

ÍNDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
1.-ANTECEDENTES	
1.1.-CAFÉ	3
1.1.1.-Importancia del café	3
1.1.2.-Requerimientos en el suelo para el cultivo	3
1.2.-EL GENOMA	4
1.2.1.-Los genes y las proteínas	4
1.2.2.-El genoma de arabidopsis y arroz	5
1.3.-CULTIVOS DE CÉLULAS <i>in vitro</i>	6
1.4.-TOXICIDAD DE LOS METALES	8
1.5.-LA MEMBRANA PLASMÁTICA	9
1.6.-LAS FOSFOLIPASAS	11
1.6.1.-La fosfolipasa C (PLC)	12
1.6.2.-La PLC en mamíferos	12
1.6.3.-Características estructurales de las fosfolipasas C	13
1.6.3.1.-Dominios comunes	14
1.6.3.1.1.-Dominios X y Y	14
1.6.3.1.2.-Dominios PH	14
1.6.3.1.3.-Dominios EF-“hand”	15
1.6.3.1.4.-Dominios C2	15
1.6.3.2.-Dominios específicos	16
1.6.3.2.1.-Dominios SH2 y SH3	16
1.6.3.2.2.-Extensión C-terminal de la PLC- β	16
1.6.3.2.3.-Dominios RasGEF y Ra de la PLC- ϵ	17
1.7.-MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PLC	17
1.7.1.-Activación por receptores con actividad de tirosina cinasa	17
1.7.2.-Activación por receptores acoplados a proteínas G	18

1.7.3.-Activación de la PLC- δ	19
1.7.4.-Activación de la PLC- γ	20
1.7.5.-Activación de la PLC- ϵ	20
1.8.-FUNCIÓN DE LA PLC	21
1.9.-LA PLC EN PLANTAS	22
1.9.1.-La PLC en cafeto	25
2.-OBJETIVO GENERAL	27
2.1.-Objetivos particulares	27
3.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
4.-METODOLOGÍA	29
4.1.-Cultivo de células de cafeto en suspensión	29
4.2.-Cosecha celular	29
4.3.-Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) Total	29
4.4.-Electroforesis de Ác. Nucleicos en geles de agarosa	30
4.5.-Preparación de ADN complementario (ADNc) para la Amplificación Rápida de los Extremos terminales (RACE) 3' Y 5'	31
4.5.1.-Desfosforilación del ARN	31
4.5.2.-Eliminación de la estructura "CAP" del ARN mensajero (ARNm) desfosforilado	33
4.5.3.-Ligación del oligonucleótido GeneRacer al extremo 5' sin la estructura "CAP"	34
4.6.-Síntesis del ADNc por transcripción reversa	35
4.7.-Amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
4.7.1.-Amplificación del extremo terminal 5'	36
4.7.2.-Amplificación del extremo terminal 3'	37
4.8.-Secuenciación	38
4.9.-Clonación	38
4.9.1.-Ligación	39
4.9.2.-Transformación	39
4.9.3.-Análisis de las colonias positivas	40
4.9.3.1.-Aislamiento y purificación de ADN plasmídico	40

4.9.3.2.-Amplificación por la PCR	41
4.9.3.3.-Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción	42
5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1.-Extracción de ARN total	43
5.2.-Cuantificación de ARN total	43
5.3.-Síntesis de ADNc para la Amplificación Rápida de los Extremos terminales (RACE) 5' y 3'	44
5.4.-Amplificación del extremo 5' del gen de la PLC por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	45
5.4.1.-Ligación del fragmento amplificado (5'-PLCC α ; potencial candidato extremo terminal 5' del gen de la fosfolipasa C de células en suspensión de cafeto) en el vector pCR [®] 4-TOPO [®]	47
5.4.2.-Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i> One Shot TOP10 con 5' PLCC α ::TOPO	48
5.4.3.-Minipreparación de ADN por lisis alcalina de las clonas transformadas y seleccionadas que incluyen 5' PLCC α -TOPO	49
5.4.4.-Análisis por PCR de 5' PLCC α -TOPO en la clona 6	50
5.4.5.-Digestión del ADN plasmídico de la clona 6 5'PLCC α -TOPO	52
5.4.6.-Purificación de ADN plasmídico que incluyen los insertos XY-TOPO y 5'PLCC α -TOPO (Clonas 1 y 6)	54
5.5.-Amplificación del extremo 3' del gen de la PLC por la Reacción en Cadena de la Polimerasa	54
6.-CONCLUSIONES	56
7.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMEN

El conocimiento de la secuencia de bases que codifica una molécula de una proteína funcional representa un gran avance para la ciencia básica pues, a pesar de ocupar un pequeño espacio en el cromosoma, contiene suficiente información de la que se derivan respuestas para una gran variedad de preguntas como por ejemplo: ¿Cuál es el origen de algunas enfermedades hereditarias?, ¿Por qué algunos organismos tienen características diferentes en su desarrollo?, ¿Por qué unos organismos son inmunes a enfermedades y otros no? La importancia de este conocimiento radica en la aportación de las herramientas necesarias para resolver los problemas que se presentan para una mejor manera de sobrevivencia. El presente trabajo se refiere a una de las estrategias establecidas para el conocimiento de la secuencia de un gen; particularmente, el gen que codifica una enzima que se encuentra involucrada en algunos procesos celulares de las plantas.

Se utilizó la técnica conocida como Amplificación rápida de los extremos terminales (RACE por sus siglas en inglés; Rapid Amplification of cDNA Ends) para completar la secuencia de un gen de la fosfolipasa C (PLC) de células en suspensión de cafeto. Se sintetizó el ADNc por transcripción reversa a partir de ARN total de células en suspensión de 14 días de cultivo. La síntesis del ADNc se realizó incluyendo secuencias de nucleótidos conocidas tanto en el extremo 5' como en el 3' que posteriormente se utilizaron como sitio de anclaje para los cebadores específicos. La Amplificación se realizó por la PCR utilizando cebadores (en sentido y antisentido) específicos para la fosfolipasa C en combinación con un cebador (en sentido y antisentido) específico para la secuencia ligada al ADNc sintetizado. En los experimentos para la amplificación rápida del extremo 5', se obtuvo la amplificación de un fragmento de aprox. 1100 pb cumpliendo nuestras expectativas. Este fragmento se clonó, se analizó y actualmente se encuentra en secuenciación. En relación a los experimentos de RACE 3', no se obtuvieron resultados favorables