

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	
I.1. Señales de transducción.....	3
I.2. Señales de transducción en plantas.....	4
I.3. Fosfolípidos de inositol.....	4
I.4. Fosfolipasa C.....	5
I.5. Fosfolipasa C de <i>Catharanthus roseus</i>	7
I.6. Clasificación y características estructurales.....	9
I.7. Regulación del sistema PLC-fosfoinosítidos.....	10
I.8. Proteínas G.....	11
I.9. Características y clasificación.....	11
I.10. Regulación de la PLC por las subunidades $\beta\gamma$	16
I.11. Nucleótidos de guanina y análogos no hidrolizables.....	16
I.12. Modificación covalente por ADP-Ribosilación con .toxinas bacterianas.....	19
I.13. Mastoparan.....	20
I.14. Hormonas vegetales.....	21
I.15. Auxinas.....	22
I.16. Cultivo de tejidos vegetales.....	24
I.17. <i>Catharanthus roseus</i>	25
I.18. Modelo de estudio.....	26
CAPÍTULO II	
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	28

OBJETIVOS.....	29
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y MANTENIMIENTO	
III.1.1. Raíces transformadas.....	31
III.2. METODOLOGÍA	
III.2.1. Obtención del extracto celular.....	31
III.2.2. Determinación de la concentración de proteína.....	33
III.2.3. Medición de la actividad enzimática de la PLC.....	34
III.2.4. ADP-Ribosilación.....	36
III.2.5. Activación de toxinas.....	37
III.2.6. Electroforesis.....	38
III.2.7. Revelado de películas de autoradiografía.....	39
III.2.8. Impresión de fotografías.....	39
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV.1. Efecto del NaF en la actividad de la PLC.....	41
IV.2. Efecto de diferentes tiempos de incubación en presencia de AlF_4^- en la actividad de la PLC.....	41
IV.3. Efecto de diferentes análogos de GTP en la actividad de la PLC.....	44
IV.4. Efecto de otros agentes sobre la actividad de la PLC.....	46
IV.5. Efecto del mastoparan sobre la actividad de la PLC.....	48
IV.6. Relación entre el NaF y la dependencia de Ca^{2+} en la actividad de la PLC.....	50
IV.7. Relación entre el MgCl_2 y el $\text{GTP}\gamma\text{S}$ sobre la actividad de la PLC.....	50

IV.8. Efecto del ácido indol acético en la actividad de la PLC y su posible regulación por proteínas G.....	52
IV.9. Efecto de la modificación con toxinas bacterianas sobre la actividad de la PLC.....	54
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

RESUMEN

La Fosfolipasa C (PLC) tiene una función importante en los mecanismos de transducción de señales por los cuales la célula responde a las diferentes señales extracelulares a través de la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana plasmática; las distintas isoenzimas de la PLC son reguladas de manera diferente por mecanismos que involucran receptores acoplados a proteínas G o bien receptores con actividad de tirosina cinasas.

Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por las subunidades α , β y γ ; la subunidad α presenta un sitio de alta afinidad por nucleótidos de guanina; en algunos casos, la subunidad α puede ser modificada de manera covalente por toxinas bacterianas de *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis*. Se conocen ya varios sistemas de transducción de señales acoplados a proteínas G, incluyendo el de la PLC.

En raíces transformadas de *Catharanthus roseus* (*C. roseus*) se han identificado proteínas con actividad de PLC, también se ha demostrado la existencia de proteínas G. Con la presencia de éstas proteínas en este modelo, se genera el interés por estudiar como se encuentra regulada la PLC a través de las proteínas G.

Existen algunos reportes de regulación de la PLC por proteínas G, ya sea por estimulación de un receptor acoplado a una proteína G, por adición de análogos no hidrolizables de GTP o por ADP-ribosilación de la subunidad α . En este trabajo, se evalúa el efecto de diferentes activadores de proteínas G tales como nucleótidos de guanina no hidrolizables; sales de flúor; y auxinas; así como la modificación covalente con toxinas del cólera y pertussis, sobre la actividad de la PLC, en raíces transformadas de *C. roseus*.