



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ENZIMA
FOSFOLIPASA C DE SUSPENSIONES CELULARES DE
Coffea arabica L.**

Tesis que presenta

FERNANDO GARCÍA GONZÁLEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ENZIMA FOSFOLIPASA C DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea arabica* L. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

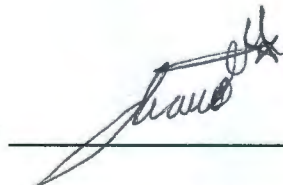
Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 22 de Junio de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: IBQ Fernando García González

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "El sistema de transducción de señales a través de fosfolípidos y las posibles repercusiones biotecnológicas en dos cultivos de interés comercial" (CONACYT, 98352) bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor.

AGRADECIMIENTOS

Dios, gracias por permitirme culminar otro logro en mi vida, por encontrarte en cada detalle, en cada paso que doy y hacerme sentir tu presencia.

¡Tere, simplemente no tengo palabras para poder agradecerte el cúmulo de atenciones, paciencia, apoyo y tu siempre preocupación por hacer en mí una diferencia, en verdad mil gracias por todo, por ser no solo mi tutora sino una persona de la cual me llevo un gran aprendizaje en todos los aspectos y una persona por demás admirable.

A mi comité revisor:

Dr. Enrique Castaño de la Serna, le agradezco enormemente el brindarme parte de su tiempo por saber guiarme y superar los tropiezos técnicos.

Dr. Ignacio Islas Flores, gracias por sus acertados comentarios y aportaciones que hicieron más enriquecedor este trabajo.

Dra. Karla Y. Acosta Viana, gracias por aceptar formar parte de este proyecto y apoyarme siempre que lo necesité.

Dr. Alejandro Blanco Labra, gracias por su apoyo total y sus palabras siempre atinadas y justo en el momento exacto

Gracias a cada uno de ustedes por la molestia de tomarse su tiempo para darme sus invaluable puntos de vista para enriquecer este trabajo.

Al M. en C. Armando Muñoz Sánchez, gracias por el apoyo técnico en la realización de este proyecto.

Dr. Arturo Reyes Ramírez, gracias por su apoyo y amistad.

El CY, gracias por facilitar mi formación en tus aulas y tus laboratorios.

UBBM, gracias a todo el personal que la integra: académicos, administrativos, estudiantes, intendencia, ya que cada uno aportó algo en el logro de este éxito.

Al CONACYT por el apoyo con la beca No. 236002 y al SNI por la beca 4422.

A las familias Andueza Noh, Camacho Pérez, Reyes Rodas y la nueva familia Andueza Camacho (Rubén y Luci y al fruto que viene), gracias por hacerme sentir como en casa, por darme un espacio en sus vidas.

En mi vida han llegado un sinnúmero de personas, de las cuales he aprendido algo que siempre atesoraré y en este logro quiero agradecerles el haberme dado la oportunidad de compartir los buenos y malos ratos, por tenderme su mano, sepan AMIGOS que a cada uno de ustedes les agradezco su apoyo, sus palabras de aliento y el estar conmigo a lo largo de este tiempo: Alma Fabiola Hernández Bernal, Marianne Luna Rivero, Nelly Sansores Santos, Marisol García Robles, Mildred Carrillo Pech, Gladys Santiago Antonio, Mayra Alejandra Díaz Brito, Yasmin Sánchez Rodríguez, M en C Ángela Ku González, Ricardo Gaumer, M. en C. Ernesto Palacios Medel y M en C Ricardo Kushym Huchym.

Flor María, Socorro, Alma y Elizabeth Silva Banda, Liliana López Yepes, Cristina A. González Palomino, Anareli Quintero Jiménez, Abraham Rangel Cárdenas, Antonio

Jamaica, Pablo Sergio Herrera Camacho, Martín López Carmona.

Gracias a mis estimados compañeros de laboratorio, por soportar mis locuras e irreverencias, que buen equipo!!!

Dr. Willberth Alfredo Poot Poot, por su apoyo técnico, paciencia y aporte de ideas en el desarrollo del trabajo.

M. en C. Teresita Arely Vela Catzin, por su amistad y consejos recibidos.

Q.I. Eduardo Rey Domínguez Domínguez, por sus comentarios y por ser compañero de irreverencias.

JBQ Georgina Arzápalo, gracias por formar parte del equipo de trabajo y brindarme tu amistad.

JBQ Yahaira Cab Guillén, la peque del laboratorio, por su valioso apoyo técnico y sus palabras de aliento.

Candidata a Dra. Beatriz Rodas Junco, gracias por el apoyo técnico y sobre todo por tu amistad y por jalarme las orejas en los momentos oportunos y por ser la mamá de los pollitos (de Lalo y mía).

Al personal administrativo de posgrado: Landy y Ale, gracias por la paciencia y hacer más fáciles los engorrosos trámites.

Gracias a todas y cada una de las personas que se han cruzado en mi camino, por recordarme que de todo ser humano se tiene algo que aprender, que más allá de lo material existen cosas con mayor valor a las que debemos darle realmente importancia.

“Busquemos a alguien con quien comer y beber antes de buscar algo que comer y beber, pues comer solo es llevar la vida de un león o un lobo”

Epicuro de Samos

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Remedios González Munguía y Aurelio García Obrajero

Aún en la distancia siempre están conmigo, lo cual jamás es obstáculo para hacerme sentir su amor, gracias por hacer de mí la persona que soy.

A mis hermanos:

Rosa, Lorenzo, Felisa, Esther, Manuel, Gerardo y Sol

Por tenderme la mano siempre, por su preocupación en mi formación y por ser fuente inagotable de apoyo.

A las personas que ahora forman parte también de mi familia:

Jaime, María, Alfredo, Francisco, Soledad, Estela e Inés

En quienes logré encontrar de igual manera un brazo en el cual apoyarme.

Y muy especialmente a los chiquitines y ya no tan chiquis de mis sobrinos que con su cálida sonrisa y abrazos me hacen sentir lo bello de la vida y han sido el motor que me ha impulsado para seguir y alcanzar mis objetivos, sobrinos a cada uno de ustedes los tengo conmigo siempre y sepan que los amo bastante y cuentan conmigo para todo y en todo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 Importancia del cafeto en el ámbito nacional.....	3
1.2 Caracteres botánicos.....	3
1.2.1 Floración.....	4
1.2.2 Especies y variedades.....	5
1.3 Señalización celular.....	6
1.4 Transducción de señales.....	6
1.5 Las fosfolipasas.....	7
1.6 La fosfolipasa C (PLC).....	8
1.7 Fosfoinosítidos y fosfoinositoles.....	9
1.8 La PLC en plantas.....	11
1.9 La PLC en <i>C. arabica</i> L.....	14
1.10 Efecto del estrés sobre la PLC.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	17

BIBLIOGRAFÍA.....	18
CAPÍTULO II.....	25
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1.1 Material vegetal.....	25
2.1.2 Tratamiento con NaCl y AlCl ₃	25
2.1.3 Obtención del extracto proteico.....	26
2.1.4 Cuantificación de la concentración de proteína.....	26
2.1.5 Determinación de la actividad enzimática de la PLC.....	26
2.1.6 Inmunodetección.....	27
2.1.7 Extracción del ARN total.....	27
2.1.8 Obtención del ADN complementario (ADNc) para la amplificación de los extremos terminales (RACE).....	28
2.1.9 Amplificación por PCR de los extremos terminales 3' y 5'.....	29
2.1.10 Purificación de los fragmentos obtenidos de la amplificación.....	29
2.1.11 Secuenciación.....	29
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
2.2.1 Extracción de proteínas.....	31
2.2.2 Perfiles electroforéticos.....	32
2.2.3 Inmunodetección.....	33
2.2.4 Efecto de diferentes tipos de estrés sobre la actividad y localización de la PLC...37	
2.2.4.1 Efecto del estrés por NaCl sobre la PLC.....	37

Índice

2.2.4.2 Efecto del estrés por $AlCl_3$ sobre la PLC.....	41
2.2.5 Obtención de los extremos terminales 3' y 5' del gen de la PLC.....	44
2.2.5.1 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y amplificación por PCR.....	45
2.2.5.2 Amplificación del extremo terminal 3' del gen de la PLC.....	46
2.2.5.3 Obtención del extremo terminal 5' del gen de la PLC.....	52
2.3 DISCUSIÓN.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	58
CAPÍTULO III.....	61
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	61
3.1 CONCLUSIONES.....	61
3.2 PERSPECTIVAS.....	61

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Planta de cafeto (<i>Coffea arabica</i> L).....	5
Figura 1.2 Sitios de acción de las fosfolipasas A ₁ , A ₂ , C y D.....	7
Figura 1.3 Representación de la secuencia de las PI-PLC de mamíferos y de plantas....	10
Figura 1.4 Hidrólisis de los fosfolípidos de inositol mediada por la enzima PLC.....	11
Figura 1.5 Estrategia experimental propuesta para la realización del presente trabajo de investigación.....	17
Figura 2.1 Sitio de hibridación de los iniciadores sobre el ADNc de la PLC de <i>Coffea arabica</i> diseñados en este estudio.....	30
Figura 2.2 Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen de la PLC mediante PCR.....	31
Figura 2.3 Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).....	32
Figura 2.4 Perfiles electroforéticos en geles SDS-PAGE al 12% de la proteína total de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	33
Figura 2.5 Inmunodetección de la PLC con el α -CaPLC δ en extractos proteicos de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> y cerebro bovino	34
Figura 2.6 Inmunodetección de la fosfolipasa C con α -CaPLC.....	35
Figura 2.7 Análisis de la unión inespecífica del suero preinmune a las proteínas del extracto total de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	36
Figura 2.8 Análisis de la unión inespecífica del anticuerpo secundario a las proteínas del extracto total de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	36
Figura 2.9 Determinación por inmunoblot con el suero α -CaPLC de la distribución de la enzima PLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	

Índice

tratados con NaCl.....	38
Figura 2.10 Actividad enzimática de la PLC en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L., bajo estrés por NaCl.....	39
Figura 2.11 Distribución de la enzima PLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> tratadas con manitol.....	40
Figura 2.12 Actividad enzimática de la PLC en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L., bajo estrés por manitol.....	41
Figura 2.13 Determinación por inmunoblot con el α -CaPLC de la distribución de la enzima PLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. tratados con AlCl ₃	42
Figura 2.14 Actividad enzimática de la PLC en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L., bajo estrés por AlCl ₃	43
Figura 2.15 Calidad de extracción de ARN.....	44
Figura 2.16 Electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio de la amplificación del fragmento correspondiente a la región catalítica de la PLC a partir de ANDc de suspensiones celulares de café con iniciadores FPLC926/RPLC926.....	45
Figura 2.17 Amplificación mediante RACE del extremo 3'.....	47
Figura 2.18 Amplificación del extremo 3' con iniciadores PLCF926 y 3' GenRacer primer.....	47
Figura 2.19 Amplificación a partir de ADNc del extremo 3' con los iniciadores PLCF281, PLCF926 y el oligo dT.....	49
Figura 2.20 Amplificación por PCR en gradiente a partir de ADNc del extremo 3' con los iniciadores PLCF281/oligo dT.....	49
Figura 2.21 Purificación de los fragmentos de 500 y 1000 pb.....	50

Figura 2.22 Hipótesis de cómo las vías de señalización fosfolípídicas son afectadas por el NaCl y el $AlCl_3$57

Índice

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Iniciadores de ADN específicos para PLC diseñados a partir de la secuencia correspondiente a la región catalítica de la PLC de café.....30

Cuadro 2.1 Comparación por BLASTX de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 500 pb en la base de datos de genes del NCBI.....51

Cuadro 2.2 Comparación por BLASTX de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 1000 pb en la base de datos de genes del NCBI51

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
α -CaPLC	Anticuerpo CaPLC
6-BAP	6-Bencil-aminopurina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
DOC	Deoxicolato de sodio
DAG	Diacil glicerol
DAGK	Diacilglicerol cinasa
DEPC	Dietilpirocarbonato
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosina trifosfato
IK	Inositol cinasa
IP	Inositol fosfatasa
IP ₂ , IP ₃ , IP ₄ , IP ₅ e IP ₆	Inositoles fosforilados
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP ₆	Inositol hexakisfosfato
kDa	KiloDaltones

Índice

LLAT	Lecitina aciltransferasa
MS	Murashige y Skoog
PA	Ácido fosfatídico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI-4-K	Fosfatidil inositol 4-cinasa
PI-5-K	Fosfatidil inositol 5-cinasa
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
PIP	Fosfatidil inositol 4-monofosfato
PI-PLC	Fosfolipasa C específica-fosfoinosítidos
PLC	Fosfolipasa C
PKC	Proteína cinasa C
RACE	Rapid Amplification of cDNA ends
RT-PCR	Transcripción reversa-PCR
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SP	Suero preinmune
TAC	Ácido tricloroacético

RESUMEN

La fosfolipasa C (PLC) es una enzima localizada en mamíferos, plantas y otros organismos. Esta enzima lleva a cabo la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato (PIP₂), localizado en las membranas celulares, produciendo dos compuestos: 1) el inositol 1,4,5-trifosfato o IP₃ que se une a receptores específicos localizados en organelos internos y estimula a los canales de calcio provocando la liberación y un aumento transitorio del calcio citosólico y 2) el diacilglicerol o DAG que puede activar a una proteína cinasa C o ser fosforilado a ácido fosfatídico por la acción de la DAGK. Estos compuestos *per se* actúan como segundos mensajeros, regulando procesos celulares, de ahí la importancia de estudiar esta enzima y de cómo puede regularse cuando es sometida a estrés salino y por metales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos tipos de estrés (salino y por metales) sobre la enzima PLC en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

Se logró identificar una proteína putativa de aproximadamente 67 kDa en diferentes extractos proteicos celulares utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce al sitio catalítico de la enzima; además se observó una relocalización de la proteína cuando las células se someten a diferentes tipos de estrés, así como cambios en la actividad de la enzima.

Experimentos de amplificación por RACE, de los extremos terminales 5' y 3' sobre el ADNc obtenido de células de café y combinaciones de iniciadores específicos para la PLC, diseñados sobre la secuencia del sitio catalítico de dicha enzima permitieron amplificar dos fragmentos, uno de 500 y otro de 1000 pb correspondiente a la amplificación del extremo 3', el fragmento de 500 pb tiene una identidad del 98% con la región catalítica; por el contrario el de 1000 pb no guarda relación con alguna de las PLC reportadas. Respecto a la amplificación del extremo 5' no se logró la amplificación de fragmentos.

ABSTRACT

Phospholipase C (PLC) is an enzyme found in mammals, plants and other organisms. This enzyme carries out the hydrolysis of phosphatidyl inositol 4,5 bisphosphate (PIP₂), located in cell membranes, producing two compounds: 1) inositol 1,4,5-triphosphate or IP₃ that binds to specific receptors and stimulates internal calcium channels leading to the release and a transient increase in the levels of cytosolic calcium and 2) diacylglycerol or DAG which can activate protein kinase C or can be phosphorylated to phosphatidic acid by a DAGK. These compounds act as second messengers, regulating cellular processes, hence the importance of studying this enzyme and how it can be regulated under different types of stress (salt or metals).

The purpose of this study was to evaluate the effect of two types of stress (salt and metals) on the enzyme PLC in cell suspensions of *Coffea arabica* L.

We identified a putative protein of approximately 67 kDa in different cell protein extracts using a polyclonal antibody that recognized the catalytic site of PLC. We observed a relocation of the protein when cells were subjected to the different types of stresses as well as changes in the enzymatic activity.

RACE-END amplification experiments were performed on the terminal ends 5' and 3' on the cDNA derived from cells of coffee and combinations of specific primers for PLC, designed on the sequence of the catalytic site of the enzyme allowed to amplify two fragments, one of 500 and another of 1000 bp corresponding to the amplification of the 3' end, the 500 bp fragment has a 98% identity with the catalytic region, on the contrary the 1000 bp unrelated to any of the PLC reported. Regarding the amplification of the 5' end did not achieve the amplification of fragments.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos responden a señales provenientes de su ambiente para poder sobrevivir y adaptarse a su entorno. En organismos multicelulares es necesaria la comunicación intercelular, un flujo continuo de información entre las células del organismo, tanto para coordinar y regular procesos de desarrollo, organización y el metabolismo de un gran número de células que conforman los diversos tejidos y órganos, así como para controlar el crecimiento y la diferenciación y responder a las señales químicas provenientes del medio ambiente.

Muchas de las señales extracelulares son transmitidas a través de la membrana plasmática por una variedad de mecanismos que usan moléculas como segundos mensajeros. Esto es, algunas moléculas extracelulares, como las hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y otros agonistas se unen a receptores específicos que se localizan en la superficie externa de la célula. La unión agonista-receptor inicia la producción de segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros, una vez formados, inducen reacciones intracelulares que regulan una serie de procesos, tales como el metabolismo, la secreción, el crecimiento celular, etc.

En plantas y animales las señales extracelulares controlan el crecimiento de muchos tejidos, gobiernan la síntesis y secreción de las proteínas y regulan la composición de los fluidos del organismo. Las células del organismo detectan lo que está sucediendo en el ambiente extracelular y mantienen la homeostasis y lo traducen en respuestas fisiológicas. Algunas señales inducen una modificación en la actividad de una o más enzimas presentes en las células, lo cual le permite a la célula responder de una manera rápida ante tales estímulos.

Uno de los mecanismos que utiliza la célula para transducir las señales extracelulares es el que involucra a la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual es una enzima que lleva a cabo la hidrólisis de PIP_2 , localizado en la parte interna de la membrana, produciendo dos compuestos: 1) el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) que se une a receptores específicos localizados en organelos internos y estimula a los canales de calcio provocando la liberación y un aumento transitorio del calcio citosólico y 2) el diacilglicerol o DAG que puede activar a una proteína cinasa C-(PKC) o ser fosforilado por la DAG cinasa para

INTRODUCCIÓN

formar ácido fosfatídico (PA). Los productos generados actúan como segundos mensajeros, regulando procesos de vital importancia para la célula.

En este trabajo se llevó a cabo un estudio sobre los mecanismos de regulación de la proteína PLC de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Importancia del cafeto en el ámbito nacional

El cafeto fue introducido al país en el año de 1790 y fueron Veracruz, Morelos, Michoacán y Oaxaca los primeros estados donde se conoció este producto. Actualmente los estados productores más importantes son Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla; también se cultiva en Guerrero, San Luis Potosí e Hidalgo, (FAO, 2010).

El cafeto es un producto tropical que se cultiva en las zonas montañosas y cerca de un 60% de los pequeños productores son indígenas. En México tenemos una producción promedio de 4 millones de sacos de café verde y ocupamos el sexto lugar en la producción mundial. En el país se produce hasta ahora, un 96% de *Coffea arabica* y un 4% de café robusta. El género *C. arabica*, tiene mayor valor en los mercados nacional e internacional.

En América Central, en 2010 la producción de México alcanzó las 273 000 toneladas (5 millones de sacos).

En los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca se concentra el 94% de la producción, el 85% del área sembrada y el 83% de los productores nacionales, (FAO, 2010).

1.2 Caracteres botánicos

El género *Coffea*, consta de 25 a 40 especies en Asia y África tropicales; pertenece a la tribu *Coffeoideae* de la familia *Rubiaceae*. Géneros relacionados con ella y de valor económico u ornamental incluyen la Quina, Ixora, Pavetta y Gardenia, siendo la primera la fuente para la obtención de quinina (Caramori *et al.*, 2002; Lin, 2008).

1.2.1 Floración

La floración de *C. arabica* es marcadamente estacional, efectuándose generalmente sólo en tiempo húmedo, pero la periodicidad puede ser distinta donde las condiciones

climáticas son relativamente estables en todo el año. La cantidad de flores producidas y su tamaño dependen de las relaciones de agua prevalecientes. Las condiciones extremadamente húmedas pueden ocasionar la formación de distintas flores estériles de color verdoso, las llamadas "flores-estrella". Las lluvias en la época de la polinización pueden reducir el cuaje de los frutos en forma considerable (Drinnan y Menzel, 1995; Caramori *et al.*, 2002).

Otras especies de cafeto son mucho menos estacionales en sus períodos de floración y también menos sensibles a las lluvias que evitan la polinización.

Las flores de *C. arabica* son polinizadas por el viento y otros agentes; hay aparentemente un elevado porcentaje de polinización entre las plantas adyacentes. Las variedades de *C. arabica* pueden cuajar el fruto con la autopolinización, mientras que las del grupo robusta no lo logran. Las flores del café liberiano se autopolinizan en el estado de botón, pero esto no evita que sean polinizadas de forma cruzada por el polen extraño y de germinación más rápida después de que las flores han abierto (Drinnan y Menzel, 1995).

El café presenta uno de los pocos casos de xenia, o sea, el efecto inmediato del polen en el endospermo como resultado de una doble fertilización en los géneros dicotiledóneos. El color del endospermo de las almendras de *C. arabica* es verde-azuloso, mientras que los de *C. liberica* es amarillo; los híbridos de estas dos especies muestran una mezcla de los dos colores, dependiendo la proporción de cual es el progenitor masculino. Por otra parte, los cruces, incluyendo *C. liberica* y *C. stenophylla*, no exhiben esta característica (Caramori *et al.*, 2002).

Las temperaturas óptimas para la floración oscilan entre los 28-33 °C en verano, potenciándose tanto el crecimiento vegetativo como el número de nudos florales. Cuando las temperaturas invernales oscilan entre los 18-23 °C se favorece el desarrollo posterior de la planta además de la sincronización de la floración para desarrollar el máximo número de inflorescencias por nudo (Drinnan y Menzel, 1995; Figura 1.1).



Figura 1.1 Planta de cafeto (*Coffea arabica* L.), donde se muestran sus flores en forma de estrella y frutos en drupa. (www.atinachile.cl).

1.2.2 Especies y variedades

Gran parte de la caracterización del género *Coffea* surge del hecho de que el cafeto, como los cítricos y otros cultivos frutales, son sumamente polimórficos. Numerosos tipos y variedades son nativos de África y Asia tropicales, otras existen en plantaciones cultivadas. Las mutaciones son frecuentes, tal como las adaptaciones ecotípicas inducidas por las variaciones en las condiciones del medio ambiente. La mayoría de las especies hibridan fácilmente, ya sea en forma silvestre o bajo cultivo. Hay cuatro especies o grupos principales, que se cultivan ampliamente y constituyen el café que se comercializa: café arábigo (*C. arabica* L.), café robusta (*C. canephora* Pierre ex Froehner), café liberiano (*C. liberica* Mull ex Hiern) y café excelso (*C. excelsa* A. Chev.); además, existe una gran cantidad de otras especies llamadas económicas, que se cultivan a escala

local y normalmente no entran a los canales comerciales (Caramori *et al.*, 2002; Lin, 2008).

1.3 Señalización celular

En la membrana celular, compuesta principalmente de fosfolípidos que son los que constituyen la bicapa lipídica, residen una gran cantidad de proteínas, que cumplen diversas funciones en procesos vitales como la transducción de señales, tráfico membranal y la estructura del citoesqueleto. Los fosfolípidos pueden ser sustrato para algunas enzimas localizadas en la membrana y que se relacionan con la transducción de señales (Cowan, 2006). En las interacciones de la célula con su medio y que se realiza a través de receptores en la membrana, destaca la zona ocludens (uniones estrechas), la zona adherens (proteínas de adhesión como cadherinas, selectinas, integrinas) y los desmosomas (puentes intercelulares). Además existe un intercambio continuo de mediadores con células vecinas y a distancia (Lodish *et al.*, 1995).

Los receptores de membrana pueden corresponder a la familia que tienen actividad de cinasa, que principalmente responden ante factores de crecimiento, hormonas, citocinas y neurotransmisores. Otra familia de receptores son los que están acoplados a las proteínas G heterotriméricas (Wohllk, 2003; Lodish *et al.*, 1995).

La activación de los receptores de membrana en la mayoría de los casos están acoplados a sistemas que generan segundos mensajeros, los cuales constituyen la forma en la que una señal de membrana produce un efecto específico a nivel celular (Cooper, 1997; Wohllk, 2003).

1.4 Transducción de señales

Las plantas como todo ser vivo, necesitan responder ante los estímulos de su entorno, al percibir una señal proveniente del exterior se desencadena una serie de reacciones intracelulares en donde intervienen una gran cantidad de proteínas y enzimas que regulan a otras proteínas para poder responder ante tal señal. En la membrana se localizan proteínas encargadas de percibir y transducir las señales extracelulares. Dicha transducción involucra que las proteínas sufran diferentes modificaciones, tales como fosforilaciones o defosforilaciones; eventos que regulan las actividades enzimáticas y la

conformación final de la proteína. El resultado eventual es una alteración en la actividad celular y cambio en el programa de expresión de los genes en las células (Janmey, 1998; Meijer y Munnik, 2003).

1.5 Las fosfolipasas

En la membrana plasmática o asociadas a ésta, existen una serie de enzimas con capacidad de fosfodiesterasas, comúnmente conocidas como fosfolipasas, las cuales pueden ser reguladas por señales extracelulares. Los sustratos comunes para este tipo de enzimas son los fosfolípidos. De acuerdo a los sitios de hidrólisis de los fosfolípidos, las fosfolipasas se clasifican en fosfolipasas A₁, A₂, C y D (Figura 1.2; Wang, 2004).

Los productos de estas fosfolipasas se llaman lisofosfolípidos y pueden ser sustratos para las acil-transferasas que utilizan diferentes grupos acil-CoA. Los lisofosfolípidos también pueden aceptar grupos acilo de otros fosfolípidos en una reacción de intercambio catalizada por la lisolecitina: lecitina aciltransferasa (LLAT).

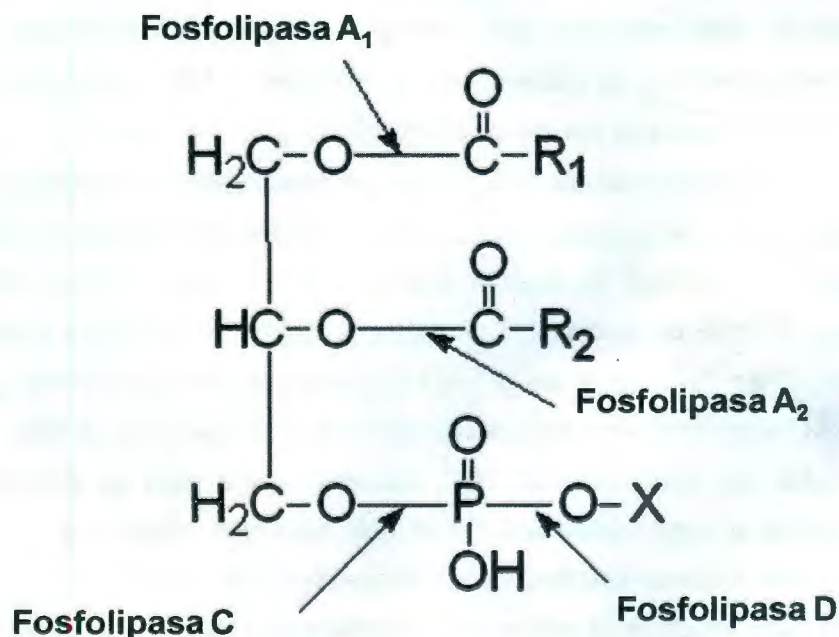


Figura 1.2 Sitios de acción de las fosfolipasas A₁, A₂, C y D (Wang, 2004).

1.6 La fosfolipasa C (PLC)

Todas las PLC de mamíferos presentan cinco dominios conservados: un dominio de homología a pleckstrina (PH) en la región N-terminal que permite establecer la interacción de la proteína con fosfolípidos de la membrana; un dominio factor de elongación (EF)-Hand útil en el enlazamiento a calcio; un dominio X y otro Y, que constituyen el dominio catalítico de la enzima; y un dominio C2 de unión a calcio en la región C-terminal (Figura 1.3); cabe señalar que la PI-PLC ζ no posee el dominio PH (Pan *et al.*, 2005; Nakahara *et al.*, 2005), debido a estas características se le considera similar a la de plantas, en donde se ha visto que en su estructura tampoco posee este dominio, así como la carencia de la región amino N-terminal en el dominio EF.

La enzima PLC ha sido encontrada tanto en células animales como en células vegetales. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos y mecanismo de activación, en mamíferos se han reportado 14 isoenzimas de la PI-PLC, las cuales se clasifican como: β (1-4), γ (1 y 2), δ (1-4), ϵ (1), ζ (1) y η (1 y 2), (Figura 1.3). Esta familia de enzimas son reguladas de diferente manera, a continuación se describen algunos de estos mecanismos.

PLC- β . Las isoenzimas de la familia β son reguladas por unión a proteínas GTP heterotriméricas. Son activadas por una gran variedad de estímulos y requieren combinaciones especiales de subunidades de proteínas G, tales como la subunidad α se une al complejo $\beta\gamma$ para ejercer su efecto catalítico (Rhee, 2001).

PLC- γ . Su forma de regulación se lleva a cabo por fosforilación en residuos de tirosina, se ha visto que pueden ser activadas en respuesta a factores de crecimiento que se enlazan a receptores con actividad de cinasas de tirosina, tales como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas. La PLC- γ contiene también los dominios SH2 y SH3 que le sirven para que se puede unir a proteínas que contienen sitios fosforilados en tirosinas y regiones similares a src (Poulin *et al.*, 2005).

PLC- δ . Todas las isoenzimas de PLC requieren calcio para su actividad, pero las correspondientes a esta familia son de las más sensibles, sugiriendo que su actividad está regulada por la concentración de Ca^{2+} intracelular (Allen *et al.*, 1997).

PLC- ϵ . Esta clase de enzimas poseen dos dominios que no se han encontrado en otras isoenzimas de PLC, tales como el dominio RA localizado en la región C-terminal que media la interacción dependiente de GTP con Ras, varios ligandos de receptores

acoplados a proteínas G (GPCRs)-G α_6 , tales como los receptores para la adrenalina y la prostaglandina E₁. Las PLC- ϵ pueden además ser reguladas por factores de crecimiento endotelial y derivado de las plaquetas (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002).

PLC- ζ . La regulación de la activación catalítica de estas isoenzimas es similar a la de las PLC- δ , es decir, responden a la concentración de Ca²⁺ intracelular.

PLC- η . Las isoenzimas correspondientes a esta familia de PLC son reguladas por estímulos con receptores acoplados a proteínas G, el papel de esta familia de enzimas no se conoce a detalle (Pann *et al.*, 2008).

1.7 Fosfoinosítidos y fosfoinositoles

Los fosfoinosítidos son fosfolípidos que contienen un grupo inositol o inositol fosfato como grupo polar. El fosfatidilinositol es el más simple de los fosfoinosítidos. Los principales fosfoinosítidos con grupos fosfato en el anillo de inositol son el fosfatidilinositol 4-monofosfato (PIP) y el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

La hidrólisis de fosfolípidos de inositol por acción de la fosfolipasa C (PLC) involucra un mecanismo de transducción de señales ubicuo que medía respuestas celulares producidas por cambios en el medio ambiente externo (Figura 1.4).

En células animales, la PLC realiza la hidrólisis del PIP₂, localizado en la parte interna de la membrana plasmática y convirtiendo a éste en una molécula soluble en agua, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y en un componente que por su naturaleza lipídica permanece asociado a la membrana el diacilglicerol (DAG). Ambos compuestos *per se* actúan como segundos mensajeros, afectando numerosas reacciones celulares (Rhee *et al.*, 1991). La principal función del IP₃ es movilizar calcio de almacenes internos no mitocondriales y quizá también estimular indirectamente la entrada de calcio a la célula con ayuda de otro metabolito fosforilado, el inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato. El IP₃ se une a receptores específicos localizados en organelos internos y estimula a los canales de calcio provocando la liberación y un aumento transitorio del calcio citosólico. El IP₃ puede ser fosforilado por una serie de inositol cinasas formando diferentes compuestos a los cuales también se les ha dado funciones celulares (Munnik y Testerink, 2009).

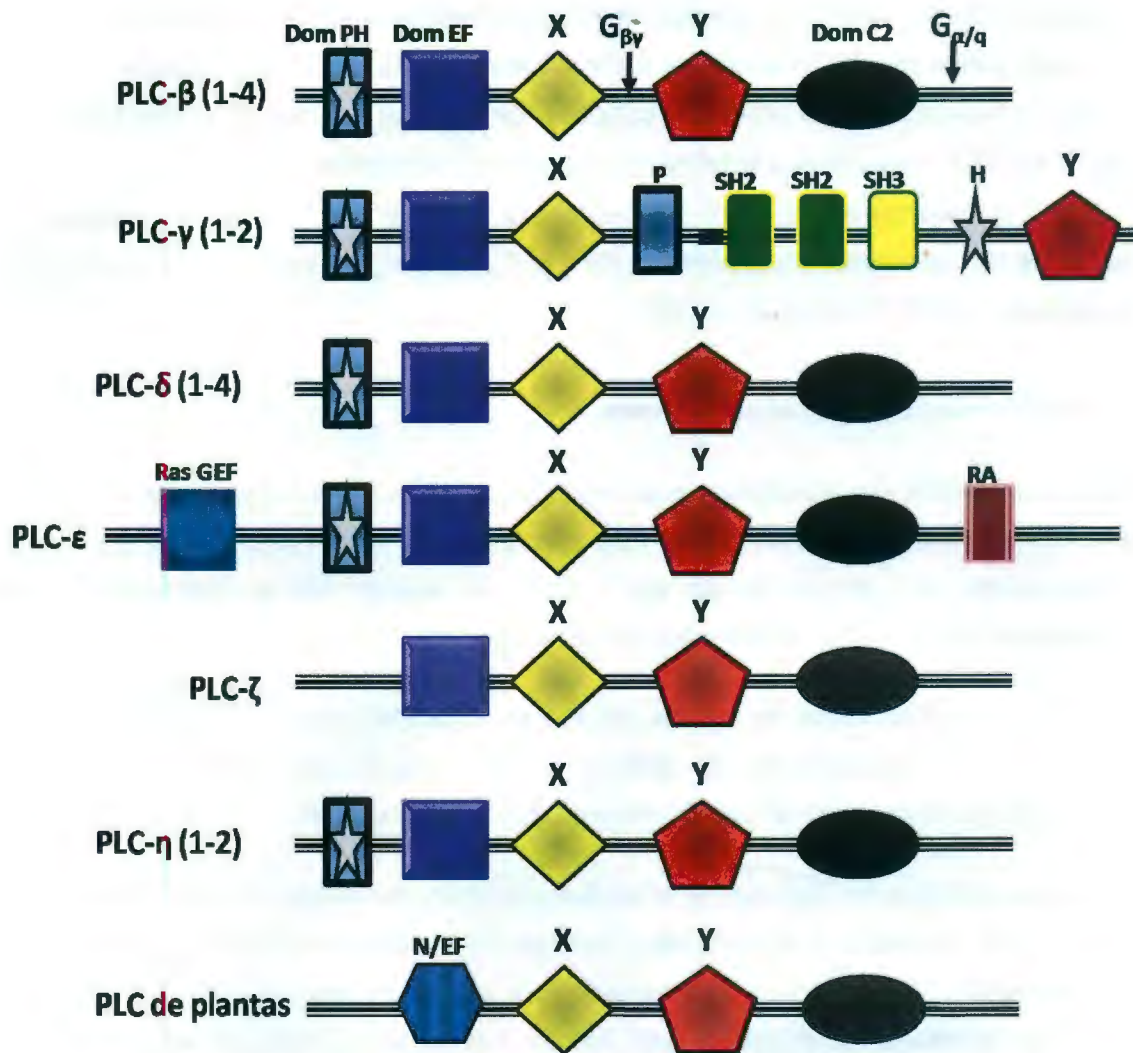


Figura 1.3 Representación de la secuencia de las PI-PLC de mamíferos y de plantas. PH, dominio de homología a pleckstrina; EF, dominio de interacción con calcio; X y Y, dominios correspondientes al sitio catalítico; C2 dominio de unión a calcio y los dominios SH2 y SH3 para unirse a proteínas que contienen sitios fosforilados en tirosinas y regiones similares a src. Modificado de Nakahara *et al.*, 2005 y Pann *et al.*, 2008.

El DAG por su parte, puede activar a una clase de proteínas cinasas conocidas como proteínas cinasas C (PKC). Estas proteínas cinasas son dependientes de diacilglicéridos

y calcio originando fosforilaciones de un amplio rango de proteínas. Además el DAG puede ser fosforilado por una diacilglicerolcinaasa (DAGK) para producir ácido fosfatídico (PA), el cual actúa como segundo mensajero en plantas; esta ruta se activa ante el estímulo de diferentes tipo de estrés biótico (patógenos) y abióticos (temperatura, salinidad, sequía, etc.).

El PA puede ser también generado a partir de la hidrólisis de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina vía acción de la fosfolipasa D (PLD) (Munnik y Testerink, 2009).

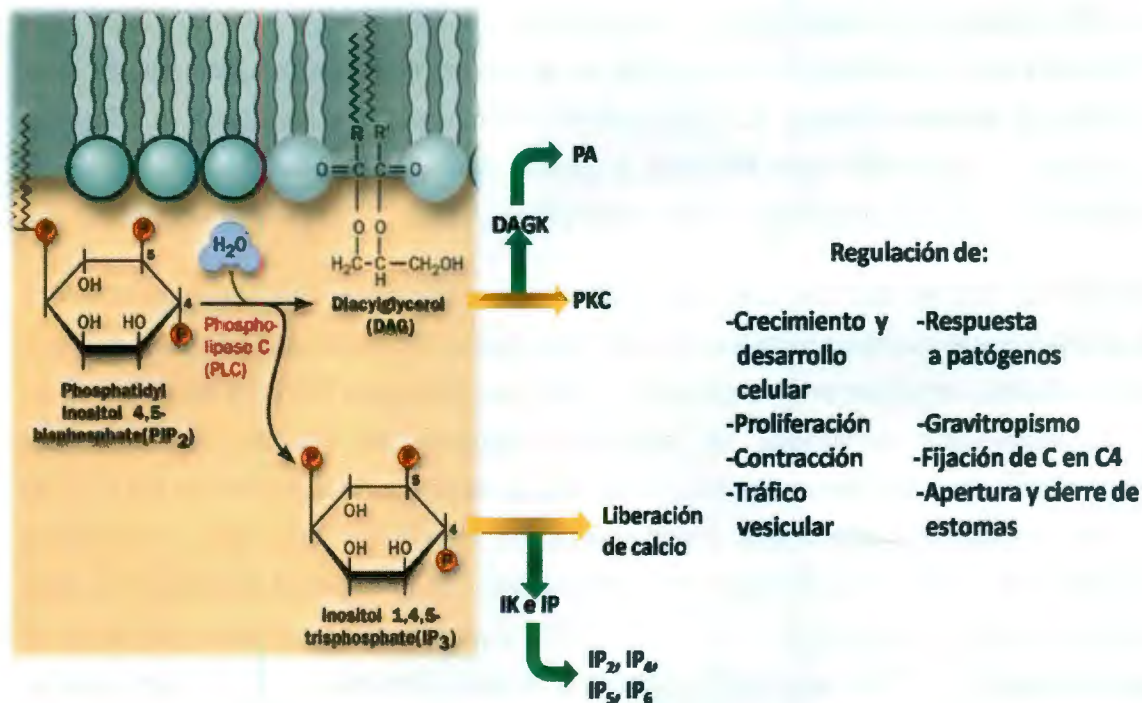


Figura 1.4 Hidrólisis de los fosfolípidos de inositol mediada por la enzima PLC. DAGK: Diacil glicerol cinaasa, PKC: Proteína cinaasa C, PA: Ácido fosfatídico, IK: Inositol cinaasa, IP: Inositol fosfatasa, IP₂, IP₃, IP₄, IP₅ e IP₆: inositoles fosforilados (Munnik y Testerink, 2009).

1.8 La PLC en plantas

Las PI-PLCs de plantas parecen corresponder a una sola familia de genes, la cual es muy similar a la subfamilia de la PI-PLCζ de mamíferos, ya que todas las PLCs encontradas en

plantas no poseen el dominio PH o presentan ausencia del amino terminal de este dominio (Pan *et al.*, 2005).

Las fosfolipasas C se han clasificado de acuerdo a sus sustratos. Las PI-PLC, las cuales hidrolizan fosfolípidos (Wang, 2001), a su vez han sido clasificadas en dos tipos: Las de tipo I que son aquellas que se encuentran principalmente en el citosol de la célula, poseen mayor afinidad por el PI, y requieren concentraciones milimolares de Ca^{2+} para su actividad. Las de tipo II se localizan mayormente asociadas a la membrana y para su actividad requieren concentraciones micromolares de Ca^{2+} (Gross y Boss, 1993). Otra fosfolipasa que se clasifica por su sustrato, es la que hidroliza a la fosfatidilcolina u otros fosfolípidos, también llamada PLC no específica. Finalmente se encuentra la GPI-PLC, fosfolipasa C específica que hidroliza el grupo glicosilfosfatidilinositol incluido en la estructura de algunas proteínas membranales (Wang, 2001).

Las PI-PLC son las que han sido más ampliamente estudiadas. Los genes encontrados en plantas y que codifican para las PLC son homólogos a los que codifican para la PLC ζ de mamíferos y codifican productos que muestran hidrólisis para PIP₂. La actividad de las PLC parcialmente purificadas de diferentes especies de plantas, muestran una dependencia de calcio para su actividad. Se puede decir que la actividad de las PLC de plantas estudiadas hasta ahora, predomina en la membrana plasmática (Testerink y Munnik 2005). También se ha encontrado actividad PLC en fracciones citosólicas de apio, coliflor, y narciso (Irvine *et al.*, 1980). En maíz, a partir de una biblioteca de ADNc se logró la identificación de una PI-PLC (ZmPLC), el gen correspondiente codifica para un péptido de 586 aminoácidos y se observó que su expresión bajo condiciones de salinidad, frío, sequía y osmóticas resulta afectada (Zhai *et al.*, 2005). En chícharo de igual manera, se reportó la caracterización de un ADNc que codifica para una PLC δ (PsPLC), en donde se pudo observar que la secuencia en aminoácidos posee de un 75-80% de identidad con otras PLC de plantas (Venkataraman *et al.*, 2004).

En soya se encontró un gen que codifica para una proteína de 68.8 kDa correspondiente a una PI-PLC que se encuentra en citosol y membrana plasmática (Shi *et al.*, 1995), por otra parte en estudios diferentes haciendo uso de una biblioteca de ADNc de chícharo se lograron detectar tres ADNc y se determinó que codifican para proteínas con una alta similitud a la PI-PLC. En apio se reportó una enzima asociada a membrana y una enzima

soluble, mientras que la enzima soluble hidroliza únicamente fosfatidilinositol monofosfato (PIP) la enzima asociada a la membrana hidroliza también PIP₂ a un pH neutro y en una manera dependiente de calcio (Mc Murray e Irvine, 1988). En algas verdes (*Dunaliella salina*), la existencia de una PLC estuvo enriquecida en una fracción correspondiente a la membrana plasmática y fue estimulada por calcio y guanosina trifosfato (GTP) (Einspahr *et al.*, 1989).

En trigo, la fracción correspondiente a la membrana plasmática demostró tener una elevada actividad de la PLC usando como sustrato PIP₂ y PIP, presentando una mayor actividad en brotes de raíces (Melin *et al.*, 1992).

En las raíces de avena se encontraron al menos cuatro variantes de la PLC, dos citosólicas y dos asociadas a membranas (Huang *et al.*, 1995). En papa se ha logrado clonar tres isoformas de PLC: StPLC1, StPLC2 y StPLC3; estos genes se expresan diferencialmente en hojas, flores, tubérculos y raíces; cada gen se encuentra afectado de una manera específica por el estrés hídrico, estas secuencias se encuentran relacionadas con la familia PLC- δ de mamíferos (Kopka *et al.*, 1998).

Se ha encontrado actividad de PLC en raíces transformadas de *Catharanthus roseus* midiendo la formación de IP₃ (Piña-Chablé y Hernández-Sotomayor, 2001), esta actividad es específica para PIP₂ y es dependiente de Ca²⁺. También se ha determinado el efecto de inhibidores (Piña-Chablé *et al.*, 1998) y estimuladores de la actividad de la PLC en raíces de *C. roseus*, tales como las poliaminas. Los resultados encontrados mostraron que la putrescina no modifica la actividad de la PLC, la espermidina inhibe esta enzima por debajo del 40% y la espermina incrementa la actividad hasta cuatro veces más a concentraciones fisiológicas (Echevarria-Machado *et al.*, 2002; Echevarria-Machado, 2003).

Se ha reportado que el genoma de *Arabidopsis* contiene 9 genes con homología a la PI-PLC de los cuales dos codifican para isoformas inactivas (PLC8 y PLC9). De los 7 genes restantes solo dos se han caracterizado, la PLC1 y la PLC2. Se reportó que las PLC1, PLC2, PLC3, PLC4 y PLC5 difieren de acuerdo a su sensibilidad por calcio y que la PLC7 no codifica para una proteína funcional. Estos genes de la PLC de *A. thaliana* se expresaron en diferentes órganos de la planta (Hunt *et al.*, 2004).

Analizando los nueve genes de las diferentes PLC presentes en *A. thaliana* se observó que se expresaban de manera diferencial dependiendo del estímulo que se le aplicaba a la planta, ya sea salinidad, nutrientes, frío, deshidratación o tratamiento con ácido abscísico; dicho comportamiento ocurría en los diferentes órganos de la planta (tallos, flores y raíces); (Tasma *et al.*, 2008).

En estudios realizados con la PLC4 de *A. thaliana* se observó que la actividad catalítica es preferentemente para la fosfatidilcolina (PC) y su máxima actividad hidrolítica es alcanzada a concentraciones milimolares de Ca^{2+} (Nakamura *et al.*, 2005).

1.9 La PLC en *C. arabica* L.

Utilizando como modelo suspensiones celulares de *C. arabica*, se han realizado estudios fisiológicos, moleculares y bioquímicos respecto a la enzima PLC. Sánchez-Cach y colaboradores (2008) obtuvieron el ADNc que codifica para la región correspondiente al sitio catalítico de la PLC, el cual fue aislado de células en suspensión de *C. arabica*. Este ADNc (designado CaPLC) codifica para un polipéptido de 308 aminoácidos, conteniendo el dominio catalítico X y Y el cual tiene un 99 % de similitud con la misma región del gen de la PLC de soya. La proteína recombinante CaPLC fue expresada en *E. coli* y purificada, el polipéptido purificado se utilizó para producir un anticuerpo policlonal (anti-CaPLC). El péptido posee una masa molecular de 27 kDa en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE por sus siglas en inglés).

1.10 Efecto del estrés sobre la PLC

Ha sido reportado ampliamente que las PI-PLCs de plantas están involucradas en la señalización de diversos estímulos. Por lo cual es de suponer que las PI-PLC identificadas en plantas, al igual que en animales presentan funciones importantes. Las PI-PLC están involucradas en respuestas relacionadas a una gran variedad de estímulos, incluyendo estrés ambiental (Legendre *et al.*, 1993), gravedad (Perera *et al.*, 1999), ataque por patógenos (Stevenson *et al.*, 2000), polinización (Wang, 2001), estrés por aluminio (Martínez-Estévez *et al.*, 2003), en la vía de señalización mediada por ácido abscísico (Lee *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2004; Sánchez y Chua, 2001) y la muerte celular mediada por aluminio (Yakimova *et al.*, 2007).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio respecto a como el aluminio afecta el crecimiento del cafeto y en base a que la actividad de la PLC se encuentra involucrada en procesos de desarrollo celular, se han realizado investigaciones de selección para encontrar líneas tolerantes al efecto del aluminio sobre este cultivo. Como resultado de los trabajos se logró obtener una línea de suspensiones celulares tolerante a este elemento (Martínez-Estévez *et al.*, 2001; 2003). También se ha detectado la actividad enzimática de la PLC en líneas de suspensiones celulares sensibles y tolerantes al aluminio; y se ha caracterizado el efecto que este elemento provoca sobre la actividad de la PLC (Martínez-Estévez *et al.*, 2003). Se ha encontrado que hay una interacción entre la cantidad de las lípido cinasas que se encargan de sintetizar los fosfoinosítidos sobre los cuales actúa la PLC. Las células expuestas al aluminio incrementaron la actividad de la PLC dos veces más. Además, las actividades enzimáticas de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI-4-K), la fosfatidilinositol fosfato 5-cinasa (PIP-5-K) y la DAGK aumentaron cuando las células eran expuestas a la presencia de este metal (Martínez-Estévez *et al.*, 2003).

Es por eso que surge el interés de conocer que es lo que pasa con la PLC cuando las células son sometidas a estrés salino o por metales.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al entendimiento de algunos de los mecanismos de regulación de la enzima fosfolipasa C (PLC) de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. cuando son sometidas a estrés por NaCl y AlCl₃.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Localizar celularmente a la enzima PLC bajo condiciones de estrés.

Analizar el comportamiento catalítico de la enzima PLC en suspensiones celulares bajo condiciones de estrés con NaCl y AlCl₃.

JUSTIFICACIÓN

En base a estos antecedentes y a los resultados obtenidos por otros investigadores y en el grupo de trabajo de la Dra. Hernández-Sotomayor y para lograr entender algunos de los mecanismos de regulación de la actividad de la PLC. Se utilizará la estrategia de la amplificación de los extremos terminales (RACE) partiendo de la región catalítica que se tiene, para que por medio de la amplificación de los extremos 5' y 3' obtener la secuencia completa de nucleótidos y posteriormente mediante la traducción *in silico* obtener la secuencia completa de aminoácidos de esta proteína, teniendo esto se diseñarán anticuerpos específicos para diferentes regiones de la proteína y de esta manera aplicar las herramientas, tales como inmunodetección e inmunolocalización para profundizar en el entendimiento de cómo esta proteína se encuentra relacionada o involucrada dentro de los mecanismos de transducción de señales en la célula. Finalmente lograr entender algunos de los mecanismos de regulación de esta enzima clave en procesos celulares vitales en situaciones de estrés.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

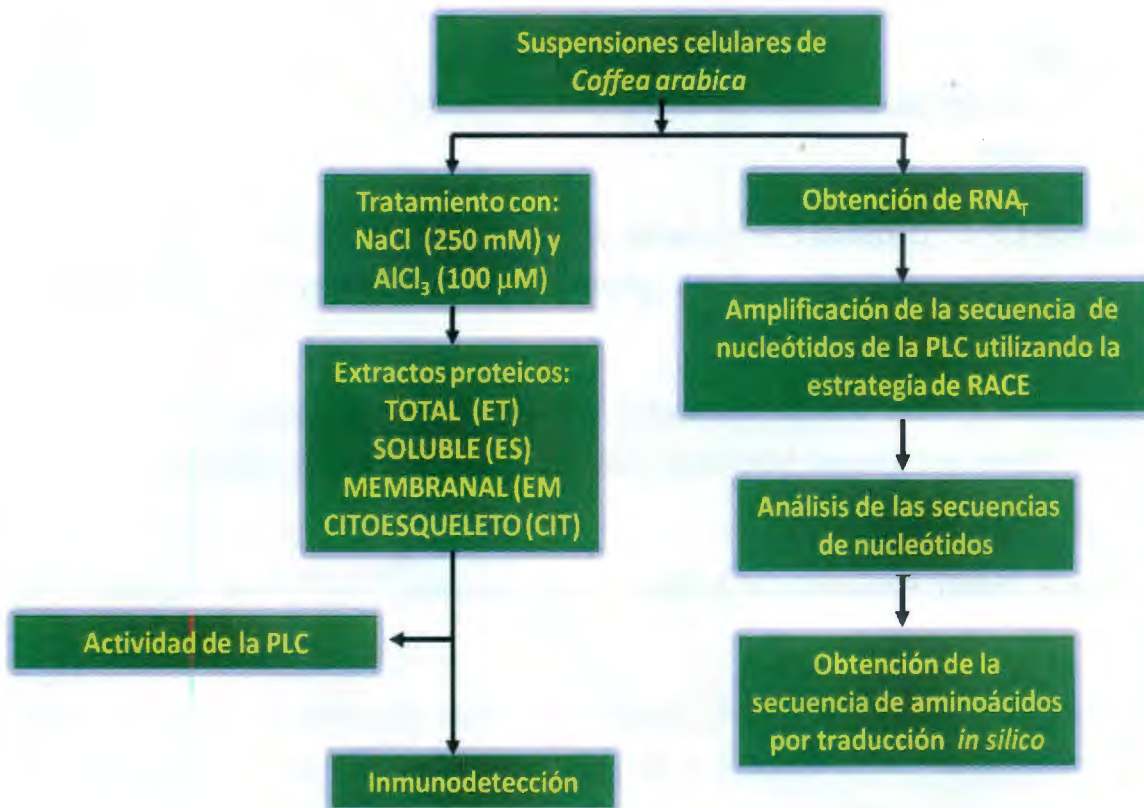


Figura 1.5 Estrategia experimental propuesta para la realización del presente trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen V., Swigart P., Cheung R., Cockcroft S. y Katan M. (1997). Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C α by changes in Ca^{2+} ion concentrations. *Biochemical Journal*, 327: 545-552.
- AtinaChile (13/04/2010). Planta de café.
URL:http://www.atinachile.cl/content/view40199/EI_cafe_como_fuente_de_placer.html
- Caramori L.P.C., Caramori P.H. y Manetti J. (2002). Effect of leaf water potential on cold tolerance of *Coffea arabica* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45: 439-443.
- Cooper G.M. (1997). *The Cell: Molecular Approach*. American Society for Microbiology. Press and Sinauer Associates. Fourth Edition. Washington, Distrito de Columbia, pp 45-66.
- Cowan A. (2006). Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 48: 97-109.
- Drinnan J.E. y Menzel C.M. (1995). Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticultural Science*, 70: 25-34.
- Echevarria-Machado I. (2003). Función de las poliaminas en el proceso de crecimiento vegetal. Posibles mecanismos de transducción de señales involucrados. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México, pp 37-43.
- Echevarria-Machado I., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2002). Spermine stimulation of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed root. *Journal of Plant Physiology*, 159: 1179-1188.
- Einspahr K.J., Peeler T.C. y Thomson A. (1989). Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate phospholipase C and phosphomonoesterase in *Dunaliella salina* membranes.

Plant Physiology, 90: 1115-1120.

Evellin S., Nolte J., Tysack K., Vom Dorp F., Thiel M., Weernink P.A., Jakobs K.H., Webb E.J., Lomasney J.W. y Schmidt M. (2002). Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 16805-16813.

FAO, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Accesado 19/05/2010. <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0v.htm>. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas, proyecciones al año 2010.

Gray J.E., Hunt L., Otterhang L., Lee J.C., Lasheen T., Hunt J., Seki M., Shinozaki K., Sommarin M., Gilmour D.J. y Pical C. (2004). Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms. *New Phytologist*, 164: 643-654.

Gross W. y Boss W.F. (1993). Inositol phospholipids and signal transduction. In control on plant gene expression (Desh Pal S. Verma., Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 17-32.

Huang C.H., Tate B.F., Crain R.C. y Coté G.G. (1995). Multiple phosphoinositide-specific phospholipase C in oat roots: characterization and partial purification. *Plant Journal*, 8: 257-267.

Hunt L., Otterhang L., Lee J.C., Lasheen T., Hunt J., Seki M., Shinozaki K., Sommarin M., Gilmour D.J., Pical C. y Gray J.E. (2004). Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms. *New Phytologist*, 164: 643-654.

Irvine R.F., Letcher A.J. y Dawson R.M.C. (1980). Phosphatidylinositol phosphodiesterase in higher plants. *Biochemistry Journal*, 192: 279-283.

Janmey P. (1998). The cytoskeleton and cell signalling component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews*, 78: 763-781.

Kopka J., Pical C., Gray J.E. y Muller-Robert B. (1998). Molecular and enzymatic

-
- characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiology*, 116: 239-250.
- Lee H., Mills L.N., Pical C., Leckie C.P., Aitken F.L., Kopka J., Mueller-Roeber B., Mcainsh M.R., Hetherington A. y Gray J.E. (2003). Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *The Plant Journal*, 34: 47-55.
- Legendre L., Yueh Y.G., Crain R., Haddock N., Heinsteins P.F. y Low P.S. (1993). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 24559-24563.
- Lin B.B. (2008). Microclimate effects on flowering success in coffee agroforestry systems. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science*, 3: 148-152.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J. (1995). *Molecular Cell Biology*, 4th ed. Freeman and Company. New York, pp. 166-178.
- Martínez-Estévez M., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity on cellular suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Report*, 20: 469-474.
- Martínez-Estévez M., Racagni-Di Palma G., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M., Brito-Argáez L. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1297-1303.
- Meijer H.J.G. y Munnik, T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 265-306.
- Melin P., Pical C., Jerjil B. y Sommarin M. (1992). Polyphosphoinositide phospholipase C in wheat root plasma membranes. Partial purification and characterization. *Biochemistry Biophysical Acta*, 1123: 163-169.
- Mills L.N., Hunt L., Leckie C.P., Aitken F.L., Wentworth M., Mcainsh M.R., Gray J.E. y Hetherington A.M. (2004). The effects of manipulating phospholipase C on guard cell ABA-signalling. *Journal of Experimental Botany*, 55: 199-204.

-
- Mc Murray W.C. e Irvine R.F. (1988). Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate phosphodiesterase in higher plants. *Biochemical Journal*. 249: 877-881.
- Munnik T. y Testerink C. (2009). Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of Lipid Research*, S260-S265.
- Nakahara M., Shimozawa M., Nakamura Y., Irino Y., Morita M., Kudo Y. y Fukami K. (2005) A novel phospholipase C, PLC η 2, is a neuron-specific isozyme. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 29128-29134.
- Nakamura Y., Awei K., Masuda T., Yoshioka Y., Takamiya K. y Ohta H. (2005). A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 7469-7476.
- Pan Y.Y., Wang X., Ma L.G. y Sun D.Y. (2005). Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from *Lilium davidi* pollen. *Plant Cell Physiology*, 46: 1657-1665
- Pann-Ghill Suh., Park J., Manzoli L., Cocco L., Peak J.C., Katan M., Fukami K., Kataoka T., Yun S. y Ho R. S. (2008). Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 415-434.
- Perera I.Y., Heilmann I. y Boss W.F. (1999). Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5838-5843.
- Piña-Chablé M.L. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: Aluminium effect. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 65: 45-56.
- Piña-Chablé M.L., De los Santos-Briones C., Muñoz-Sánchez J.A., Echevarria-Machado I. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1998). Effect of different inhibitors on phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Prostaglandins and Others Lipids Mediators*, 556: 19-31.

-
- Poulin B., Sekiya F. y Rhee, S.G. (2005). Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine-783 and the C-terminal Src homology 2 domain activates phospholipase C-gamma1. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 102: 4276-4281.
- Rhee S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry*, 66: 475-509.
- Rhee S.G., Kim H., Suh P.G. y Choi W.C. (1991). Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochemical Society Transactions*, 19: 337-341.
- Sánchez-Cach L.A., Ortiz-García M.M., Minero-García Y., Muñoz-Sánchez J.A., Hernández-Sotomayor S.M.T., Suárez-Solís V.M. y De los Santos-Briones C. (2008). Isolation of cDNA encoding the catalytic site of phosphatidylinositol specific phospholipase C from *Coffea arabica L.* *Plant Signaling & Behavior*, 3: 913-916.
- Sánchez, J.P. y Chua, N.H. (2001). *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *The Plant Cell*, 13: 1143-1154.
- Schmidt M., Evellin S., Weernink P.A., Von Dorp F., Rehmann H., Lomasney J.W. y Jakobs K.H. (2001). A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nature Cell Biology*, 3: 1020-1024.
- Shi J., González R.A. y Bhattacharya M.K. (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant Journal*, 8: 381-390.
- Stevenson J.M., Perera I.Y., Heilmann I., Persson S. y Boss W.F. (2000). Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science*, 5: 252-258.
- Tasma I.M., Brendel V., Whitham S.A., y Bhattacharyya M.K. (2008). Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 627-637.

-
- Testerink C. y Munnik T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science*, 10: 368-375.
- Venkataraman G., Goswami M., Tuteja N., Reddy M.K. y Sopory S.K. (2004). Isolation and characterization of a phospholipase C delta isoform from *pea* that is regulated by light in a tissue specific manner. *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 378-386.
- Wang X. (2001). Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 211-31.
- Wang X. (2004). Lipid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 1-8.
- Wohlk G.N. (2003). Estructura y función de la célula normal: structure and function. *Gastroenterología Latinoamericana*, 14: 161-162.
- Yakimova E.T., Kapchina-Toteva V.M. y Woltering E.J. (2007). Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology*, 164: 702-708.
- Zhai S., Sui Z., Yang A. y Zhang J. (2005). Characterization of a novel phosphoinositide-specific phospholipase C from *Zea mays* and its expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 27: 799-8.

CAPÍTULO II

Para esta parte se llevarán a cabo diferentes experimentos en los que se aplicarán diferentes estrategias para poder cumplir con los objetivos planteados, como modelo se trabajará con suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. En la primera parte se inmunodetectará a la proteína PLC para posteriormente someter a las suspensiones celulares a un estrés por NaCl Y $AlCl_3$ y obtener diferentes extractos celulares (total, soluble, membranal y citoesqueleto) en donde se inmunolocalizará y se medirá la actividad correspondiente para conocer cómo se comporta esta enzima bajo estas condiciones. En una segunda parte se amplificarán los extremos 5' y 3' a partir de la región catalítica de la enzima utilizando iniciadores específicos para que una vez que se tenga la secuencia en nucleótidos realizar la traducción *in silico* en aminoácidos y obtener la secuencia completa de la proteína que nos permita sintetizar anticuerpos específicos contra regiones diferentes a la región catalítica.

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Material Vegetal

El modelo experimental utilizado para el desarrollo de esta investigación fueron suspensiones celulares de *C. arabica*, línea L2 cultivadas cada 14 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), conteniendo sacarosa 30 g / L, 140 μ M cisteína HCl, 560 μ M myo-inositol, 30 μ M tiamina HCl, 13.6 μ M ácido 2,4 dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y 4.4 μ M de 6-bencil-aminopurina (6-BAP) modificado a la mitad de la fuerza iónica (Martínez-Estévez *et al.*, 2001). Las suspensiones celulares se cultivaron en condiciones de oscuridad a 25 °C y mantenidas en agitación a 100 rpm.

2.1.2 Tratamiento con NaCl o $AlCl_3$

Células de 14 días del ciclo de cultivo fueron filtradas, en papel Whatman No. 40, 1.5 g de células se resuspendieron en 25 mL de medio MS fresco (pH 5.8 en el caso del tratamiento con NaCl) y MS a la mitad de su fuerza iónica (pH 4.3 en el ensayo con $AlCl_3$) y se mantuvieron en agitación a 100 rpm durante 30 minutos como periodo de adaptación

previo al tratamiento correspondiente.

Para los ensayos de dosis-respuesta, suspensiones celulares de 14 días del ciclo de cultivo fueron tratadas con 250 mM de NaCl, en el caso de los ensayos con AlCl₃ fueron tratadas con una concentración final de 100 μM. Después de 1 hora de tratamiento, las células fueron cosechadas y congeladas en nitrógeno líquido. Los testigos correspondientes fueron adicionados con manitol a una concentración final de 500 mM o medio de cultivo respectivamente.

2.1.3 Obtención del extracto proteico

Las células de *C. arabica*, congeladas con nitrógeno líquido se maceraron en un mortero de porcelana y posteriormente se homogenizaron con un politrón en una solución amortiguadora [(NaCl 50 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, pirofosfato de sodio 10 mM, ortovanadato de sodio 0.2 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM, Tritón X-100 1% y β-mercaptoetanol 1 mM], se usó 1 g de células/2.5 mL de solución amortiguadora, el extracto se incubó por 2-3 minutos. Después se centrifugó a 20,400 x g por 30 minutos, para así obtener el extracto total y a 100,000 x g para la obtención de extractos solubles o membranales y por último otra centrifugación para obtener el citoesqueleto, los cuales se almacenan a -70 °C, para su uso posterior.

2.1.4 Cuantificación de la concentración de proteína

Se utilizó el método comercial del ácido bicinonínico (PIERCE) (Smith *et al.*, 1985) para la cuantificación de la concentración de proteína total. Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/mL. La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría a 562 nm.

2.1.5 Determinación de la actividad enzimática de la PLC

La hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 -bisfosfato (³H-PIP₂) se evaluó según Martínez-Estévez *et al.*, (2003) en una mezcla de reacción de 50 μL que contenía 35 mM de NaH₂PO₄ (pH 6.8), 70 mM de KCl, 1 mM EGTA, 0.8 mM de CaCl₂, 200 μM de ³H-PIP₂/PIP₂ (≈436.8 Bq) como sustrato y 0.1% de deoxicolato (DOC).

La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 10 minutos y se detuvo adicionando BSA al

1% y ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Finalmente, se centrifugó a 13,500 x g durante 10 minutos, el sobrenadante fue depositado en viales con 5 mL de líquido de centelleo y se cuantificó la formación de $^3\text{H-IP}_3$ en un contador de centelleo. Todos los experimentos se repitieron tres veces por duplicado y los resultados se expresan como % del valor basal sin tratamiento \pm DS, el error no varió en más de 5% en cada tratamiento.

2.1.6 Inmunodetección

Para la realización de los ensayos inmunológicos se usó suero de conejo inmunizado con el fragmento correspondiente a la región catalítica X y Y, referido como anticuerpo-CaPLC (α -CaPLC), así como un suero preinmune de conejo.

El extracto proteico (35 μg) fue separado en un gel de poliacrilamida al 12% y electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 100 V. Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche descremada en una solución amortiguadora salina de TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20) durante toda la noche a 4°C. La membrana se lavó tres veces con la misma solución amortiguadora, cada lavado por 10 minutos. Para la detección de la PLC la membrana fue incubada con un anticuerpo primario en una dilución 1:1000 (anticuerpo policlonal de la PLC: α CaPLC) por 4 h a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados con TBS-T, para posteriormente incubarla con un anticuerpo secundario en una dilución 1:5000 (anti-IgG de conejo conjugada con una peroxidasa) durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó bajo las condiciones descritas con anterioridad. El proceso de visualización del complejo PLC:anticuerpo se llevó a cabo con el paquete de quimioluminiscencia (ECL) Amersham Pharmacia Biotech. La membrana, al final de proceso fue teñida con rojo de Ponceau (0.5%).

2.1.7 Extracción del ARN total

Para la extracción del ARN total de suspensiones celulares se siguieron las recomendaciones del proveedor (TRIZOL Reagent, Invitrogen). Se pesó 0.1 g de suspensiones celulares y se adicionó 1 mL del reactivo TRIZOL. A esta mezcla se le adicionaron 200 μL de cloroformo para agitar vigorosamente durante 15 segundos

CAPÍTULO II

seguido de una centrifugación a 12,000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, al cual se le adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico concentrado (grado biología molecular, SIGMA) y luego se incubó a -20 °C durante 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos y el precipitado fue lavado con etanol-DEPC-H₂O (DEPC: dietilpirocarbonato) al 70 % y resuspendido en 20 µL de agua tratada con DEPC.

La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1% a 70 v por 1 hora y tinción con bromuro de etidio al 0.1%. El gel se visualizó en un fotodocumentador de luz UV (Quantity One.V. 4.2. BIO-RAD).

La cuantificación del ARN se llevo a cabo mediante espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 2000, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente el ARN obtenido se trató con desoxirribonucleasa (TURBO DNase, Ambiont), como lo indica el proveedor, para eliminar el ADN contaminante.

2.1.8 Obtención del ADN complementario (ADNc) para la amplificación de los extremos terminales (RACE).

Para obtener el ADN complementario (ADNc) y amplificar el extremo terminal 5', se realizaron las siguientes etapas: a) desfosforilación del ARN mensajero (ARNm); b) ruptura de la estructura "cap" del ARNm y c) ligación del iniciador con una secuencia conocida al extremo terminal 5' del ARNm. Para la síntesis del extremo 3' no resulta necesario que el ARN sea sometido a los procesos antes descritos, para la amplificación de este extremo, una vez que el ARN es tratado con ADNsa inmediatamente puede llevarse a cabo la transcripción reversa para obtener el ADNc que sirvió como templete para realizar la amplificación correspondiente al extremo 3'.

Para realizar la transcripción reversa se utilizó un iniciador (oligo dT) que lleva acoplado un iniciador de secuencia conocida en el extremo terminal 3' del ARNm. Finalmente, se obtiene la primera cadena de ADNc con sitios de anclaje para iniciadores de secuencia conocida en ambos extremos, 3' y 5' terminales. Para este proceso se usó el paquete comercial One Step RT-PCR (QIAGEN) y el GeneRacer™ Kit (INVITROGEN); siguiendo las recomendaciones del proveedor.

2.1.9 Amplificación por PCR de los extremos terminales 3' y 5'

En base a la secuencia de ADNc obtenida por Sánchez-Cach y col., (2008), se diseñaron dos pares de iniciadores, unos que amplifican un fragmento de 926 pb y otro de 281 pb, designados como FPLC926/RPLC926 y FPLC281/RPLC281, respectivamente (Figura 2.1), además de un par de iniciadores para la amplificación de un fragmento de 278 pb del gen de la tubulina de *C. arabica* (TubF y TubR). En el Cuadro 1.1 se presentan las secuencias de dichos oligonucleótidos.

Se llevó a cabo una PCR en donde también se utilizaron los iniciadores provistos en el paquete GeneRacer™ Kit (INVITROGEN), correspondientes a cada uno de los extremos terminales, así como un iniciador oligo dT con los dos iniciadores forward (FPLC926 y FPLC281) para la amplificación del extremo terminal 3' y para la amplificación del extremo 5' se utilizaron los iniciadores reversos PLCR926 y PLCR281.

Las condiciones de amplificación mediante PCR se determinaron realizando una PCR en gradiente de 50 a 65 °C esto permitió determinar la temperatura óptima de alineamiento de los iniciadores, para el caso de la amplificación del fragmento correspondiente a la región catalítica tuvo una temperatura de alineación de 60 °C, las condiciones de amplificación se muestran en la figura 2.2. Se usó la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) y un termociclador Mastercycler Personal marca Eppendorf.

2.1.10 Purificación de los fragmentos obtenidos de la amplificación

Los fragmentos obtenidos del proceso de amplificación de los extremos 3' y 5' se purificaron de geles de agarosa mediante el paquete comercial QUIAEX II SYSTEM (QUIAGEN), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

2.1.11 Secuenciación

Los productos obtenidos de la amplificación por PCR de los extremos 5' y 3' se mandaron secuenciar a los laboratorios especializados de la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM haciendo uso de un secuenciador automático.

CAPÍTULO II

```

1   ctgagcagcg actgcagtga cgccccatc aāaatgcac tgaagagagg tgtgcgggtg
61  attgaattgg acatatggcc taatgcatca aaggataaca tagatgttct tcatggaagg
      FPLC926
121 acattgacta ctctgtaga gctcataaga tgtttgaggt ctattaagga tcatgccttt
181 gtggcatcag aatatccagt tgtaataacc ctagaagacc accttaegcc agatctccag
241 gctaaagtgg ctgagatggt tactgaaaca tttggagaca tactatttac tectaactca
301 gaaagtgtga aggaattccc ttctctgaa tcacttaaaa agagaattat tataatcaacc
361 aaaccaccta aggagtacct tgaggcaaaa gaaaaggaaa aaggggatga ttcacagcac
      FPLC281
421 gaaaaggaga aaggggatga ttcacagcat ggaaaggcat taggogaaga tgaagcttgg
481 gggaaggaaag tccaagctt gaaaggtggt actatagagg attacaagga ctacaatgtg
541 gatgaagatc ttaatgatga ggaagaattt gatgaatcag acaagtcaca tcataatgaa
601 gctccagaat atagacgct aattgcaatt catgctggga agcetaaagg tggattagca
      RPLC281
661 gaatgctca aagtggatcc tgataaagtg agacgtctaa gtttaagtga gcaacagctt
721 gaaaaggctg ccataaatca tggacaacaa attgtcaggt ttactcagcg gaatatacta
781 aggggtatc caaaaggtac tgcattgac tcatcaaatt ataaccatt aattgggtgg
841 atgcatggag ctcagatggt tgcatttaac atgcaggggt atgggagatc tctttggttg
      RPLC926
901 atgcatggaa atg

```

Figura 2.1 Sitio de hibridación de los iniciadores sobre el ADNc de la PLC DE *Coffea arabica* diseñados en este estudio. De acuerdo a la secuencia del ADNc que codifica la región correspondiente al sitio catalítico de la PLC de *Coffea arabica*. Se diseñaron dos pares de iniciadores, nombrados como FPLC926/RPLC926, FPLC281/RPLC281, los cuales amplifican fragmentos de 926 y 281 pb respectivamente, Sánchez-Cach y col., 2008.

Cuadro 1.1 Iniciadores de ADN específicos para la PLC diseñados a partir de la secuencia correspondiente a la región catalítica de la PLC de café.

Iniciadores	Secuencia 5'---- 3'	Longitud (nt)	Fragmento esperado
FPLC926	gcg ggt gat tga att gga cat a	22	
RPLC926	gga gct cag atg gtt gca ttt aac atg	27	926 pb
FPLC281	caa acc acc taa gga gta cc	20	
RPLC281	cgc cta att gca att cat gct ggg	24	281 pb
TubF	atg aga gag tgc atc tcc atc c	22	
TubR	atg agc tgc tca ggg tgg a	19	278 pb

FPLC y RPLC iniciadores forward y reverse, Tub iniciadores para el gen de tubulina forward y reverse.

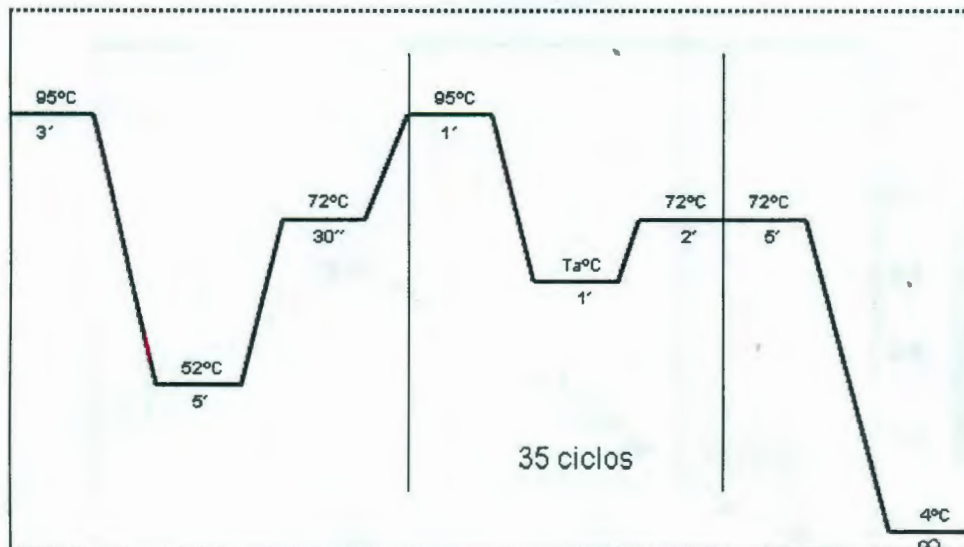


Figura 2.2 Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen de la PLC mediante PCR. Un ciclo de desnaturalización previa, 35 ciclos de alineación, la temperatura de alineación de los iniciadores (T_a) y un ciclo de extensión y de finalización de la extensión.

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1 Extracción de proteínas

Se utilizaron suspensiones celulares de 14 días de cultivo de *C. arabica*, para la extracción de proteínas, se obtuvo el extracto total, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de proteínas. La concentración se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en una curva patrón de albúmina de suero bovino, (figura 2.3). La linealidad de la curva indica que existe una correlación lineal entre la cantidad de proteína y la absorbancia en el rango de proteína utilizada.

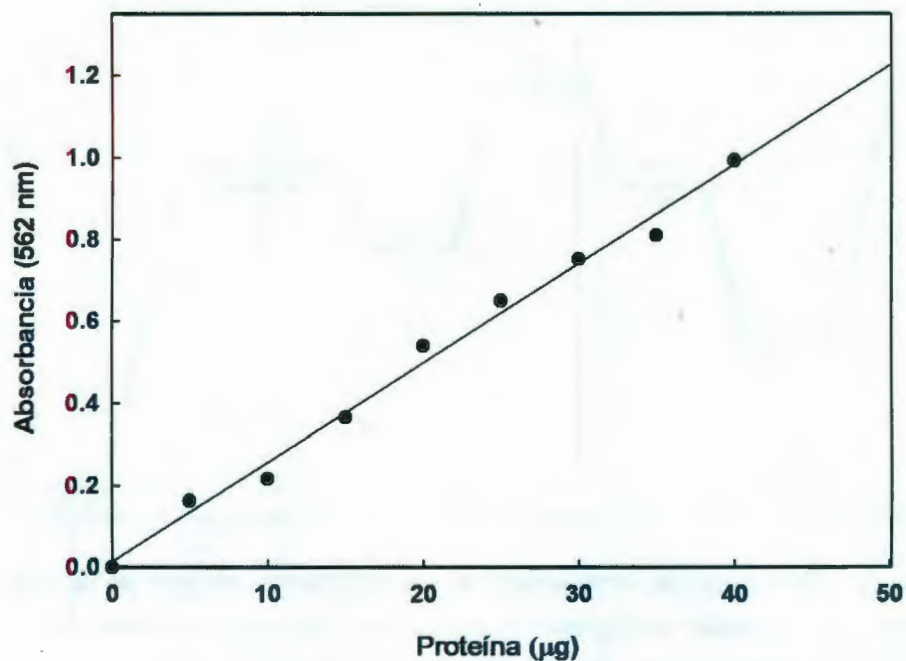


Figura 2.3 Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). Se prepararon diferentes concentraciones de BSA en un volumen total de 100 μL para medir su absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm.

La cantidad de proteína presente en los extractos totales estuvo comprendida entre 3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dicha concentración se consideró para llevar a cabo los perfiles electroforéticos de las proteínas, los experimentos de inmunodetección y la cuantificación de la actividad enzimática de PLC.

2.2.2 Perfiles electroforéticos

Los extractos proteicos fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12%, se utilizaron diferentes cantidades de proteína. Los geles fueron teñidos con una solución de nitrato de plata (Figura 2.4), se observó que el patrón de proteínas presente en los extractos totales de suspensiones celulares de *C. arabica*, está en el rango de 8 a 124 kDa y que la mayor parte de las proteínas se localizan entre el rango de 35 y 120 kDa.

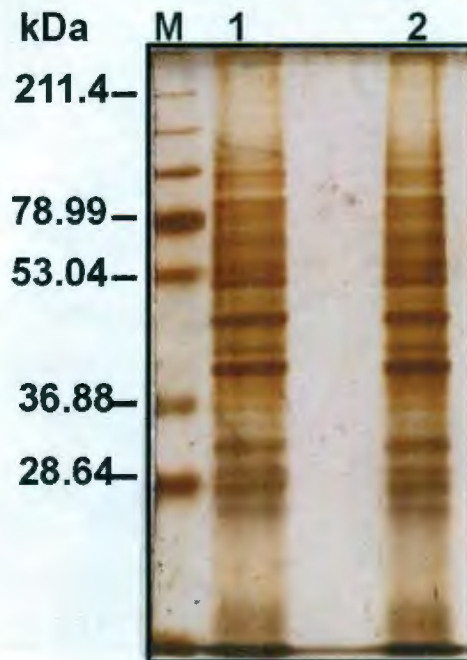


Figura 2.4 Perfiles electroforéticos en geles SDS-PAGE al 12% de la proteína total de suspensiones celulares de *C. arabica*. Separación electroforética de proteínas presentes en los extractos totales de suspensiones celulares de *C. arabica*. Se depositaron 5 (carril 1) y 10 (carril 2) μg de proteína del extracto total. El gel se tiñó con una solución de nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular de proteínas.

2.2.3 Inmunodetección

Para determinar si los anticuerpos $\alpha\text{-CaPLC}$ y $\alpha\text{-PLC}\delta$ eran capaces de detectar la proteína PLC en los diferentes extractos, se realizó una inmunodetección de la PLC con los mismos.

En una primera inmunodetección con el anticuerpo comercial ($\alpha\text{-PLC}\delta$), en las proteínas del extracto total electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, se observó el inmunoreconocimiento de una proteína de aproximadamente 90 kDa (Figura 2.5). Como testigo positivo se utilizó extracto proteico de cerebro bovino; en dicha fracción también se detectó una proteína de tamaño aproximado de 90 kDa, correspondiente al tamaño reportado para la PLC δ de mamíferos (Homma *et al.*, 1988; Shu *et al.*, 1988).

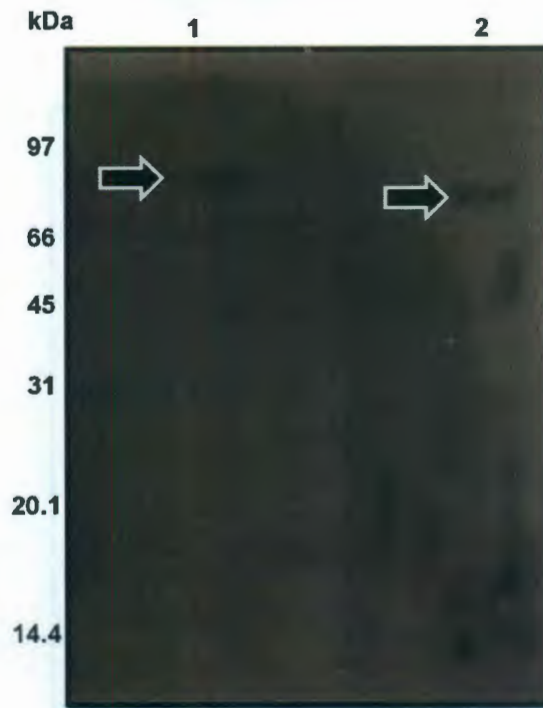


Figura 2.5 Inmunodetección de la PLC con el α -PLC δ en extractos proteicos de suspensiones celulares de *C. arabica* y cerebro bovino. 1: Extracto total proteico de suspensiones celulares de cafeto; 2: Extracto proteico de cerebro bovino, 35 μ g de proteína/carril. SDS-PAGE, 12%. M: Marcador de peso molecular. La reacción de inmunoreconocimiento se reveló con el paquete de quimioluminiscencia ECL-Western blot (Amersham).

Una vez que se establecieron las condiciones para la separación y electrotransferencia de las proteínas de los extractos totales de suspensiones celulares de cafeto, se procedió a utilizar diferentes diluciones del suero α -CaPLC (1:1000; 1:500 y 1:250). Para la inmunodetección de las proteínas de suspensiones celulares de cafeto se usaron 15, 30 y 50 μ g de proteína. Se detectaron diferentes proteínas con pesos moleculares distintos (Figura 2.6), cabe resaltar que se detectaron dos proteínas una de aproximadamente de 38 kDa y otra de 67 kDa; ambas pudieran corresponder a diferentes formas o fragmentos de la PLC ya que ha sido reportado que estas enzimas en vegetales poseen un peso molecular que oscila en el rango de 30 a 80 kDa. Adicionalmente se observaron otras bandas de polipéptidos, estas últimas pudieran ser producto de uniones inespecíficas.

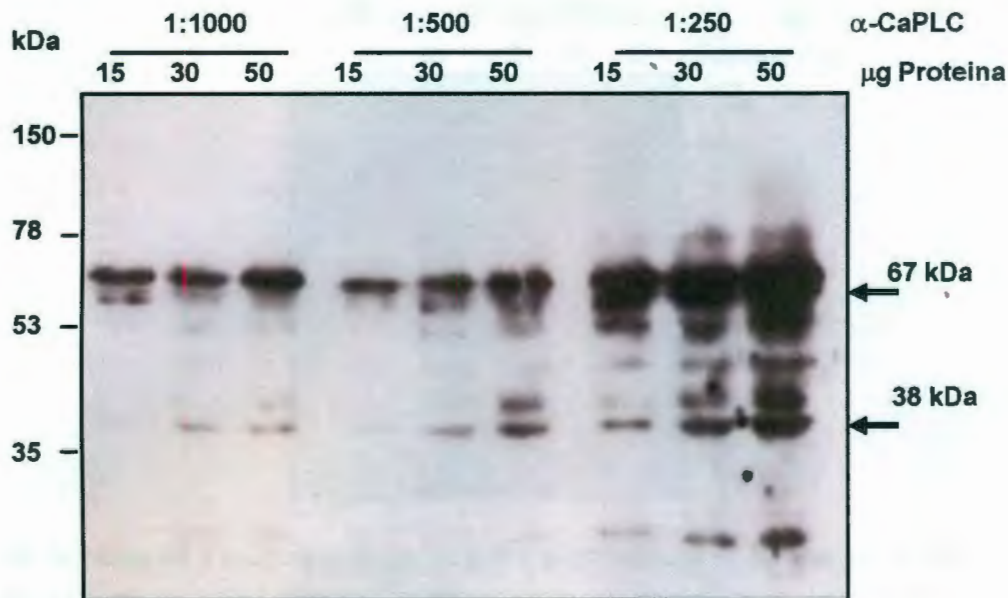


Figura 2.6 Inmunodetección de la fosfolipasa C con α -CaPLC. Detección de proteínas que reconocen a la PLC en extractos proteicos totales de suspensiones celulares de *C. arabica*. La inmunodetección se realizó con diferentes cantidades de proteína depositada en cada carril e inmunodetectadas con distintas diluciones del suero α -CaPLC.

El resultado anterior permitió determinar que con 30 μ g de proteína y con una dilución de 1:1000 de suero α -CaPLC es posible observar la presencia de la PLC en extractos totales de suspensiones celulares de *C. arabica*.

Para identificar a las proteínas que pudieran estar siendo reconocidas de manera inespecífica por el suero α -CaPLC, se realizaron experimentos de inmunodetección usando las mismas cantidades de proteína (15, 30 y 50 μ g) y diluciones de 1:500 y 1:250 del suero preinmune (SP) (Figura 2.7) o con el anticuerpo secundario (Figura 2.8). El inmunoreconocimiento inespecífico con el anticuerpo secundario (Figura 2.8) reveló un patrón de proteínas diferente al encontrado con el suero α -CaPLC. El revelado de la unión inespecífica de ambos sueros no mostró la presencia de las proteínas de 38 y 67 kDa, sugiriendo entonces que ambos polipéptidos son reconocidos específicamente por el suero α -CaPLC.

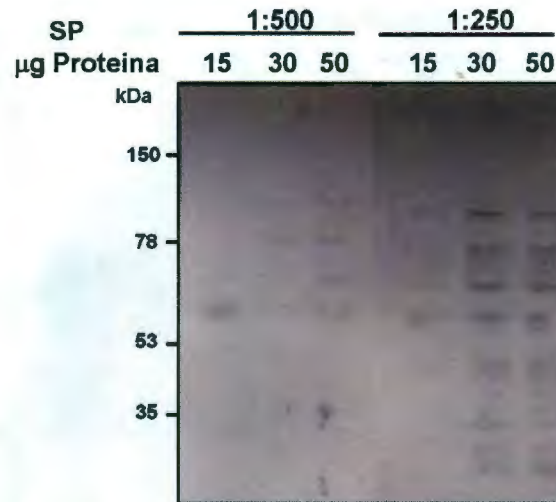


Figura 2.7 Análisis de la unión inespecífica del suero preinmune a las proteínas del extracto total de suspensiones celulares de *C. arabica*. Unión inespecífica de diferentes proteínas en el extracto total de suspensiones celulares de *C. arabica* con diferente cantidad de proteína en cada carril y diferentes diluciones de suero preinmune (SP) que permitiera detectar diferencias.

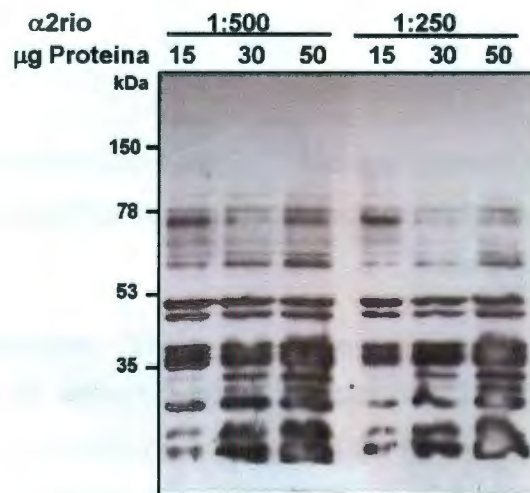


Figura 2.8 Análisis de la unión inespecífica del anticuerpo secundario a las proteínas del extracto total de suspensiones celulares de *C. arabica*. Unión inespecífica de diferentes proteínas en el extracto total de suspensiones celulares de *C. arabica* con diferente cantidad de proteína en cada carril y diferentes diluciones de anticuerpo secundario ($\alpha 2\text{rio}$) que permitiera detectar diferencias.

2.2.4 Efecto de diferentes tipos de estrés sobre la actividad y localización de la PLC

Una vez que se determinó que con el suero α -CaPLC se identificaba de manera específica a una proteína, que por peso molecular (~38 y ~67 kDa) sugería su identidad con una PLC, tal como se ha descrito para las PLC de vegetales como papa (Kopka *et al.*, 1998), chícharo (Venkataraman *et al.*, 2003, frijol mungo (Kim *et al.*, 2004), donde se ha descrito que poseen pesos moleculares que oscilan entre los 30 y 80 kDa, se procedió a estudiar el comportamiento de la enzima PLC en suspensiones celulares sometidas a estrés salino (NaCl) y por metales (AlCl₃). En extractos proteicos obtenidos bajo dichas condiciones (sección 2.1.3), se realizaron ensayos de inmunolocalización de la PLC en el extracto: total (T), soluble (S), membranal (M) y la fracción correspondiente al citoesqueleto (C), también se realizó la cuantificación de la actividad enzimática en cada uno de los extractos de los respectivos tratamientos.

2.2.4.1 Efecto del estrés por NaCl sobre la PLC

Para determinar si los tratamientos con NaCl modificaban la distribución de las proteínas de las suspensiones celulares sometidas al estrés por NaCl, como se menciona en la sección 2.1.2, fueron inmunodetectadas con el anticuerpo α -CaPLC. La inmunodetección mostró un perfil diferente de polipéptidos inmunoreactivos en los diferentes extractos proteicos (Figura 2.9). Se pudo observar que en los testigos existe una mayor señal de la proteína de 67 kDa, proteína que coincide a la inmunodetectada en la figura 2.6. Cabe resaltar que en el extracto total (T) del testigo comparado con su correspondiente de las células tratadas con NaCl resulta mucho más evidente un efecto por este tipo de estrés en la distribución de las bandas inmunodetectadas con el α -CaPLC, ya que se puede ver una mayor señal de la banda de 67 kDa en el testigo que en el extracto total de células con el tratamiento.

En este experimento con el α -CaPLC también se detectó otra proteína de aproximadamente 38 kDa, la cual mostró una mayor señal en la fracción de citoesqueleto de células tratadas con NaCl, en tanto en las fracciones de extracto total, soluble y membranal es menor la señal de esta proteína con respecto de las células que no se

sometieron al tratamiento (testigos).

En dichas fracciones proteicas se determinó la actividad enzimática de la PLC, su actividad se expresó como el porcentaje de formación de IP_3 y se observó que existe una mayor formación de este compuesto en el extracto total, soluble y membranal, comparados con su testigo correspondiente; en el citoesqueleto, disminuye drásticamente la formación de IP_3 casi a una tercera parte con respecto del testigo, tal como se observa en la Figura 2.10.

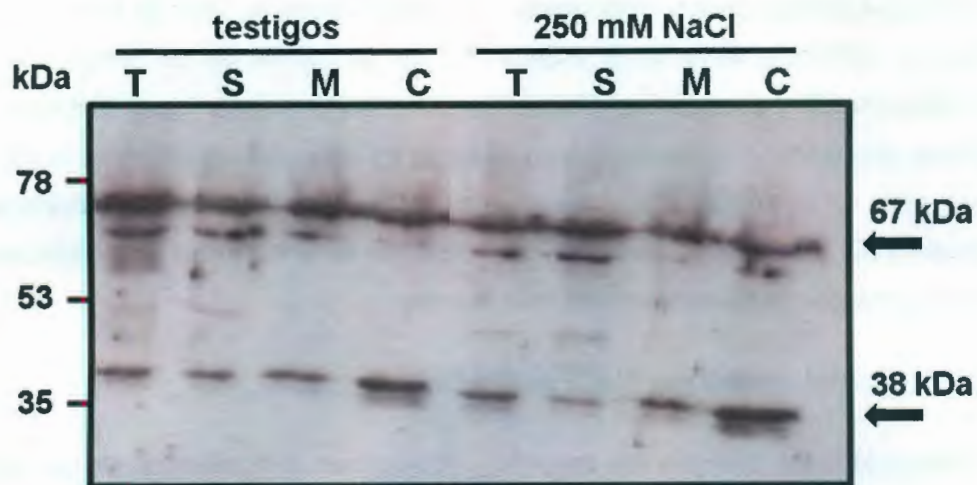


Figura 2.9 Determinación por inmunoblot con el suero α -CaPLC de la distribución de la enzima PLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de *C. arabica* tratados con NaCl. Inmunodetección de la enzima PLC con el suero α -CaPLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de *C. arabica*, con tratamiento con NaCl. Inmunodetección de la PLC sobre proteínas de suspensiones celulares de 14 días sometidas a un tratamiento con NaCl 250 mM. Extracto total (T), soluble (S), membranal (M) y citoesqueleto (C). Las condiciones de la separación de proteínas e inmunodetección se realizaron de acuerdo a la sección 2.1.6. 35 μ g de proteína en cada carril.

Para determinar si el efecto observado es causado por estrés iónico y no por estrés osmótico se realizó otro ensayo, en donde suspensiones celulares de 14 días del ciclo de cultivo fueron sometidas a un tratamiento con 500 mM de manitol esto para igualar el efecto que pudiera estar provocando el estrés osmótico causado por el NaCl, (Figura 2.11). Se observó un comportamiento muy diferente comparado con el ensayo del

tratamiento de las células con NaCl, en donde la señal de la proteína de 67 kDa, es más intensa en los extractos totales, solubles y membranales, ya que como se ve en la figura 2.11 la proteína de 67 kDa presenta una intensidad muy baja. Llama la atención la proteína de 38 kDa observada en los extractos de las células con el tratamiento con manitol en donde las fracciones correspondientes al extracto total, soluble y membranal, la intensidad de la señal resulta sumamente disminuida respecto del tratamiento con NaCl y en cambio esta misma proteína aumenta su intensidad de señal en la fracción de citoesqueleto. Al comparar la fracción de citoesqueleto de células testigo y tratadas con manitol, en el testigo se ve una intensidad de la señal mientras que en el tratamiento con manitol se observa una disminución, sugiriendo que tal comportamiento es un efecto provocado por este osmolito.

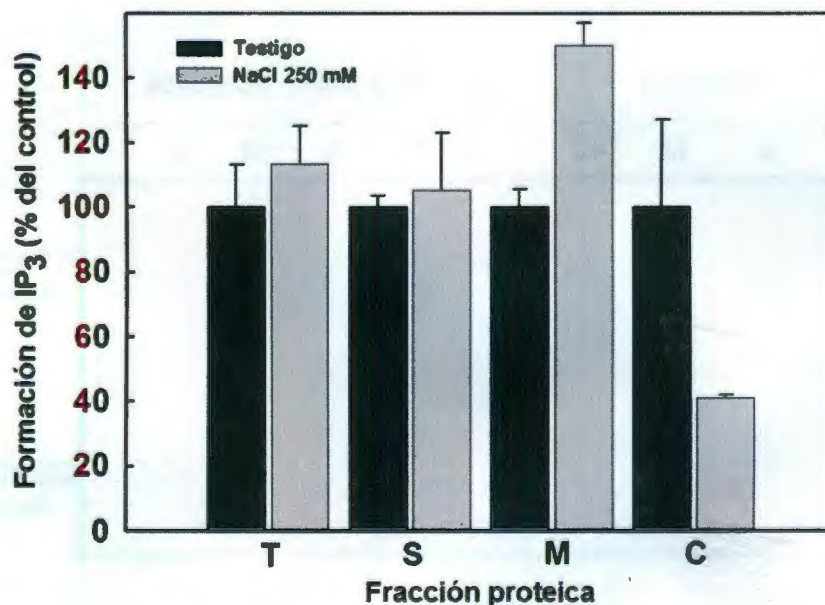


Figura 2.10 Actividad enzimática de la PLC en suspensiones celulares de *C. arabica* L., bajo estrés por NaCl. La actividad de la PLC fue evaluada como se describe en materiales y métodos (2.1.5) y para ello se utilizó proteína proveniente de suspensiones celulares de 14 días del ciclo de cultivo sometidas a un tratamiento con NaCl 250 mM por 1 h. Los resultados son expresados como porcentaje basal (\pm DS) de la formación de IP_3 en los extractos de células sin tratamiento (testigo), la cual fue de 6,894; 3,664; 868 y de 3,119 pmol/min/mg en los extractos total (T), soluble (S), membranal (M) y de citoesqueleto (C), respectivamente.

CAPÍTULO II

La cuantificación de la actividad enzimática de la PLC en las diferentes fracciones proteicas, mostró que la actividad de dicha enzima fue casi cuatro veces más baja en los fracciones proteicas de extracto total, soluble y de citoesqueleto respecto a la de sus testigos y casi a la mitad de la actividad detectada en el extracto membranal; efecto debido quizás a un estrés osmótico causado por el osmolito, como se puede observar en la Figura 2.12.

Estos resultados obtenidos mostraron que el tratamiento de las suspensiones celulares de *C. arabica* con NaCl o manitol afectan de manera diferencial la actividad y distribución de la enzima PLC y que probablemente exista una relocalización de esta proteína entre los diferentes compartimentos celulares cuando las células son sometidas a este tipo de estrés provocado por el manitol y no por el NaCl.

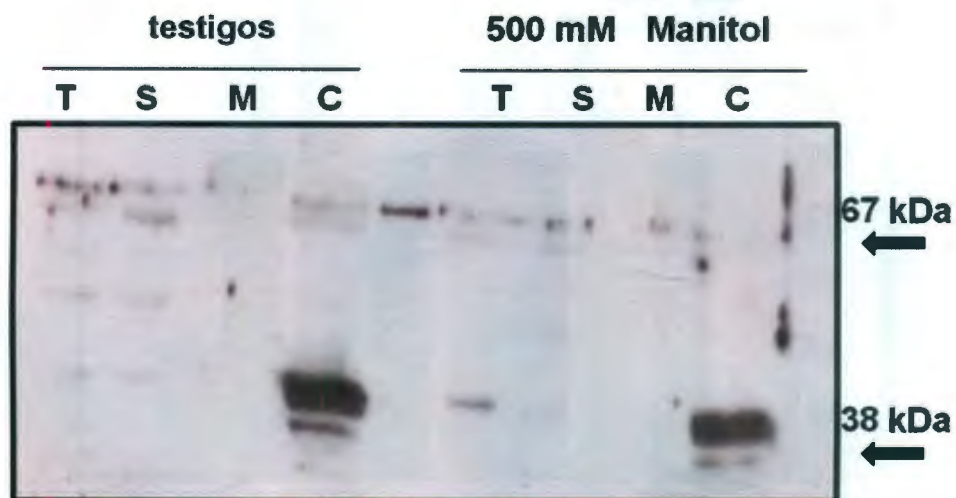


Figura 2.11 Distribución de la enzima PLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de *C. arabica* tratadas con manitol. Suspensiones celulares de 14 días de cultivo sometidas a un tratamiento con manitol 500 mM. Inmunodetección con el anticuerpo α -CaPLC en extracto total (T), soluble (S), membranal (M) y citoesqueleto (C). Las condiciones de la separación de proteínas e inmunodetección se realizaron de acuerdo a la sección 2.1.6. 35 μ g de proteína en cada carril.

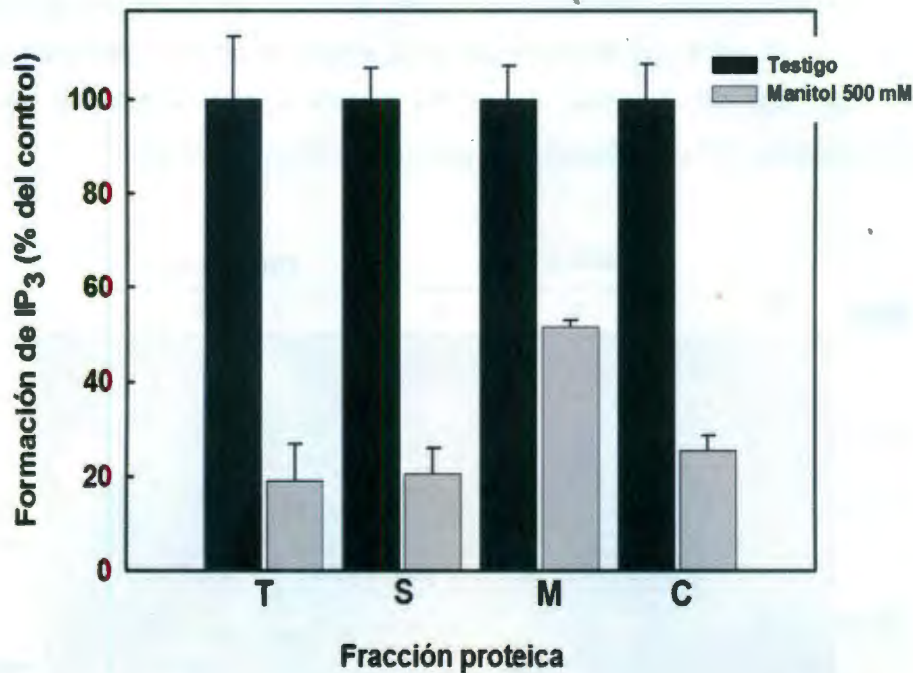


Figura 2.12 Actividad enzimática de la PLC en suspensiones celulares de *C. arabica* L. bajo estrés por manitol. Suspensiones celulares de 14 días del ciclo de cultivo sometidas a tratamiento con manitol 500 mM por 1 h. La actividad fue medida como se describe en materiales y métodos (2.1.5). Los resultados son expresados como porcentaje basal (\pm DS) de la formación de IP_3 en los extractos de células sin tratamiento (testigo), la cual fue de 3,314; 3,654; 1,065 y de 1,541 pmol/min/mg en los extractos total (T), soluble (S), membranal (M) y de citoesqueleto (C), respectivamente.

2.2.4.2 Efecto del estrés por $AlCl_3$ sobre la PLC

Para determinar si el comportamiento de la PLC es afectada ante un estrés por metales, suspensiones celulares de *C. arabica* fueron tratadas con $AlCl_3$, como se describe en la sección 2.1.2

En estas condiciones con el anticuerpo α -CaPLC se inmunodectó nuevamente a las proteínas de 67 y 38 kDa ya previamente visualizadas (Figura 2.13), en este caso

particular del tratamiento con AlCl_3 , la proteína de ~67 kDa tuvo mayor intensidad de señal en los extractos de las diferentes fracciones proteicas de las células sin tratamiento (testigos), lo cual muestra que el estrés por AlCl_3 inhibe de manera diferencial a la PLC. La tinción con rojo de Ponceau de la membrana reveló cantidades de proteína equivalentes en cada inmunodetección (35 μg), (datos no mostrados).

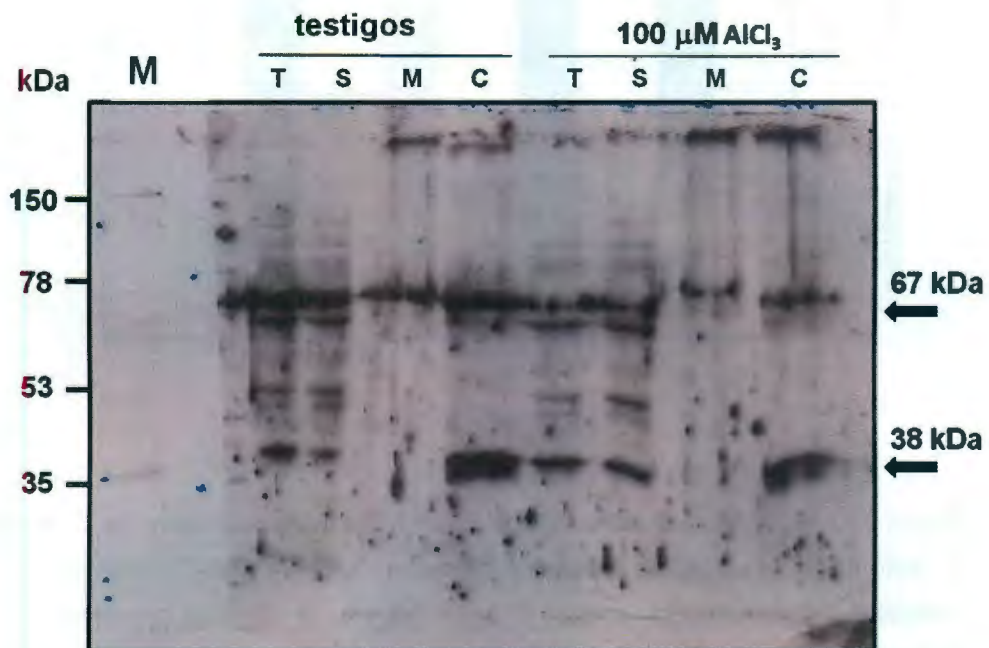


Figura 2.13 Determinación por inmunoblot con el α -CaPLC de la distribución de la enzima PLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de *C. arabica* tratados con AlCl_3 . Suspensiones celulares de 14 días de cultivo sometidas a un tratamiento con 100 μM de AlCl_3 . Inmunodetección con el anticuerpo α -CaPLC en extracto total (T), soluble (S), membranal (M) y citoesqueleto (C). Las condiciones de la separación de proteínas e inmunodetección se realizaron de acuerdo a la sección 2.1.6. 35 μg de proteína en cada carril.

La proteína de 38 kDa inmunodetectada con el anticuerpo α -CaPLC tiene una menor intensidad en los extractos totales y solubles sin tratamiento comparados con los extractos de las células tratadas, esta misma proteína no se observa en el extracto membranal y en cambio la fracción de citoesqueleto presenta una mayor intensidad en el

extracto de células sin tratamiento comparado con los extractos de las células bajo el tratamiento con AlCl_3 (Figura 2.13) y esto sugiere que la enzima PLC se ve afectada de manera negativa por dicho tratamiento.

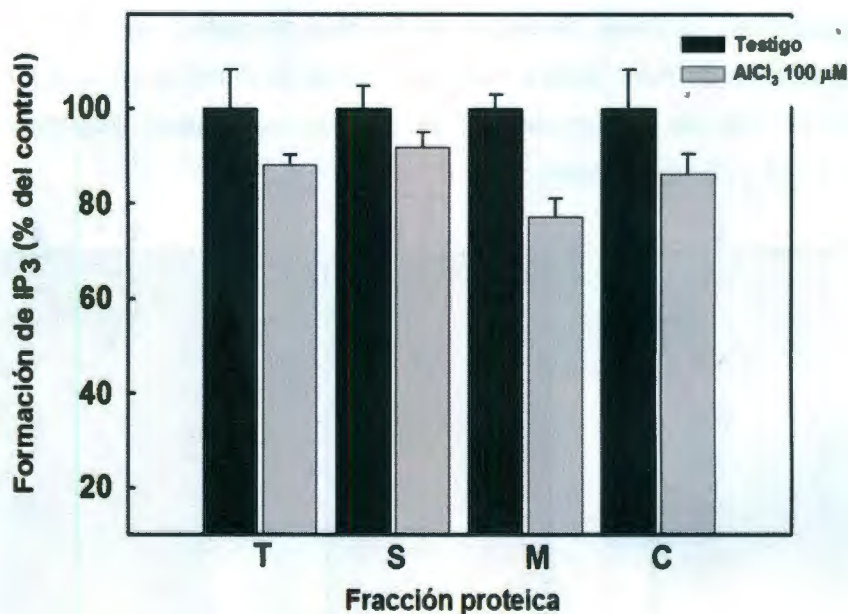


Figura 2.14 Actividad enzimática de la PLC en suspensiones celulares de *C. arabica* L. bajo estrés por AlCl_3 . Suspensiones celulares de 14 días del ciclo de cultivo sometidas a un tratamiento con AlCl_3 100 μM por 1 h. La actividad fue medida como se describe en sección de materiales y métodos (2.1.5). Los resultados son expresados como porcentaje basal ($\pm\text{DS}$) de la formación de IP_3 en los extractos de células sin tratamiento (testigo), la cual fue de 15,837; 14,925; 16,127 y de 15,629 pmol/min/mg en los extractos total (T), soluble (S), membranal (M) y de citoesqueleto (C), respectivamente.

Al realizar la cuantificación de la actividad enzimática de la PLC en los extractos proteicos tratados con el AlCl_3 , se pudo observar un efecto inhibitorio en la actividad de esta enzima, ya que en los extractos testigos la actividad fue mayor que en los tratados, como se observa en la (Figura 2.14), esto puede indicar que el aluminio puede estar

interactuando con la enzima inhibiéndola.

2.2.5 Obtención de los extremos terminales 3' y 5' del gen de la PLC

Para el desarrollo de este experimento primeramente se llevó a cabo la extracción de ARN de suspensiones celulares de cafeto de 14 días de cultivo, según la metodología descrita en la sección de materiales y métodos, como se muestra en la figura 2.15A se logró obtener un ARN de buena calidad, ya que no se observa degradación de las subunidades 28, 18 y 5S ribosomales.

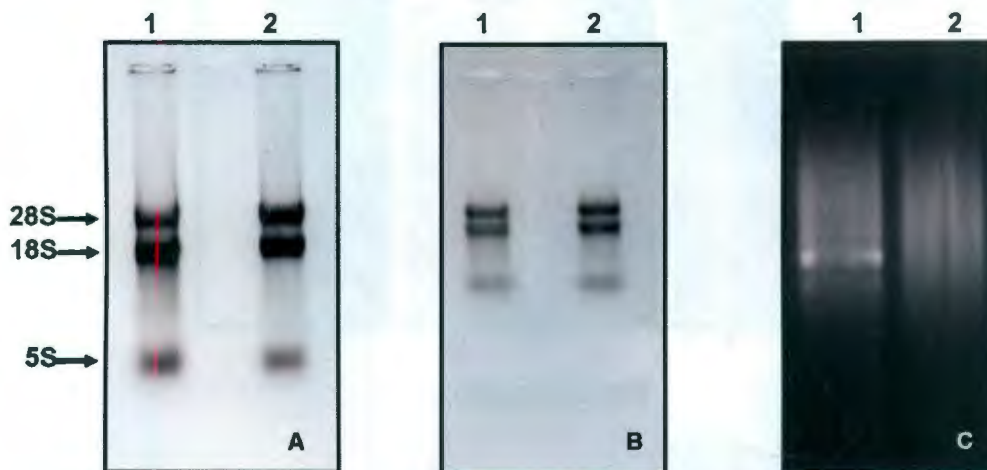


Figura 2.15 Calidad de extracción de ARN. Separación electroforética de las unidades 28, 18 y 5S ribosomales del ARN obtenido de suspensiones celulares de *C. arabica*. A) Extracción de ARN. 1-2 muestras de ARN (duplicados). B) Muestras de ARN sometidas a un tratamiento con DNasa I para eliminar el ADN presente y C) Síntesis de ADN complementario (ADNc). Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

El ARN extraído se trató con DNAsa I para eliminar toda contaminación de ADN genómico que pudiera interferir en la obtención de ADN complementario (ADNc), el resultado del tratamiento se observa en la figura 2.15B. El ARN libre de ADN se utilizó para la síntesis de ADNc, obteniéndose un buen producto de amplificación (Figura 2.15C). El ADNc se

utilizó en la amplificación por PCR de la región catalítica de la PLC, la cual posee un tamaño aproximado de 926 pb (Figura 2.16).

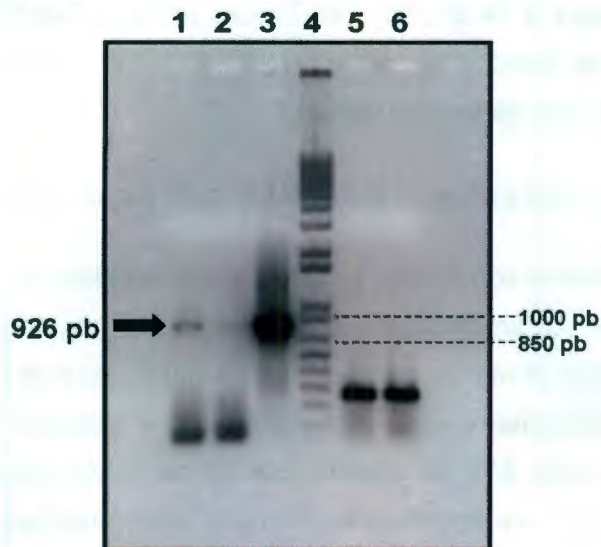


Figura 2.16 Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de la amplificación del fragmento correspondiente a la región catalítica de la PLC a partir de ADNc de suspensiones celulares de café con iniciadores FPLC926/RPLC926. Carril 1-2: Amplificación de un fragmento de 926 pb con ADNc; 3: Amplificación de ADN plasmídico como testigo; 4: Marcador de 1 Kb escalera (Invitrogen) y 5-6: Amplificación de un fragmento del gen de tubulina de 278 pb con iniciadores específicos (TubF/TubR).

2.2.5.1 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y amplificación por PCR

Para amplificar la región de interés primero se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc), el cual sirvió como templado para llevar a cabo la PCR. La síntesis de ADNc se realizó con el paquete comercial QIAGEN One Step RT-PCR, en donde en un solo paso se obtiene también la amplificación mediante PCR a una temperatura de alineamiento de 60°C, usando iniciadores específicos de PLC. Como testigos de la amplificación del fragmento catalítico de la PLC se utilizó como template el ADN plasmídico de bacterias que contienen el fragmento de 926 pb y ADNc amplificado con iniciadores específicos para el gen de la tubulina de café que amplifican un fragmento de 278 pb (Figura 2.16).

Como se observa en la figura 2.16, sí se logró la amplificación del fragmento correspondiente a la región catalítica de la PLC (carriles 1-2), el cual posee un tamaño ~926 pb el cual comigra a la posición del testigo positivo, (carril 3), los testigos del proceso de síntesis de ADNc y de amplificación (carriles 5-6) muestran que ambos procesos se llevaron a cabo de manera correcta.

2.2.5.2 Amplificación del extremo terminal 3' del gen de la PLC

El ARN tratado previamente con ADNsa se utilizó como template para la amplificación de los extremos terminales. La amplificación del extremo 3' del gen de la PLC de *C. arabica* se llevó a cabo utilizando como template el ADNc amplificado y que contiene el sitio de hibridación del 3'-RACE primer y como iniciador reverso el iniciador 3'GenRacer provisto en el paquete. En la figura 2.17 se observa que no se obtuvo amplificación con estos iniciadores. En contraste, la amplificación con los iniciadores del gen de la tubulina produjo un fragmento de 278 pb (Figura 2.17, carril 2), lo que nos indica que la síntesis de ADNc se realizó de manera correcta y que el ADNc está en buenas condiciones, resultados similares se obtuvieron al usar ADN plasmídico (ADNp, ADN obtenido de experimentos de transformación en *E. coli*) como template y los iniciadores PLCF926/PLCR926 que amplifican un fragmento de 926 pb (Figura 2.17, carril 4).

Los resultados mostraron que el proceso de PCR y los iniciadores funcionan de manera adecuada. Por ello se decidió repetir la amplificación, pero en esta ocasión se aumentó la temperatura de alineamiento de 60 °C a 65 °C. Se detectó inespecificidad ya que se observó un barrido, evento que indica que no hay especificidad en el proceso (Figura 2.18A). Un ensayo alterno consistió en variar las concentraciones de MgCl₂ a 1.5 y 2.5 mM (carriles 1-2 y 3-4, respectivamente) y adicionando el coadyuvante DMSO al 5% para la PCR (Fernandes-Oliveira de Miranda *et al.*, 2010). Bajo estas nuevas condiciones no se obtuvo amplificación (Figura 2.18B), y solo se observó cuando se utilizó el testigo positivo que corresponde a la amplificación del fragmento de 926 pb a partir de ADNp y los iniciadores específicos, carril 5.

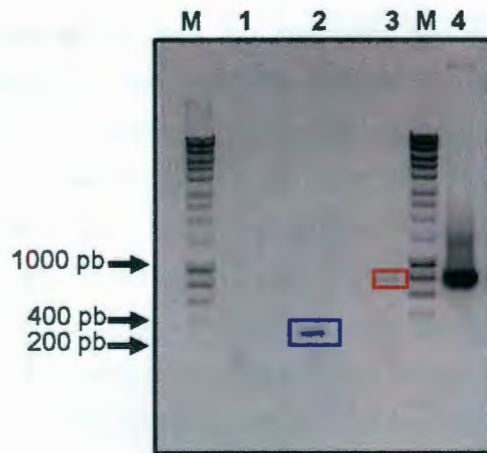


Figura 2.17 Amplificación mediante RACE del extremo 3'. Carril1: Amplificación con ADNc usando iniciadores específicos (FPLC926/3'GenRacer); 2: Amplificación del gen de tubulina (TubF/TubR); 3: Amplificación con ADNc usando iniciadores específicos (FPLC926/RPLC926); 4: Amplificación de ADNp con iniciadores específicos (FPLC926/RPLC926); M: Marcador de peso molecular HyperLadder I.

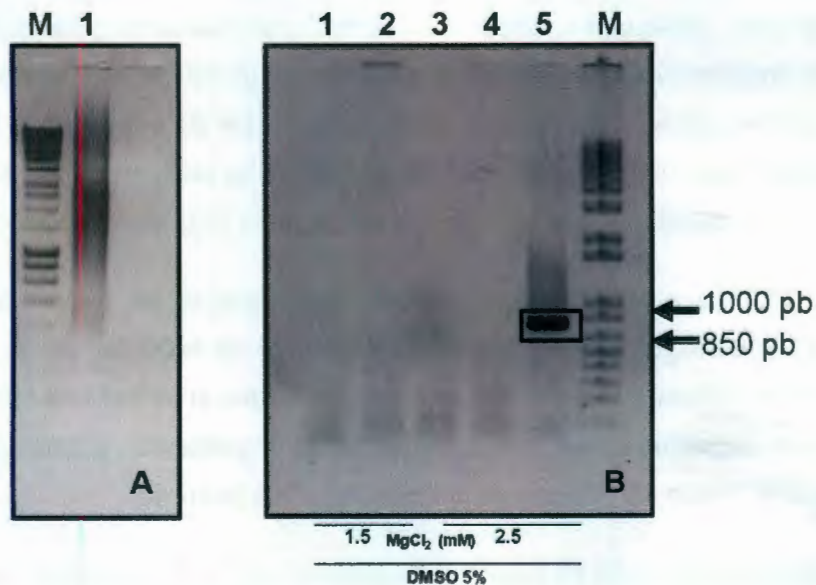


Figura 2.18 Amplificación del extremo 3' con iniciadores PLCF926 y 3' GenRacer primer. A) 1: Amplificación por PCR usando ADNc a 65°C. B) Efecto de la concentración de $MgCl_2$ y del DMSO en el proceso de amplificación usando ADNc, 1-2: 1.5 mM de $MgCl_2$ y 3-4: 2.5 mM de $MgCl_2$; 5: Amplificación de ADNp como testigo, todas las reacciones con DMSO 5%; M: Marcador de peso molecular HyperLadder I.

CAPÍTULO II

Con el fin de obtener amplificación del fragmento del extremo terminal 3' se utilizó el iniciador PLCF281, en combinación con el oligo dT como iniciador reverso. El resultado mostró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb (Figura 2.19, carril 1), mientras que al usar el iniciador PLCF926 con el oligo dT, no se observan fragmentos amplificados (carril 2). Esto pudiera deberse a que el fragmento producto de la amplificación sea de un tamaño muy grande y que la enzima Taq polimerasa no logre amplificarlo o concluir dicha amplificación. En los carriles 3 y 4 (Figura 2.19) se observa la amplificación de los testigos del fragmento correspondiente al sitio catalítico de la enzima; esto cuando se utilizó el par de iniciadores PLCF926/PLCR926 y como template ADNc de suspensiones celulares de *C. arabica*, este resultado nos indica que el producto se sintetizó de manera íntegra y que se encuentra en buenas condiciones y el ADNp como testigo de que la PCR se realiza de manera correcta, lo cual nos muestra que las condiciones de síntesis de ADNc y de PCR son las apropiadas.

Se realizó un alineamiento de la secuencia de los 9 genes presentes en *Arabidopsis thaliana* (Gray *et al.*, 2004) que codifican para la PLC y al analizarlos y compararlos con la secuencia del fragmento que codifica a la región catalítica se determinó el tamaño aproximado que se espera del producto, el cual resultó ser de entre 500 a 1000 pb, por ello es de esperar que el fragmento obtenido de 500 pb se encuentre dentro de la región que corresponde al extremo 3' del gen que codifica para la PLC presente en *C. arabica L.*

En la figura 2.20 se observa que al realizar un gradiente de temperatura con los iniciadores PLCF281/oligo dT, se amplificó un fragmento de 1000 pb, adicional al de 500 pb previamente amplificado. Este nuevo producto se obtuvo al utilizar una temperatura de 55.5 °C. En este experimento se usó como testigo la amplificación a partir de ADNp del fragmento de 926 pb con los iniciadores correspondientes (carril 6).

Los fragmentos de 500 y 1000 pb fueron purificados (Figura 2.21) y secuenciados. Con la secuencia de nucleótidos se llevó a cabo un análisis bioinformático usando el algoritmo blastx en la base de datos del NCBI que permitió comparar la secuencia de nucleótidos obtenida con las existentes en el banco de datos y conocer el porcentaje de identidad, además de las probables funciones que puedan tener.

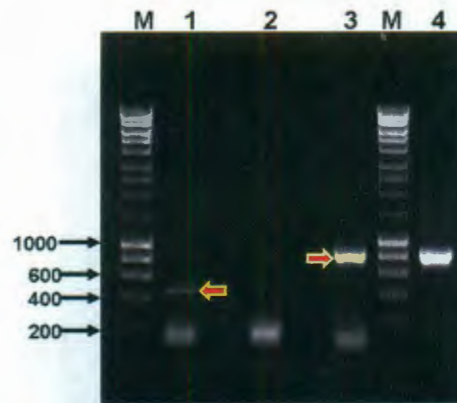


Figura 2.19 Amplificación a partir de ADNc del extremo 3' con los iniciadores PLCF281, PLCF926 y el oligo dT. Las flechas indican la amplificación de un fragmento de 500 y 926 pb. 1: Amplificación usando iniciadores PLCF281/oligo dT, 2: Amplificación usando iniciadores PLCF926/oligo dT, 3 y 4: Amplificación a partir de ADNc y ADNp como testigos, respectivamente, con iniciadores PLCF926/PLCR926, M: Marcador de peso molecular HyperLadder I.

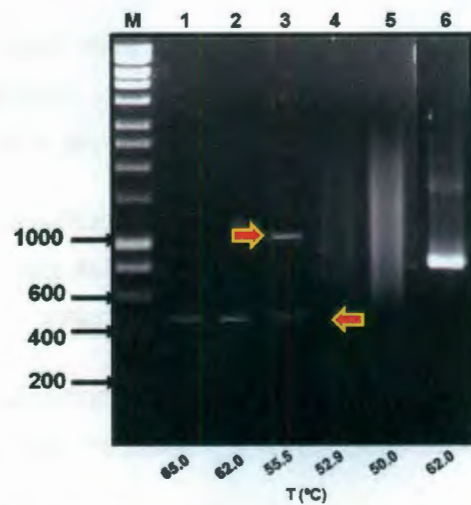


Figura 2.20 Amplificación por PCR en gradiente a partir de ADNc del extremo 3' con iniciadores PLCF281/oligo dT. Fragmentos de 500 y 1000 pb. 1-3: Fragmento de 500 pb; 3: Fragmento de 500 y 1000 pb; 4-5: Amplificación inespecífica, 6: amplificación con ADNp como testigo positivo usando iniciadores FPLC926/RPLC926 y M: Marcador de peso molecular HyperLadder I.

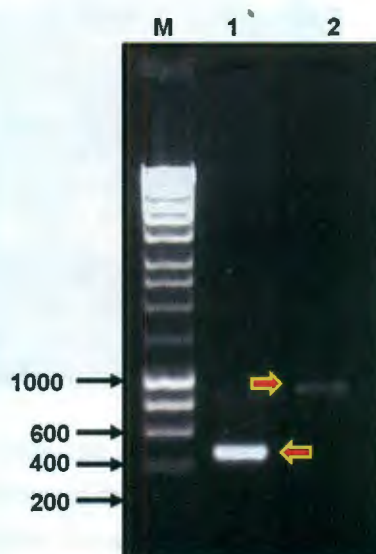


Figura 2.21 Purificación de los fragmentos de 500 y 1000 pb. Productos de PCR purificados con el paquete QIAEX II Gel Extraction (QUIAGEN). 1: Fragmento de 500 pb; 2: fragmento de 1000 pb y M: Marcador de peso molecular HyperLadder I.

Una vez que se conoció la secuencia de nucleótidos se pudo determinar que el fragmento de 500 pb tiene similitud con la región correspondiente que codifica para el sitio catalítico de la enzima y posee un 98% de identidad con esta secuencia, (cuadro 2.1).

De igual manera se puede observar que esta secuencia conserva un alto porcentaje de identidad con la secuencia de otras PLC de plantas, entre las que se pueden mencionar a las proteínas de *Glycine max*, *Vigna radiata* y *Ricinus communis*.

Cabe mencionar que la secuencia del fragmento correspondiente a 1000 pb no mostró similitud con alguna secuencia de nucleótidos que codifican para alguna PLC de plantas (cuadro 2.2).

Cuadro 2.1 Comparación por BLASTX de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 500 pb en la base de datos de genes del NCBI. Comparación en el Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) del fragmento obtenido de 500 pb.

Description	E value	Max ident
<i>Coffea arabica</i> phosphatidylinositol-specific phospholipase C mRNA, p	5e-169	98%
<i>Glycine max</i> phosphatidylinositol-specific phospholipase C mRNA, con	5e-169	98%
<i>Glycine max</i> phosphoinositide-specific phospholipase C P13 mRNA, cc	2e-152	95%
<i>Lotus japonicus</i> cDNA, clone: LjFL2-029-CA03, HTC	9e-52	92%
<i>Vigna radiata</i> plc3 gene for phospholipase C, exons 1-9	2e-23	83%
<i>Vigna radiata</i> L. Wilczek plc3 gene for phospholipase C, exons 1-9	2e-23	83%
<i>Vigna radiata</i> plc4 gene for phospholipase C, cultivar KP11	2e-23	83%
<i>Vigna radiata</i> plc gene for phospholipase C, exons 1-9, cultivar MN93	2e-23	83%
<i>Vigna radiata</i> plc gene for phospholipase C, exons 1-9, cultivar KP11	2e-23	83%
<i>Vigna radiata</i> phospholipase C (PLC3) gene, complete cds	2e-23	83%
<i>Populus trichocarpa</i> predicted protein, mRNA	6e-19	75%
<i>Lotus japonicus</i> genomic DNA, chromosome 2, clone: LjT45D08, TM0	1e-16	92%
<i>Ricinus communis</i> 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodi	2e-13	84%

Cuadro 2.2 Comparación por BLASTX de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 1000 pb en la base de datos de genes del NCBI. Comparación en el Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) del fragmento obtenido de 1000 pb.

Description	E value	Max ident
PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein LOC100265604, transc	0.0	82%
PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein LOC100265604, transc	0.0	82%
<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-18-G19	1e-147	79%
<i>Arabidopsis thaliana</i> adenosylhomocysteinase 2 (SAHH2) mRNA, com	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> putative S-adenosyl-L-homocysteinase (At3q23	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> AT3q23810/MYM9_15 mRNA, complete cds	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> S-adenosyl L-homocystein hydrolase (MYM9.16)	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> AT3q23810/MYM9_15 mRNA sequence	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> S-adenosyl L-homocystein hydrolase (MYM9.16)	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> AT3q23810/MYM9_15 mRNA, complete cds	1e-143	78%
<i>Arabidopsis thaliana</i> putative S-adenosyl-L-homocysteinase protein (p	5e-142	78%
<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X082002.13, whole genome shotgun sequer	2e-135	81%

2.2.5.3 Obtención del extremo terminal 5' del gen de la PLC

En lo que respecta a la amplificación del extremo 5' del gen de la PLC, se realizó una PCR en gradiente y con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y no se logró obtener amplificación correspondiente a la secuencia de este extremo.

2.3 DISCUSIÓN

La PLC es una enzima presente en hongos, bacterias, animales y vegetales, la cual lleva a cabo la hidrólisis de fosfolípidos constituyentes de la membrana celular, particularmente del PIP_2 , el cual es su sustrato y que al hidrolizarlo produce dos segundos mensajeros (el IP_3 y el DAG) que juegan un papel primordial en procesos vitales de señalización celular.

Los resultados de este estudio muestran que la PLC se ve afectada de manera diferencial cuando las células son sometidas a diferentes tipos de estrés, al observarse una movilización de esta enzima de un compartimento celular a otro. Cuando las células son sometidas a estrés salino, la enzima se encuentra más abundantemente en extracto total de células testigo y se puede observar claramente una redistribución en los diferentes extractos solubles, membranal y de citoesqueleto de células con tratamiento, lo cual puede indicar que la enzima sufre modificaciones en la compartimentalización de la misma que podrían estar regulando su actividad. Nuestros resultados sugieren que este proceso de translocación de compartimentos celulares de la PLC pudiera ser un factor determinante en la regulación de la enzima bajo diferentes condiciones. Este proceso regulatorio ha sido reportado para otras proteínas que responden a condiciones extremas como son las proteínas Heat Shock en diferentes especies de plantas (Wang *et al.*, 2004).

La cuantificación de la actividad enzimática reveló que al someter a las células a un estrés iónico provocado por el NaCl, se incrementa la actividad de la PLC y cuando son sometidas a un estrés de tipo osmótico la actividad de esta enzima baja drásticamente, esto se puede observar de mejor manera comparando la actividad enzimática con la intensidad de la banda correspondiente, tal como se muestra en la Figura 2.9 en donde la intensidad de banda en las células testigo es mucho más intensa que la de las células que fueron tratadas con NaCl y respecto de la actividad enzimática (Figura 2.10) en las fracciones de extracto total, soluble y membranal se ve incrementada la actividad, lo cual no se observa en citoesqueleto, sino que la actividad disminuye casi tres veces y

observando la Figura 2.9 la parte de la fracción correspondiente a esta fracción se ve una disminución en la intensidad de banda.

Para determinar si el efecto observado en las células que se trataron con NaCl es causado por estrés iónico y no de tipo osmótico, se realizó el mismo experimento tratando a las células con manitol, como se describe en la sección 2.1.2 y se pudo observar que prácticamente la intensidad de la banda correspondiente a ~67 kDa disminuye de manera considerable en todas las fracciones celulares (extracto total, soluble, membranal y de citoesqueleto) tanto en las células testigo como en las tratadas con manitol (Figura 2.11), pero sorprendentemente la banda de peso molecular ~38 kDa de la fracción de citoesqueleto aumenta su intensidad enormemente, con respecto a la cuantificación de actividad enzimática de las células en este experimento, en todas las células testigo la actividad fue de casi cinco veces más en las fracciones de extracto total, soluble y citoesqueleto, en tanto en la fracción membranal es casi el doble con respecto de las células tratadas, analizando ambos resultados (el tratamiento con NaCl y manitol) podemos decir que efectivamente el estrés de tipo iónico provoca un aumento de la actividad de la enzima PLC cuando las células son sometidas a esta condición.

¿Qué sucede cuando las células son sometidas a un estrés por $AlCl_3$? ¿Existirá una redistribución como se observó anteriormente? ¿La actividad de la enzima PLC se verá afectada por este metal? Analizando los resultados obtenidos, (Figura 2.13), podemos ver que la intensidad de banda de ~67 kDa resulta más intensa en las fracciones de extracto total, soluble, membranal y de citoesqueleto de las células tal como se observó en células tratadas con manitol que la intensidad de la banda de ~38 kDa aumenta su intensidad en la fracción de citoesqueleto en células sometidas a un estrés por $AlCl_3$ sucede lo mismo aunque en menor grado, observando la Figura 2.14 correspondiente a la cuantificación de la actividad enzimática de las células que fueron sometidas a estrés por $AlCl_3$ en todas las fracciones, extracto total, soluble, membranal y de citoesqueleto la actividad decrece en las células tratadas, por lo que se concluye que efectivamente el $AlCl_3$ afecta la actividad de la enzima PLC, provocando una ligera disminución de su actividad, además de una redistribución de la enzima entre los diferentes compartimentos, encontrándose más abundantemente en las fracciones de los extractos de las células testigos. Sin embargo, para poder corroborar esta aseveración sería necesario realizar el análisis con una

proteína constitutiva. En otros modelos como son las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, se ha sugerido que la PLC podría ser traslocada del citosol a la membrana de acuerdo al día de cultivo que se trate y por lo tanto del estado fisiológico del mismo como fue observado por De Los Santos-Briones C. *et al.*, (1996). También en estudios de cinética enzimática en monocapa los resultados muestran que la PLC puede estar anclada a la superficie de la monocapa dependiendo de las condiciones de ensayo, lo que apoya el hecho de que esta enzima pueda tener un dominio que le permite movilizarse en diferentes compartimientos celulares (Hernández-Sotomayor *et al.*, 1999).

Cuando las células se someten a un estrés por metales, en este caso al usar AlCl_3 , la actividad de la enzima PLC se inhibe en menor porcentaje que como se observó con el estrés osmótico provocado por el manitol.

Este efecto de inhibición de la actividad de la enzima PLC por metales ya había sido observado en extractos totales de suspensiones celulares por Martínez-Estévez *et al.*, 2003, quien realizó un tratamiento de dosis respuesta de este metal durante un ciclo de cultivo y observó que en periodos cortos (1 min) las células expuestas a aluminio incrementaban la actividad de la PLC y la formación de IP_3 aumentaba al doble, por otro lado en periodos largos la actividad de la PLC era inhibida por más del 50%, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo donde se observó que el aluminio afecta la actividad de la enzima PLC. Aun no se tiene conocimiento de si el aluminio puede estar interactuando de manera directa con la PLC o lo haga de manera indirecta a través de la ruta de los fosfoinosítidos, vía en la cual la PLC está íntimamente relacionada, pero lo que si es claro es que este metal produce un efecto en la enzima.

En base a los resultados obtenidos y revisando la literatura se sabe que los fosfolípidos juegan un papel esencial en los procesos de transducción de señales, específicamente en el sistema de cascada de señales fosfolipídica, el cual está relacionado con otros sistemas de transducción de señales por medio de la generación de segundos mensajeros y de proteínas como las cinasas, canales iónicos, fosfatasa, reguladores de transcripción etc. El resultado de la interacción de los sistemas de transducción de señales pueden alterar el metabolismo celular de una manera directa o indirecta, además la cascada de señales fosfolipídica puede ser activada por estrés hídrico, salino, metales o ataque de patógenos (Liscovitch *et al.*, 2000; Meijer y Munnik, 2003; Chun-Rong *et al.*,

2008).

Estando conformada la estructura de la membrana celular principalmente por fosfolípidos, DeWalt *et al.*, 2001 y Munnik, 2001 mencionan que uno de los primeros componentes del sistema de transducción de señales fosfolípida como lo son los PPI, están involucrados en diferentes procesos de señalización celular, resultado de diferentes tipos de estrés, tales como el estrés salino, el cual provoca un rápido incremento en los niveles de PIP₂, este PIP₂ además de ser un precursor de DAG y de IP₃ juega un rol crucial en varios procesos de señalización celular, por si mismo puede regular de manera directa proteínas y enzimas que se involucran en procesos como crecimiento y desarrollo celular, ataque de patógenos, tráfico vesicular etc, y las cuales poseen en su estructura dominios de unión a PPI como: dominios PH, C2, Tubby (TULP-core) y en donde la interacción con los PPI pueden provocar cambios en la localización, la estructura o propiamente la actividad de la enzima. Por ejemplo, puede unirse a la actina provocando una reorganización del citoesqueleto (Honda *et al.*, 1999; Meijer y Munnik 2003), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en donde al someter a las células a estrés por NaCl y AlCl₃ se observa una translocación de la enzima PLC entre los diferentes compartimentos y sobre todo la manera en como se ve afectada su actividad enzimática.

La parte correspondiente a la obtención de la secuencia completa de la proteína, mediante el uso de herramientas moleculares no rindió los resultados esperados, debido a que se presentaron algunas fallas en la parte de la amplificación de los fragmentos. La amplificación del extremo 3' del gen produjo dos fragmentos, uno de los cuales guarda similitud con la secuencia del gen que codifica para la PLC, al tratar de amplificar el extremo correspondiente al 5' de la secuencia del gen, se tuvieron problemas con las temperaturas de alineamiento de los iniciadores, motivo por el cual no se lograron obtener fragmentos amplificados del gen correspondiente.

Los resultados de este trabajo representan el primer reporte en el cual se estudió a nivel de diferentes compartimentos celulares (extracto total, soluble, membranal y de citoesqueleto) la presencia de la PLC con anticuerpos específicos. Además se reveló una redistribución de la enzima entre los diferentes compartimentos celulares analizados, misma que no había sido descrita. La actividad enzimática detectada en dichas

CAPÍTULO II

fracciones permite suponer como se comporta la PLC bajo condiciones de estrés, dando pauta a continuar con futuras investigaciones para conocer las formas de cómo puede estar siendo regulada esta enzima en la célula y de las proteínas con las que pueda estar interactuando.

Para ilustrar la manera de cómo es afectada la ruta de señalización fosfolipídica en la célula cuando es afectada por estrés salino (NaCl) y metales ($AlCl_3$), se diseñó el siguiente modelo donde podemos observar los posibles blancos de estos dos compuestos y de sus posibles efectos en diferentes procesos celulares (Figura 2.22). Probablemente el NaCl interactúe con un receptor de membrana que desencadena una serie de señales y de esta manera la PLC se vea afectada, por otro lado el $AlCl_3$ quizás esté regulando a la PLC por medio de un receptor o de manera directa, además puede estar interactuando de algún modo con el PA, el PA que se produce está involucrado en los procesos provocados por diferentes tipos de estrés, uniéndose a otras proteínas y regulando la transcripción de genes, pero de esto no se tiene mucho conocimiento (Van Schooten *et al.*, 2006; Arish *et al.*, 2009), por lo que se requiere de mayor análisis para conocer realmente de que manera este metal afecta a la PLC o al PA y como se mencionó anteriormente, es claro que cuando una célula es afectada por un tipo de estrés la ruta de señalización de los fosfolípidos también sufre modificaciones y con ello la actividad de la PLC resulta afectada además de su localización, ya que se observó una translocación de la enzima entre los diferentes compartimentos como respuesta al tipo de estrés al que fue sometida.

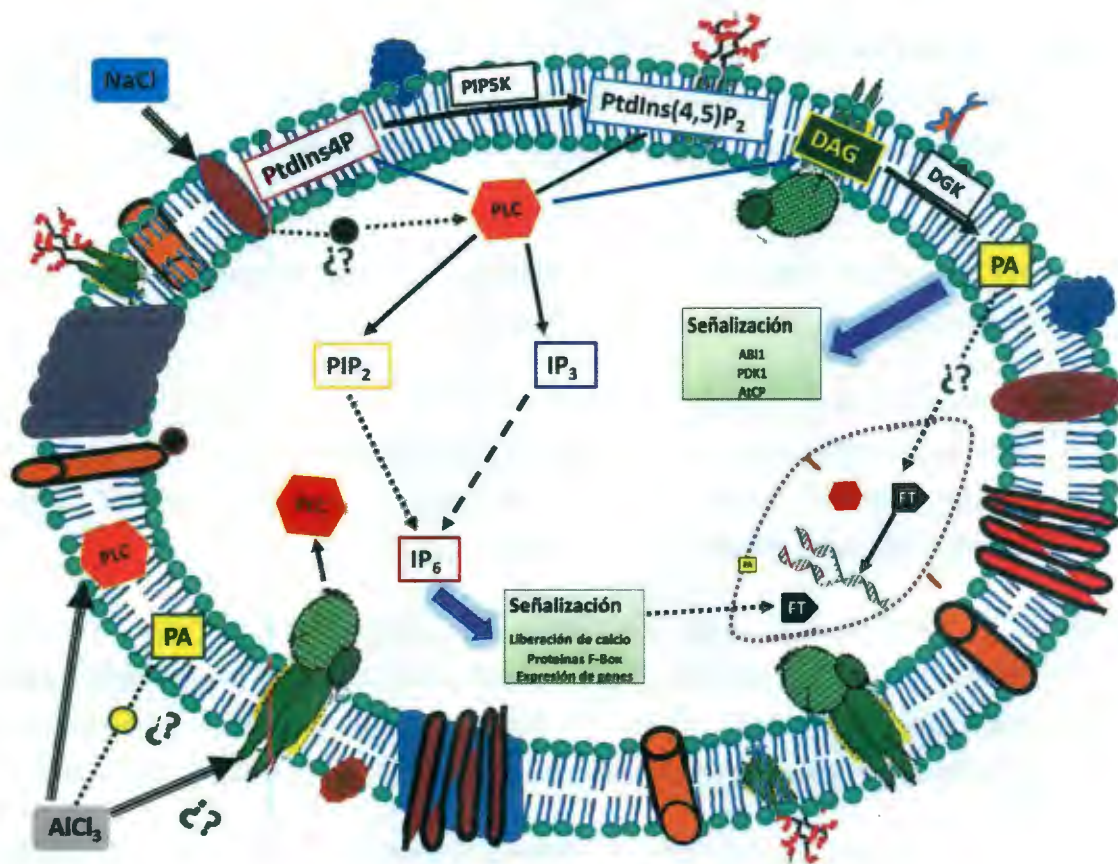


Figura 2.22 Hipótesis de cómo las vías de señalización fosfolípídicas son afectadas por el NaCl y el AlCl_3 . El NaCl provoca un efecto en la PLC quizás mediante un receptor de membrana, desencadenando una serie de procesos que terminan en la regulación la actividad de la PLC, en tanto el AlCl_3 no se tiene conocimiento si regula la actividad de la PLC a través de un receptor o de manera directa. PtdIns4P: fosfatidilinositol-4-fosfato; PI5K: Fosfatidilinositol-5-cinasa; PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; DAG: Diacilglicerol; DGK: Diacilglicerol cinasa; PA: Acido fosfatídico; Ins(1,4)P₂: Inositol-1,4-bisfosfato; IP₃: Inositol-1,3,5-Trifosfato; IP₆: Inositol hexafosfato o ácido fítico FT: Factores de transcripción.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernandes-Oliveira de Miranda V., Vanderlei G.M., Antonio F. y Mauricio B. Jr. (2010). Plant or Fungal Sequences? An Alternative Optimized PCR Protocol to Avoid ITS (nrDNA) Misamplification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 141-152.69.
- Arish S.A., Testerink C. y Munnik T. (2009). Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791: 869-875.
- De los Santos-Briones C., Muñoz-Sánchez J.A., Chín-Vera J., Loyola-Vera V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1996). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate – Phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *Journal of Plant Physiology*. 150: 707-713.
- DeWalt D.B., Torabinejad J., Jones C.A., Shope J.C., Cangelosi A.R., Thompson J.E., Prestwich G.D. y Hama H. (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlated with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 126: 759-7.
- Chun-Rong W., Ai-Fang Y., Gui-Dong Y., Quiang G., Hai-Ying Y. y Ju-Ren Z. (2008). Enhanced expression of phospholipase C 1 (*ZmPLC1*) improves drought tolerance in transgenic maize. *Planta*. 227: 1127-1140.
- Hernández-Sotomayor T.H.S., De los Santos-Briones C., Muñoz-Sánchez J.A. y Loyola-Vargas V.M. (1999). Kinetic analysis of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots using different assays. *Plant Physiology*. 120: 1075 – 1081.
- Honda A., Nogami M., Yokozeki T., Yakamazu M., Kakamura H., Watanabe H., Kawamoto K., Nakayama K., Morris A.J., Frohman M.A. y Kanaho Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphato 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*. 99: 521-532.
- Homma Y., Imaki J., Nakanishi O. y Takenawa T. (1988). Isolation and characterization of

- two different forms of inositol phospholipid-specific phospholipase C from rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 6592-6595.
- Kim Y.J., Kim J.E., Lee J.H., Lee M.H., Jung H.W., Bahk Y.Y., Hwang B.K., Inhwan Hwang I. y Kim W.T. (2004). The Vr-PLC3 gene encodes a putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose expression is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Febs Letter*. 556:127-136.
- Kopka J., Pical C., Gray J.E. y Muller-Robert B. (1998). Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiology*, 116: 239-250.
- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G. y Tang X (2000). Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochemical Journal*. 345: 401-415.
- Martínez-Estévez M., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity on cellular suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Report*, 20: 469-474.
- Martínez-Estévez M., Racagni-Di Palma G., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M., Brito-Argáez L. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1297-1303.
- Meijer H.J.G. y Munnik T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 256-306.
- Munnik T. (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science*. 6: 227-233.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15:608-612.
- Sánchez-Cach L.A., Ortiz-García M.M., Minero-García Y., Muñoz-Sánchez J.A., Hernández-Sotomayor S.M.T., Suárez-Solís V.M. y De los Santos-Briones C.

- (2008). Isolation of cDNA encoding the catalytic site of phosphatidylinositol specific phospholipase C from *Coffea arabica* L. *Plant Signaling & Behavior*, 3: 913-916.
- Shu P.G., Ryu S.H., Moon K.H., Shu H.W. y Rhee S.G. (1988). Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C. *Cell*, 54: 161-169.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Garner F.H., Provencano M.D., Fujimoto E.K., Goeke M.N., Olson B.J. y Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Van Schooten B., Testerink C. y Munnik T. (2006) Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 151-159.
- Venkataraman G., Goswami M., Tuteja N., Reddy M.K. y Sopory S.K. (2004). Isolation and characterization of a phospholipase C delta isoform from *pea* that is regulated by light in a tissue specific manner. *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 378-386.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. y Altman A. (2004). Role of plant heat proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 9: 244-252.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

- Se logró inmunodetectar a la proteína PLC con el anticuerpo α -CaPLC en diferentes extractos proteicos de suspensiones celulares de *C. arabica* L.
- Dos proteínas de 67 y 38 kDa respectivamente, fueron detectadas en las diferentes fracciones celulares, de la cual la de 67 kDa podría corresponder a la PLC y en tanto la de 38 kDa podría tratarse de un producto de procesamiento de la enzima.
- Bajo los diferentes tipos de estrés a los que fueron sometidas las suspensiones celulares, la PLC mostró una distribución diferencial, siendo evidente que sí existe una translocación de la proteína dentro de la célula, dependiendo del estrés al que ésta sea sometida.

3.2 PERSPECTIVAS

- ❖ Obtener la secuencia completa de la proteína que permita hacer estudios más finos de translocación.
- ❖ Estudiar el efecto de inhibidores de la PLC que permitan analizar el comportamiento de la enzima y de cómo puede translocarse en los diferentes compartimentos celulares.
- ❖ Realizar una electroforesis en doble dimensión, que permita obtener más información acerca de las proteínas de 67 y 38 kDa inmunodetectadas con el anticuerpo α -CaPLC.
- ❖ Llevar a cabo un análisis de expresión con una proteína constitutiva y el anticuerpo correspondiente que permitan determinar los niveles de expresión.