 y 95%. De igual manera se puede observar que en la secuencia deducida de aminoácidos se encuentran el motivo característico de unión a ciclinas, así como también los sitios de regulación por medio de fosforilación.

Todos los datos presentado en este capítulo, sugieren que efectivamente la proteína *cdc2a* se encuentra en *C. arabica* y que el complejo aislado p13/CDK? es capaz de fosforilar a la Histona H1 *in vitro* y los resultados de los análisis de secuencia del gen para *cdc2* en café muestran un alto grado de similitud con otras especies de plantas superiores.

BIBLIOGRAFÍA

Brizuela L., G. Draetta and D. Beach (1987) p13^{sup1} acts in fission yeast cell division cycle as a component of the p34^{cdc2} protein kinase. *EMBO J.* **6**: 3507-3514.

Brizuela L., G. Draetta and D. Beach (1989) Activation of human cdc2 protein as a histone H1 kinase is associated with complex formation p13^{sup1} acts in the fission yeast cell division cycle as a component with the p62 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 4362-4366.

Chomczynski P. and N. Sacchi (1987) Single step methods of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**: 156-159.

Dewitte W. and J. A. H. Murray (2002) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 1-30.

Feiler H. S. and T. W. Jacobs (1990) Cell division in higher plants: a cdc2 gene its 34-kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5397-5401.

Hemsley R., Sandra McCutcheon, J. Doonan and C. Lloyd (2001) p34^{cdc2} kinase is associated with cortical microtubules from higher plant protoplast. *FEBS.* **508**: 157-161.

Hindley, J. and G. A. Phear (1984) Sequence of the cell division gene CDC2 from *Schizosaccharomyces pombe*; patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene.* **31**: 129-134.

Hirt H., A. Pay, J. Gyorgyey, L. Bakó, K. Németh, L. Bogre, R. Schweyen and D. Dudits (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34^{cdc2}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 1636-1640.

John P. C. L., F. L. Sek and M. G. Lee (1989) A homologue of the cell cycle control protein p34cdc2 participates in the cell division cycle of *Chlamydomonas* and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* 1: 1185-1193.

John P. C. L., F. L. Sek, J. C. Carmichael and D. W. McCurdy (1990) p34cdc2 homologue level, cell division, phytohormone responsiveness and cell differentiation in wheat leaves. *J. Cell Sci.* 97: 627-630.

Magyar Z., L. Bakó, L. Bogre, D. Dedeoglu, T. Kapros and D. Dudits (1993) Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. 4: 151-161.

Menges M., and J. A. H. Murray (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell cycle gene activity. *Plant J.* 30: 203-212.

Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 344: 503-508.

Pines J. and T. Hunter (1990) p34^{cdc2} the S and M kinase? *New Biol.* 2: 389-401.

Reichheld J. P., T. Vernoux, F. Lardon, M. Van Montagu and D. Inze (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.* 17: 647-656.

Sorell D. A., M. Menges, J. M. Healy, Y. Deveaux and C. Amano (2001) Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow 2-cells. *Plant Physiol.* 126: 1214-1223.

Swiatec A., M. Lenjou, D. Bockstaele, D. Inze and V. D. Harry (2002) Differential effect of jamonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 128: 201-211.

CAPÍTULO 4

INMUNODETECCIÓN DE UNA PROTEÍNA TIPO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) Y EFECTO DEL $AlCl_3$ SOBRE LA CANTIDAD DE LA PROTEÍNA EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *C. arabica* L.

INTRODUCCIÓN

Las células han desarrollado diferentes mecanismos para mantener la fidelidad de la replicación de sus genomas, estos mecanismos involucran la participación de complejos de diferentes proteínas. Entre estas proteínas se localiza PCNA, la cual se encuentra formando complejos con diferentes tipos de proteínas además de las polimerasas y las nucleasas, dentro de estas proteínas están la CDK-A, las ciclinas tipo D y p21. Además, es un factor esencial para la replicación del ADN durante la síntesis de la cadena complementaria (Tsurimoto *et al.*, 1990) y para la eliminación de nucleótidos en la reparación del ADN (Shivji *et al.*, 1992).

López-Villaseñor *et al.* (1995) clonaron un ADN complementario (ADNc) de PCNA de maíz y recientemente identificaron una segunda clona de ADNc correspondiente a PCNA; los análisis moleculares han demostrado que esta familia de genes en maíz consiste de dos elementos y que ambos genes son expresados de igual manera en tejidos proliferativos (López-Villaseñor *et al.*, 1997).

Debido a que la presencia de la proteína PCNA correlaciona con el estado proliferativo de células y tejidos, el objetivo de este capítulo fue detectar a PCNA y evaluar el efecto del Al^{3+} sobre la cantidad de proteína presente en células en suspensión de *C. arabica* L. Mediante la técnica de inmuno-blot y utilizando anticuerpos policlonales contra PCNA de maíz, logramos inmunodetectar su presencia en los extractos celulares de *C. arabica* L, y evaluar el efecto del $AlCl_3$ sobre la cantidad presente de esta proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunodetección de PCNA

Un gramo de células del día 7 del ciclo de cultivo fueron maceradas con N₂ líquido, homogeneizadas con la ayuda de un politrón en un buffer de extracción (50 mM HEPES; 0.25 M sacarosa; 5.0 mM KCl; 1.0 mM EDTA; 1 mM PMSF; 20 µg ml⁻¹ aprotinina) y centrifugadas a 3000 rpm durante 30 min. La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinónico (Smith *et al.*, 1985) utilizando como estándar albúmina sérica bovina. Cien µg de proteína del extracto total fueron separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamina al 12% y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 2h. Una vez terminada la transferencia la membrana fue incubada en una solución de leche descremada al 5% durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana fue lavada 3 veces durante 15 minutos con un buffer de fosfatos (PBS) mas 0.6% de Tween 20. La membrana fue incubada con el anticuerpo policlonal contra PCNA en una dilución 1:3000 y con un anticuerpo secundario policlonal acoplado a la peroxidasa en una dilución 1:1000 durante 2 horas por cada uno a temperatura ambiente. La detección de las proteínas que fueron identificadas con el anticuerpo contra PCNA fueron detectadas indirectamente por quimioluminiscencia.

RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos para la detección de PCNA en maíz (Sánchez *et al.*, 2002), en principio decidimos utilizar las mismas condiciones para lograr su detección en los extractos proteicos de *C. arabica*; 100 µg de los extractos proteicos totales fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% y posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas toda la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal contra PCNA en una relación 1:1500 y después con un anticuerpo policlonal acoplado a una peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente.

Como se puede observar en la figura 4.1 el anticuerpo contra PCNA de maíz detectó fuertemente una serie de proteínas de diferentes tamaños que varían entre 97 y 20 kDa. Sin embargo, de igual manera se puede observar en la figura que hay bandas de diferentes tamaños que presentan una mayor intensidad con respecto a las otras, los tamaños aproximados para estas proteínas son de 95, 55 y 35 kDa. No obstante, entre las de 35 y 38 kDa hay una con mayor señal, la cual corresponde al tamaño esperado para PCNA.

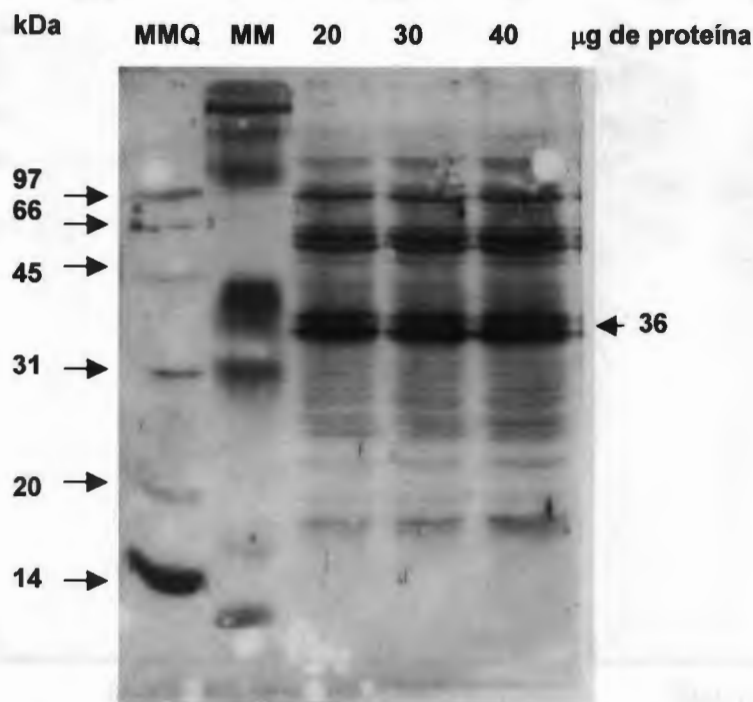


Figura 4.1 Detección de PCNA en los extractos celulares de *C. arabica* L. Las proteínas totales (20, 30 y 40 μ g) fueron separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%, posteriormente las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nylon, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 $^{\circ}$ C con un anticuerpo específico para PCNA de maíz en una dilución 1:1500. Posteriormente la inmunodetección se realizó con el kit comercial ECL Western blotting Analysis (Amershan) por medio de la reacción de la peroxidasa en una dilución 1:5000. Los números y las flechas de la izquierda muestran los pesos moleculares (MM) en kilo Daltones (kDa); MMQ; marcadores moleculares ECL.

Algunas de las modificaciones empleadas para lograr disminuir la detección inespecífica del anticuerpo contra PCNA fue reducir el tiempo y la temperatura de incubación del anticuerpo primario, de toda la noche a 4 $^{\circ}$ C a solamente 2 h a temperatura ambiente, así como también la dilución del anticuerpo primario de 1:1500 a una dilución de 1:3000. También cambiamos la dilución del anticuerpo secundario de una dilución 1:5000 a 1:10000. Como se puede observar en la figura 4.2 el anticuerpo cruzó con una banda de alrededor de 36-38 kDa que corresponde al tamaño esperado para PCNA.

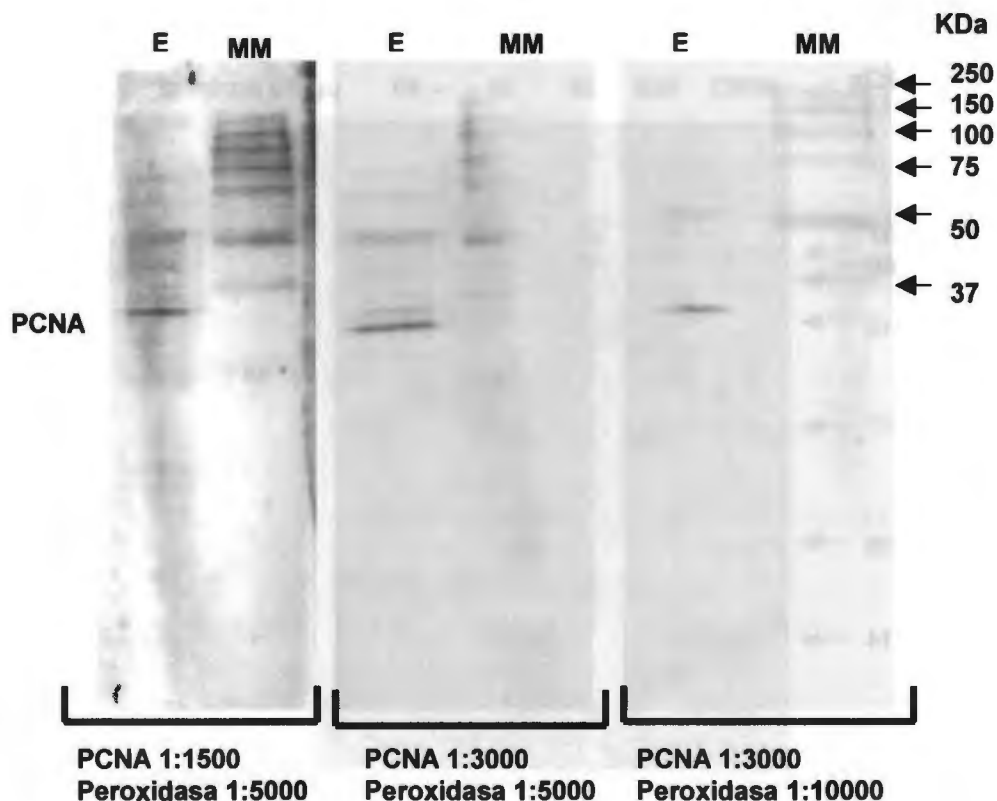


Figura 4.2 Detección de PCNA en los extractos celulares de *C. arabica* L. 100 μ g de los extractos totales (E) fueron separados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%, posteriormente las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nylon, las membranas fueron incubadas por 2 h con un anticuerpo específico para PCNA de maíz en dos diferentes diluciones (1:1500 y 1:3000), posteriormente la inmunodetección se realizó con el kit comercial ECL Western blotting Analysis (Amershan) por medio de la reacción de la peroxidasa en dos diferentes diluciones (1:5000 y 1:10000). Los números y las flechas de la derecha muestran los pesos moleculares (MM) en kilo Daltones (kDa), PCNA; antígeno nuclear de proliferación celular.

Una vez que determinamos las condiciones para detectar a PCNA en los extractos proteicos de *C. arabica*, lo siguiente fue realizar los tratamientos de las células con AlCl_3 . Los tratamientos con AlCl_3 se realizaron tomando células de 7 días de cultivo las cuales fueron tratadas con 100 μM de AlCl_3 a diferentes tiempos. Como se puede observar en la figura 4.3 el AlCl_3 no influyó sobre la abundancia de PCNA aún cuando las células fueron tratadas por 24 horas con 100 μM de AlCl_3 . Estos resultados

nos sugieren que PCNA no se ve afectada en cuanto a su cantidad cuando las células son tratadas con Al.

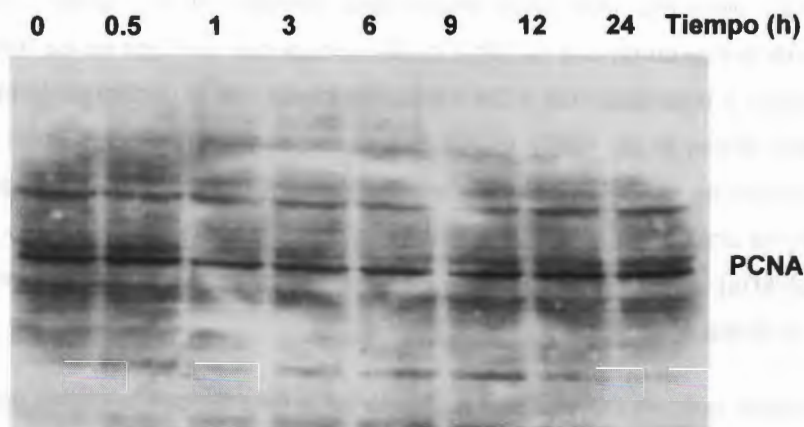


Figura 4.3 Efecto del AlCl₃ sobre la cantidad de la proteína PCNA. Células de 7 días de cultivo fueron tratadas o no con 100 μ M de AlCl₃ durante 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 h. 100 μ g de los extractos totales fueron separados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%, posteriormente las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nylon, las membranas fueron incubadas por 2 h con un anticuerpo específico para PCNA de maíz en una dilución 1:3000, posteriormente la inmunodetección se realizó con el kit comercial ECL Western blotting Analysis (Amershan) por medio de la reacción de la peroxidasa en una dilución 1:10000. PCNA, Antígeno nuclear de proliferación celular.

DISCUSIÓN

La actividad de la ADN polimerasa δ en organismos eucariontes depende de la presencia de la proteína PCNA, la cual es una proteína accesoria requerida para la síntesis del ADN cromosómico. PCNA fue originalmente identificada como un auto-antígeno en pacientes con lupus eritematoso (Miyachi *et al.*, 1978). Actualmente PCNA se reconoce como una proteína multifuncional que participa en los mecanismos de replicación y reparación del ADN y probablemente en el control de la fase G_1 del ciclo celular (Xiong *et al.*, 1992). PCNA es una de las proteínas que se han empleado como marcadores de la proliferación celular durante la embriogénesis somática de maíz y se ha observado que PCNA puede formar complejos de alto peso molecular (160 – 200 kDa), siendo el complejo de PCNA en su forma homotrimérica alrededor de 100 kDa (Herrera *et al.*, 2000).

En mamíferos, cuando PCNA se asocia durante la fase G_1 con la ciclina tipo D y una cdk4 (Xiong, *et al.*, 1992) el complejo tiene un tamaño aproximado de 170 kDa, no obstante cuando PCNA además tiene unido al inhibidor p21 presenta un tamaño aproximado de 190 kDa, debido probablemente a que la función de PCNA no está restringido a la replicación del DNA.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que PCNA se encuentra en los extractos proteicos totales de las células en suspensión de *C. arabica* L. y que el tamaño esperado para PCNA es entre 35-38 kDa (figura 4.2) como había sido identificado en maíz (Herrera *et al.*, 2000) . En cuanto al efecto provocado por el $AlCl_3$ sobre la cantidad de proteína presente de PCNA, nuestros resultados muestran que las cantidades se mantienen constantes cuando las células son tratadas con $100 \mu M$ de $AlCl_3$, lo que sugiere que la función PCNA en *C. arabica* al igual que en otras especies de plantas no está restringida a la replicación del ADN.

La asociación de PCNA con proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular aún no ha sido elucidado, aunque se especula que PCNA es secuestrada durante la fase G_1 por una ciclina tipo D para evitar la iniciación prematura de la replicación del ADN (Pagano *et al.*, 1994) así como también, se ha identificado a PCNA en los

procesos de la remodelación de la cromatina y el control de la transcripción (Kelman 1997).

BIBLIOGRAFÍA

Herrera I., M. P Sánchez, J. Molina, J. Plasencia and J. Vázquez-Ramos (2000) Proliferating cell nuclear antigen expresión in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle protein. *Physiologia Plantarum*. **110**: 127-134.

Kelman Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**: 629-640.

López-Villaseñor, S. Khan, J. Vázquez-Ramos and P. J. Hussey (1995) *Biochem. Biophys. Acta*. **1260**: 119-121.

López-Villaseñor., K. Safina, J. Vázquez-Ramos and J. H. Patrick (1997) The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is composed of two members that have similar expression programmer. *Biochem. Biophys. Acta*. **1353**: 1-6.

Miyachi K., M. J. Fritzler and E. M. Tan (1978) An auto-antibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol*. **121**: 2228-2234.

Naora H., H. Naora, A. E. Mirsky and V. G. Allfrey (1961) Magnesium and calcium in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiology*. **44**: 713-741.

Pagano M., A. M. Theodoras, S. W. Tam and G. F. Draetta (1994) Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblast. *Genes Dev*. **8**: 1627-1639.

Sánchez M. P., A. Torres., M. B. Boniotti., C. Gutierrez and J. Vázquez-Ramos (2002) PCNA protein associates to cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biology*. **50**: 167-175.

Shivji M. K. K., M. K. Kenny and R. D. Wood (1992) Proliferating-cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*. **69**: 367-374.

Tsurimoto T. and B. Stillman (1990) Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory protein from human cell and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1023-1027.

Vázquez E., F. Montiel and J. M. Vázquez-Ramos (1991) DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Sci. Res.* **1**: 269-273.

Xiong Y., H. Zhang and D. Beach (1992) D type cyclins associated with multiple protein kinase and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* **71**: 505-514.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

Durante las últimas dos décadas se ha realizado un progreso muy importante para entender los mecanismos moleculares de la proliferación celular, revelando que los componentes fundamentales que operan en el ciclo de la división celular son conservados o fundamentalmente similares en todos los organismos eucariontes. Sin embargo, estudios básicos de los procesos del desarrollo, acompañados de la secuenciación de los genomas han llevado a la opinión de que los patrones del desarrollo han evolucionado independientemente en plantas y animales (Meyerowitz, 2002).

La división celular requiere de un orden de procesos que pueden ser controlados de manera espacial y temporal. Durante la fase G₁ se lleva a cabo la integración de muchas señales antes de iniciar la duplicación del ADN, lo cual implica no solamente a la fase S sino que compromete a la célula a completar íntegramente el ciclo celular (Dewitte y Murray, 2002). Por lo que la decisión de una célula para dividirse, crecer, diferenciarse o morir depende de la percepción de una gran cantidad y variedad de señales externas que incluyen hormonas, nutrientes, luz, temperatura, factores abióticos y desde luego las condiciones internas de la célula.

En el presente trabajo, con el fin de demostrar el efecto del aluminio sobre la regulación del ciclo celular en células en suspensión de *C. arabica* L. se emplearon las técnicas de la incorporación metabólica de [³H] timidina, inmuno-blot y ensayos de cinasa como una aproximación para identificar y evaluar el efecto provocado por el Al³⁺ sobre diferentes componentes involucrados en la regulación del ciclo celular.

Muchos de los estudios realizados anteriormente sobre los efectos del Al^{3+} en plantas se han realizado en plántulas cultivadas en una solución de nutrimentos, en el suelo o en raíces cultivadas *in vitro*. Aunque la comparación de los efectos entre los cultivos de células en suspensión y plantas completas debe ser interpretada con mucho cuidado.

McQuattie y Schier (1990), reportaron que el Al^{3+} causaba una vacuolación prematura y una acumulación de materiales densos entre la pared celular y el plasmalema cuando las raíces de las plantas eran tratadas con $AlCl_3$. Así mismo, Clarkson (1965) concluyó, basado en estudios realizados con raíces de cebolla, que algunos de los mecanismos asociados con la división celular son altamente sensibles al Al^{3+} y que este efecto es ocasionado a los pocos minutos de exposición. Por otra parte Matsumoto *et al.*, (1977) sugirieron que la unión del Al^{3+} al ADN podría ser la causa potencial de la inhibición de la división celular. Los datos presentados en este trabajo son consistentes con otros trabajos realizados sobre los efectos inhibitorios del Al^{3+} en la síntesis del ADN. Por otra parte se observó un pequeño, pero consistente aumento en la síntesis de ADN durante los días del ciclo de cultivo (figura 2.2 y 2.3), mientras que los tratamientos con Al^{3+} en los días 6 y 7 causaron una inhibición hasta de un 50% en la síntesis de ADN durante las 12 y 24 horas de tratamiento (figura 2.3).

Las CDKs son las proteínas universales que participan en la regulación de las transiciones del ciclo celular y su actividad de cinasa es modulada por diferentes proteínas como las ciclinas, las CAKs, por cinasas WEE1 y por inhibidores del tipo kip (Gutiérrez *et al.*, 2002). Con respecto a la actividad de cinasa de la proteína cdc2a, logramos detectar su actividad en los precipitados obtenidos por afinidad empleando a la proteína p13 acoplada a la agarosa, detectando la actividad utilizando como sustrato a la histona H1. Como se puede observar en las figuras 3.1 y 3.2 la actividad de cinasa de la proteína cdc2a dependió de la concentración del extracto proteico total y de la [histona H1] utilizada. Con respecto al tiempo de incubación de la reacción del ensayo de cinasa como se puede observar en la figura 3.3, 10 minutos de incubación son suficientes para detectar la actividad de cinasa de la cdc2a. En *Arabidopsis* y alfalfa se ha sugerido que las CDK tipo A participan en las fases de transición G_1/S .

Ciertos compuestos químicos y factores abióticos pueden actuar como reguladores negativos de la división celular. Uno de los posibles mecanismos de los efectos provocados por diferentes tipos de estrés en la inducción de la expresión de CKIs. Como se ha demostrado en *Arabidopsis* que la aplicación exógena de ABA induce la expresión de un CKI del tipo p27^{Kip1} bloqueando la transición de la fase G₁/S (Wang *et al.*, 1998). Como se puede observar en la figura 3.5 el AlCl₃ ocasionó una inhibición de la actividad de cinasa de la proteína cdc2a cuando las células fueron tratadas con este metal. Lo que sugiere que esta proteína se encuentra involucrada en algún mecanismo de respuesta provocado por el Al, lo cual está relacionado de alguna manera con la división celular.

Estudios realizados en animales y en levaduras han sugerido que PCNA y una endonucleasa conocida como FEN-1 participan de manera importante no solamente en la replicación del ADN sino también en la reparación (Rumbaugh *et al.*, 1997). PCNA interactúa con las polimerasas δ y ϵ , p21 y algunos otros factores (Smith *et al.*, 1994; Warbrick *et al.*, 1994), por lo tanto PCNA pudiera ser una proteína clave en los mecanismos de replicación y reparación del ADN en combinación con FEN-1.

Recientemente mediante ensayos de inmunoprecipitación se ha demostrado que PCNA se asocia con una ciclina tipo D y con dos proteínas cinasas tipo CDK-A durante la germinación de las semillas de maíz y que esta asociación está regulada por fitohormonas (Herrera *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2002).

Como se puede observar en la figura 4.2, utilizando anticuerpos policlonales específicos contra PCNA en maíz logramos la detección de una banda de entre 35 y 38 kDa que es el tamaño esperado para PCNA. En cuanto al efecto provocado por el aluminio sobre la cantidad de la proteína de PCNA como se puede observar en la figura 4.3, el AlCl₃ no indujo cambios en la cantidad de la proteína aún cuando las células fueron tratadas con 100 μ M de AlCl₃ durante 24 horas.

Los resultados presentados en este trabajo, efectivamente validan la hipótesis de que la presencia del aluminio en el medio de cultivo provocó un efecto negativo sobre algunos de los componentes involucrados en la regulación de la división celular.

BIBLIOGRAFÍA

Dewitte W. and J. A. H. Murray (2002) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 1-30.

Gutiérrez C., E. Ramírez-Parra, M. Castellano and C. del Pozo (2002) G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opi. Plant Biol.* **5**: 480-486.

Herrera I., M. P Sánchez, J. Molina, J. Plasencia and J. Vázquez-Ramos (2000) Proliferating cell nuclear antigen expresión in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle protein. *Physiologia Plantarum.* **110**: 127-134.

Matsumoto H., S. Morimura and E. Takahashi (1977) Binding of aluminum to DNA of DNP in pea root nuclei. *Plant Cell Physiol.* **18**: 987-993.

McQuattie C J. and G. A. Schier (1990) Response of red spruce seedlings to aluminum toxicity in nutrient solution: alteration in root anatomy . *Can J. For. Res.* **20**: 1001-1011.

Meyerowitz E. M. (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**: 1482-1485.

Rumbaugh J. A., R. S. Murrante, S. Shi, R. Bambara and A (1997) Creation and removal of embedded ribonucleotides in chromosomal DNA during mammalian okazaki fragment proessing. *J. Biol. Chem.* **272**: 22591-22599.

Sánchez M. P., A. Torres., M. B. Boniotti., C. Gutierrez and J. Vázquez-Ramos (2002) PCNA protein associates to cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biology.* **50**: 167-175.

Smith M. L., I.T. Chen, Q. Zhang, I. Bae, C. Y. Chen, T. M. Gilmer, M. B. Kastan, P. M. O' Connor and A. J. Fornace (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**: 1376-1380.

Wang H., Q. Qi, P. Schorr, A. Cutler, WL. Crosby and LC. Fowke (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**: 501-510.

Warbrick E., D. P. Lane, D. M. Glover and L. S. Cox (1995) A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr. Biol.* **5**: 275-282.

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

En la actualidad, debido al incremento del conocimiento sobre la regulación del ciclo celular en sistemas vegetales, es primordial establecer los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la regulación de la división celular bajo diferentes condiciones de estrés y en particular del efecto del Al como un metal tóxico.

En el presente trabajo, hemos demostrado que el Al afecta alguna vía de transducción de señales involucradas en la regulación de la división celular como las proteínas cinasas dependientes de ciclinas. De igual manera se observó que el Al provocó una disminución en la síntesis de ADN. Ambos eventos involucrados en los procesos de crecimiento, división celular y de respuestas a condiciones ambientales. Nuestros resultados son la base para futuros trabajos cuyas perspectivas se enlistan a continuación.

1. Determinar si la proteína p13 precipita al complejo activo CDK/ciclina y que tipos de ciclinas. Para lograr esto se tendrán que realizar ensayos de Inmunodetección con los extractos precipitados utilizando anticuerpos contra las diferentes ciclinas reportadas.
2. Generar anticuerpos específicos para la proteína cdc2a en café. Para esto se expresará la proteína en algún sistema *in vitro* para la obtención de una proteína recombinante.
3. Determinar si el Al induce la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. Para esto se realizarán ensayos de northern-blot utilizando diferentes sondas reportadas para CKIs, CDKs y ciclinas.

