

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

TESIS

**“Sincronización de Células de Tabaco
(*Nicotiana tabacum*) Línea Celular NT-1”**

Que para obtener el Grado de:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Ing. Biotec. Amb. León Francisco Ruíz Herrera

Director de Tesis:

D.C. Marco Aurelio Pardo Galván

Coasesora:

D.C. Elda María Beltrán Peña

Morelia, Mich., Junio de 2007

INDICE TEMÁTICO

Capítulo I	Introducción	1
1.1.	Ciclo Celular en Eucariontes	1
1.1.1.	Puntos de Control del Ciclo Celular	2
1.1.2.	Ciclo Celular en Plantas	6
1.1.3.	Transiciones en el Ciclo Celular Vegetal	7
1.1.3.1.	Transición $G_1 \rightarrow S$	8
1.1.3.2.	Transición $G_2 \rightarrow M$	9
1.2.	Cultivos de Células en Suspensión	12
1.2.1.	Origen y Usos de la Línea Celular NT-1	13
1.2.3.	Características de la Línea Celular NT-1	13
1.3.	Sincronización de Cultivos Celulares en Suspensión	14
1.3.1.	Sincronización por Inducción: Consideraciones Generales	15
1.3.2.	Monitoreo del Nivel de Sincronía	15
1.3.3.	Métodos Indirectos de Sincronización por Inducción	17
1.3.4.	Métodos Directos de Sincronización por Inducción	20
1.3.4.1.	Bloqueadores de las Transiciones G_1/S y G_2/M	21
1.3.4.2.	Bloqueadores del Huso Mitótico	22
1.3.4.3.	Inhibidores de la Síntesis del DNA	24
1.4.	Síntesis de Proteínas	27
1.4.1.	Características de eIF3 en Plantas	29
1.4.2.	Antecedentes de la Función de eIF3f	31
Capítulo II	Hipótesis y Objetivos	33
2.1.	Hipótesis	33
2.2.	Objetivo General	33
2.3.	Objetivos Específicos	33
Capítulo III	Estrategia Experimental	34
Capítulo IV	Materiales y Métodos	35
4.1.	Cultivo Celular en Suspensión de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>), Línea Celular NT-1	35
4.1.2.	Mantenimiento de la Línea Celular NT-1	35
4.1.2.	Medio LS Modificado	35
4.2.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Afidicolina	36

4.3.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 por Privación de Auxina	36
4.4.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 por Privación de Sacarosa	37
4.5.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 por Privación de Sacarosa e Incubación con Sorbitol	37
4.6.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Hidroxiurea	38
4.7.	Colecta, Fijación y Tinción de las Células	39
Capítulo V	Resultados y Discusión	40
5.1.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Afidicolina	40
5.2.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Privación de Auxina	41
5.3.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Privación de Sacarosa	43
5.4.	Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Hidroxiurea	46
Capítulo VI	Conclusiones	53
	Bibliografía	54

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo Celular en Eucariontes

El ciclo celular es el periodo que transcurre de una división a la siguiente. Cada célula es el producto de un ciclo celular, el cual comprende la secuencia ordenada de los eventos $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ (Figura 1.1), donde una célula eucarionte duplica sus cromosomas y se divide en dos células. Una visión global del ciclo celular permite observar cómo la célula transcurre por dos grandes etapas: la división celular, o fase M, y la interfase (que comprende las fases G_1 , S y G_2) (Buchanan *et al.*, 2000; Morgan, 2007).

La interfase, tiempo que transcurre entre dos divisiones celulares, es el lapso más prolongado del ciclo celular. Durante la fase G_1 (G de *gap*) se sintetizan materiales, como RNA y proteínas; en la fase S o de síntesis se produce la replicación del DNA, además se sintetizan algunas proteínas como las histonas. Una vez finalizada la replicación, la célula entra en la fase G_2 donde se sintetizan compuestos necesarios para la división y se inicia la condensación gradual de la cromatina, que se completa en las primeras etapas de la mitosis dando lugar a cromosomas visibles al microscopio, mostrando su aspecto típico de dos cromátidas y cuatro brazos (Buchanan *et al.*, 2000; Dashek and Harrison; 2006; Morgan, 2007).

La fase M es el periodo más corto del ciclo celular, durante el cual tiene lugar la mitosis (o cariocinesis), es decir la división nuclear y la citocinesis, y la división de la célula (que previamente ha duplicado su material genético y citoplasmático) en dos células hijas idénticas. La mitosis se divide en cuatro etapas: (1) profase, donde la cromatina se condensa hasta formar los cromosomas, dejan de observarse los nucleolos, aparece el huso mitótico, comienza a disgregarse la membrana nuclear, se ven por primera vez las dos cromátidas de cada cromosoma y los cromosomas migran hacia el plano ecuatorial de la célula; (2) metafase, los cromosoma totalmente condensados aparecen alineados en el plano ecuatorial, independientes unos de otros; (3) anafase, los cromosomas se dividen por sus centrómeros, separándose en dos cromátidas, que son desplazadas hacia polos opuestos de la célula, cabe mencionar que cada cromátida es ya un cromosoma hijo independiente; y (4) telofase, comienzan a descondensarse los cromosomas y se forman membranas nucleares para delimitar dos núcleos. Paralelamente, la membrana nuclear separa el citoplasma en dos partes, cada una con un

núcleo y la mitad de los orgánulos, formando dos células hijas, en el proceso llamado citocinesis (o citoquinesis) (Dashek and Harrison 2006; Morgan, 2007).

1.1.1. Puntos de Control del Ciclo Celular

Los puntos de control, o puntos de revisión (*checkpoints*), se definen como los instantes del ciclo celular eucarionte en los que puede detenerse la progresión de una célula hasta que las condiciones celulares sean las adecuadas. Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada, puede producirse daño genético y/o celular. Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en al menos cuatro puntos de control bien definidos (Figura 1.1). Los dos puntos de control principales se sitúan en las transiciones G_1/S y G_2/M , mientras que los dos puntos de control restantes se localizan en la mitosis, entre la metafase y la anafase y entre la anafase y la telofase (Karp, 2005; Lodish *et al.*, 2005; Morgan, 2007). Para que se den los diferentes puntos de control debe existir un mínimo de tres actividades moleculares (síntesis de nuevas proteínas, proteólisis dirigidas y activaciones reversibles) y la característica que tienen en común estas actividades es que ellas son controladas por procesos de fosforilación. La simbología con que se designan los componentes que regulan el ciclo celular utilizada a continuación, es la designada para animales (Morgan, 1997).

En los diferentes puntos de control intervienen dos tipos característicos de proteínas, las ciclinas (Cyc) y las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk, de *cyclin-dependent kinases*), que se asocian formando complejos Cdk-Cyc para controlar la actividad del ciclo celular. El nombre de ciclinas se debe a que su concentración en la célula fluctúa de acuerdo con la etapa del ciclo celular. Existen numerosas ciclinas, pero en general se clasifican en ciclinas de la fase G_1 o ciclinas de inicio (tipo D y E) y ciclinas mitóticas (tipo A y B). Las Cdks (en mamíferos Cdk1 a 9) son una familia de proteínas que fosforilan residuos de serina y treonina de proteínas sustrato específicas; sin embargo, sólo pueden ejercer esa actividad enzimática cuando están asociadas con una ciclina. De acuerdo con ello, se considera que en el complejo activo Cdk-Cyc la Cdk es la subunidad catalítica y la ciclina la subunidad reguladora. A diferencia de las ciclinas, las concentraciones de las Cdks no varían de forma importante durante el ciclo celular (Morgan, 1997; Morgan, 2007).

El primer punto de control que se encuentra en la transición G₁/S (Figura 1.1, paso 1), se conoce como INICIO (*START*) en levaduras de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*) y punto de restricción o R en animales. Es el único punto que responde tanto a condiciones ambientales (nutrientes, temperatura, sales), como a señales internas de crecimiento celular (hormonas, factores de crecimiento) y a la integridad del DNA (ruptura de la doble cadena). Durante G₁ las condiciones ambientales favorables y las señales internas promueven la síntesis de ciclinas de G₁, formándose entonces el complejo Cdk-ciclina G₁, y la célula pasa el punto de control de INICIO y se compromete a continuar con el ciclo de división. El evento clave para pasar este punto de control es una fosforilación sobre la proteína Rb (miembro de la familia de proteínas relacionadas con el retinoblastoma o p105-Rb, p107 y p130); cuando Rb no está fosforilada reprime la transcripción de genes controlados por el factor E2F, cabe mencionar que dichos genes son los que permiten el avance del ciclo celular. Cuando Rb es fosforilada se libera el dímero formado por el factor de transcripción E2F y la proteína de dimerización DP, lo que posibilita la transcripción de genes necesarios para la entrada a fase S (Figura 1.1, paso 1) (Morgan, 2006). En mamíferos existen dos DPs (DP1 y DP2) y ocho E2Fs que se clasifican en cuatro grupos: los E2Fs activadores modulados por RB (E2F1, E2F2 y E2F3), los E2Fs represores modulados por Rb (E2F4 y E2F5), el E2F6, un represor de la transcripción independiente de Rb y el grupo de represores transcripcionales independientes de Rb y DP (E2F7 y E2F8) (Attwooll *et al.*, 2004). Las células expuestas a radiación ionizante en G₁ sintetizan una proteína llamada p21^{Cip1}, la cual inhibe la actividad cinasa del complejo Cdk-ciclina G₁ y así evita la progresión del ciclo celular; a las proteínas del tipo p21^{Cip1} se les conoce como inhibidores de los complejos Cdk-ciclina o CKI. Los CKI conocidos se agrupan en dos familias: la familia Kip/Cip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}), cuyos miembros inhiben la mayor parte de los complejos Cdk-ciclina uniéndose tanto a Cdks como a las ciclinas y con menor afinidad que al complejo Cdk-ciclina; y la familia INK4 (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}) cuyos miembros inhiben específicamente a las cinasas Cdk4 y 6, uniéndose tanto a las Cdks aisladas como al complejo que forma con la ciclina D (Verkest *et al.*, 2005). El complejo proteico ATM (ataxia telangiectasia mutada) participa en el mecanismo disparado por el daño al DNA, fosforilando y activando a la cinasa Chk2, a cual a su vez fosforila y estabiliza un factor de transcripción, p53, que permite la transcripción y traducción del gen p21^{Cip1}, con la inhibición subsiguiente del ciclo celular (Karp, 2005; Lodish *et al.*, 2005).

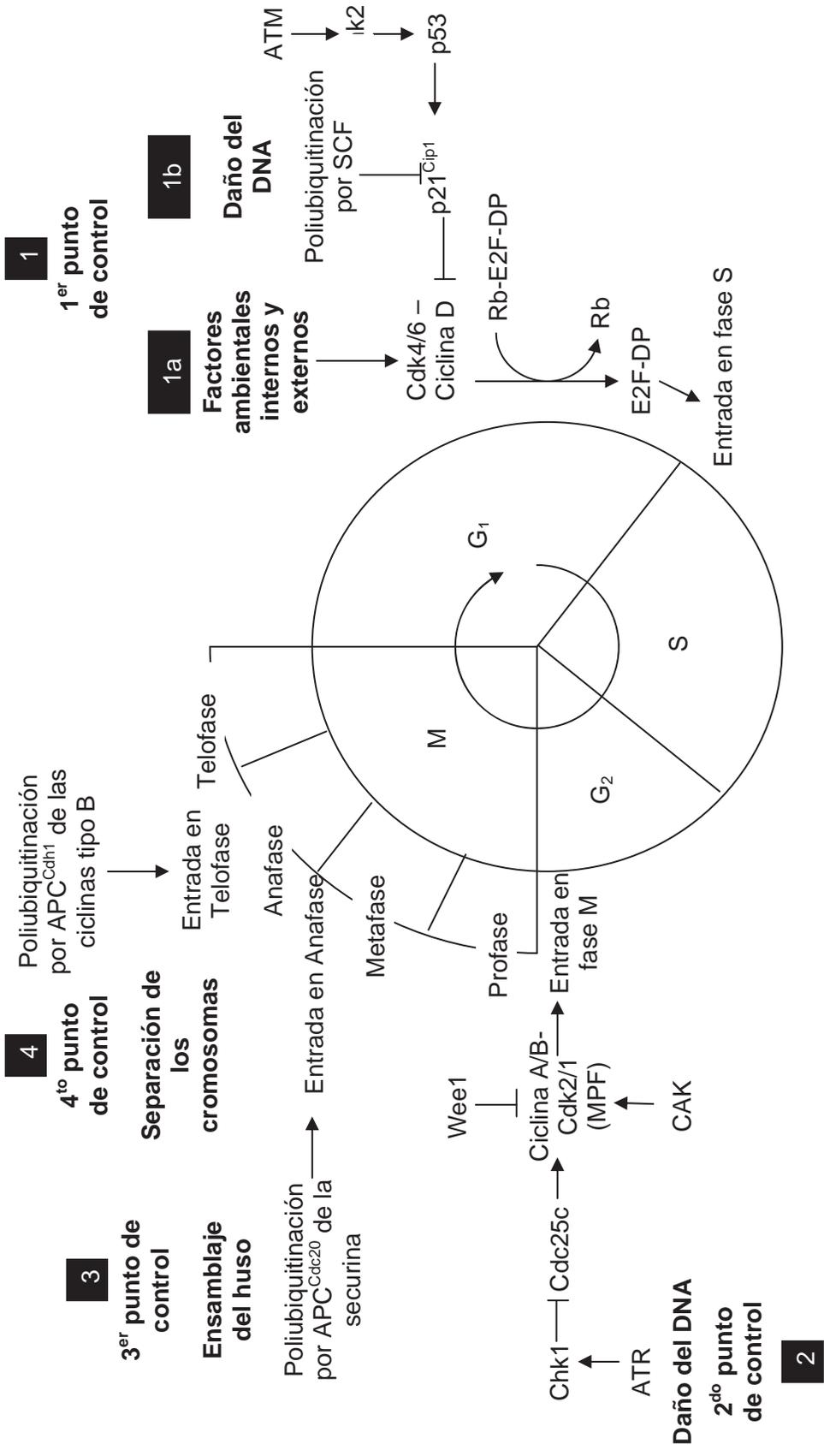


Figura 1.1. Esquema general del control del ciclo celular mediado por los puntos de control, ver texto para explicación (modificado de varios autores).

En contraparte la proteólisis de p21^{Cip1} es mediada por el complejo SCF (Skp1-Culina-proteína de caja F), que funciona como una ligasa de ubiquitina que marca a la CKI para ser degradada por el proteosoma 26S (Figura 1.1, paso 1b) (Murray, 2004; Voet y Voet, 2006). De igual manera, puntos de control de daños del DNA dependientes de ATM, p53 y p21^{Cip1} se localizan en el transcurso de toda la interfase.

El segundo punto de control ocurre en la transición G₂/M (Figura 1.1, paso 2) y se regula por el estado de fosforilación del complejo Cdk-ciclina B (factor promotor de la maduración, MPF). En eucariontes multicelulares, la cinasa Wee1 fosforila el residuo inhibidor T14, mientras que la cinasa homóloga Myt1 fosforila los residuos T14 y Y15 de la Cdk del MPF. Otra cinasa, denominada cinasa activadora de Cdk (CAK), fosforila un residuo de serina o treonina (S/T 160 en animales y T-161 en levaduras) en la subunidad Cdk del MPF. Cuando los tres residuos están fosforilados el complejo MPF está inactivo. Por último, las isoformas de la fosfatasa Cdc25 (Cdc25a, b y c) controlan la activación específica de distintos complejos Cdk-ciclina, desfosforilando los residuos T14 y Y15. Cdc25a regula la transición G₁/S desfosforilando el complejo Cdk2-Ciclina E; Cdc25b y Cdc25c desfosforilan los complejos Cdk2-CiclinaA y Cdk1-CiclinaB, respectivamente, ambos requeridos para la transición G₂/M (Morgan, 2007). Cuando una célula en G₂ censa daño en el DNA ocasionado por radiación UV, la cinasa ATR (proteína relacionada con ATM) se activa y fosforila una cinasa del punto de revisión denominada Chk1. Una vez activado Chk1 fosforila a Cdc25c, lo que convierte a esta última en un blanco para la proteína adaptadora 14-3-3σ que se une a la fosfatasa en el citoplasma. Esta interacción inhibe la actividad fosfatasa de Cdc25c e impide que se importe de nuevo al núcleo. La ausencia de Cdc25c en el núcleo deja al complejo MPF en un estado inactivo y la célula se detiene en G₂ (Karp, 2005; Lodish *et al.*, 2005; Voet y Voet, 2006).

El tercer punto de control del ciclo celular se ejerce durante la transición metafase/anafase y asegura que la célula no se divida si hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial (Figura 1.1, paso 3). El complejo APC (complejo promotor de la anafase, también llamado ciclosoma o APC/C), al igual que SCF, es una ligasa de ubiquitina formado por al menos 11 subunidades proteicas en los vertebrados. El complejo APC^{Cdc20} se activa en esta transición, después de la síntesis de Cdc20/FZ (Cdc20/Fizzy) en la parte tardía de G₂. Cuando este último se une con el APC, el complejo enzimático poliubiquitina el inhibidor de la anafase llamado securina. La poliubiquitinación y la destrucción de la securina al final de la metafase libera una proteasa activa que se conoce como separasa, la cual

degrada la subunidad Scc1 de las moléculas de cohesina que mantiene unidas las cromátidas hermanas, estableciendo la anafase (Capron *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2005).

El cuarto y último punto de control posibilita a la célula iniciar un nuevo ciclo de división (Figura 1.1, paso 4). Cerca del final de la mitosis Cdc20/FZ es degradada y un factor de especificidad alternativo, Cdh1/FZR (Cdh1/ proteína relacionada a Fizzy), toma el control de la selección del sustrato de APC. Cuando Cdh1/FZR se une con APC, el complejo APC^{Cdh1} poliubiquitina las ciclinas mitóticas, las cuales son degradadas por el proteosoma 26S y la célula puede proseguir hacia la telofase y la citocinesis (Capron *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2005; Murray, 2004).

1.1.2. Ciclo Celular en Plantas

Entre las moléculas conservadas en los diferentes organismos eucariontes se encuentran las proteínas cinasas dependientes de ciclina y las ciclinas, las enzimas responsables de la replicación del DNA, las proteínas estructurales del citoesqueleto necesarias para el desplazamiento de los cromosomas durante la mitosis y los componentes de las rutas dependientes de ubiquitina para la degradación de proteínas (Morgan, 1997; Inzé, 2003). A pesar de las diferencias entre plantas y animales los mecanismos generales de regulación de la progresión del ciclo celular en los vegetales son similares; la nomenclatura que se utiliza es la establecida por Renaudin y colaboradores en 1996.

La división celular juega un papel crucial durante el desarrollo vegetal debido a que la pared celular, aunque proporciona un soporte estructural, limita la motilidad. Como resultado de ello, las plantas superiores tienen un estilo de vida sésil, lo que las expone a los cambios ambientales. Comparados con los animales, los vegetales han adaptado su morfogénesis y desarrollo a este estilo de vida. Dentro de estas adaptaciones que capacitan a las plantas para soportar condiciones cambiantes y/o desfavorables se encuentran las siguientes: la organogénesis continua, la plasticidad de crecimiento y la totipotencialidad. La ventaja del desarrollo continuo es la flexibilidad, es decir, los organismos vegetales pueden modificar su forma en respuesta a los cambios ambientales (Mironov *et al.*, 1999).

Una de las diferencias que distinguen el ciclo celular vegetal de los otros eucariontes es la citocinesis. Al comienzo de la mitosis el citoesqueleto es reorganizado, formando una banda preprofase (PPB) transitoria que determina el futuro plano de división y el sitio de división cortical (Jürgens, 2005). Durante la metafase se verifica una desaparición del

PPB dependiente de cinasas y se forma el huso mitótico. En la transición de metafase a anafase esta involucrada la degradación de proteínas dependiente de un APC, el cual también interviene en la separación de las cromátidas hermanas en otros eucariontes (Blilou, 2002; Capron *et al.*, 2003; Murray, 2004). Después de que los cromosomas hijos son arrastrados por el huso mitótico a los polos opuestos de la célula aparece una nueva estructura del citoesqueleto, el fragmoplasto, el cual surge en la zona media como dos capas antiparalelas perpendiculares al plano de división. El fragmoplasto dirige vesículas al centro del plano de división, donde se fusionan unas con otras para formar un compartimiento membranoso transitorio, la placa celular, la cual se expande hacia la periferia de la célula hasta que alcanza la pared celular parental (Nacry *et al.*, 2000; Jürgens, 2005).

La citocinesis separa la fase M de la célula progenitora de las fase G₁ de las células hijas y además de la separación física, por las recientemente formadas membranas plasmáticas y pared celular, las células hijas adquieren independencia en sus ciclos celulares. La forma predominante de citocinesis en los vegetales, al contrario de lo que sucede en otros organismos, progresa del centro hacia la periferia de la célula e involucra la formación *de novo* de membrana plasmática y pared celular (Nacry *et al.*, 2000; Jürgens, 2005).

Diferentes células vegetales a menudo exhiben ciclo celulares alternativos, que tienen en común la ausencia de la citocinesis y que se caracterizan por el aumento en el nivel de la ploidía del núcleo. Lo anterior, es propio de ciertos tipos celulares especializados, como lo son los tricomas y las células en los nódulos de las leguminosas, que albergan a los bacteroides fijadores de nitrógeno. En cualquier caso, los endociclos parecen ocurrir sólo después del cese del ciclo mitótico normal y, en términos generales, el incremento en el contenido de DNA esta asociado con el mantenimiento de grandes volúmenes citoplasmáticos (Joubès and Chevalier, 2000; Singh, 2002).

1.1.3. Transiciones en el Ciclo Celular Vegetal

El primer indicio que sugería que los complejos CDK-CYC también regulaban la división celular en plantas, surgió del descubrimiento de una proteína vegetal relacionada con las CDKs animales (John *et al.*, 1989), desde entonces se han clonado progresivamente homólogos vegetales de diferentes genes vinculados al ciclo celular. La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*, permitió identificar los genes principales del ciclo celular (Vandepoele *et al.*, 2002; Menges *et al.*,

2005). No obstante, los datos acerca de cómo se regulan las transiciones $G_1 \rightarrow S$ y $G_2 \rightarrow M$ en plantas son fragmentarios (Inzé, 2003), y solo en años recientes se ha reportado cómo señales internas: las hormonas (del Pozo *et al.*, 2005) y señales de desarrollo (Beemster *et al.*, 2005; Gutierrez, 2005); y como señales externas: luz (Inzé, 2005) y nutrimentos (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000), controlan dichas transiciones. A continuación se revisaran los mecanismos de regulación principales de las transiciones $G_1 \rightarrow S$ y $G_2 \rightarrow M$ en organismos vegetales.

1.1.3.1. Transición $G_1 \rightarrow S$

En un principio la hipótesis de una ruta mediada por RB, en la regulación del ciclo celular en plantas, estuvo soportada por dos evidencias; la existencia de ciclinas tipo D con un motivo LxCxE (motivo de unión a RB en células animales) y la identificación de proteínas con dicho motivo en geminivirus (necesarias para la replicación viral eficiente en cultivos celulares). Además, se descubrieron en maíz (Sabelli *et al.*, 2005) y otras plantas genes relacionados con la proteína RB (RBR) (Durfee *et al.*, 2000; Rossi and Varotto, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002), y un homólogo de RBR1 en *Nicotiana tabacum* (Sekine and Shinmyo, 2004). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado tres genes *E2Fs* (*E2Fa*, *E2Fb* y *E2Fc*), los cuales comparten los dominios de unión al DNA, los de dimerización con DP y de interacción con RBR (Vandepoele *et al.*, 2002; Ramirez-Parra *et al.*, 2003); en tabaco (*N. tabacum*) solo se ha identificado una proteína E2F (Sekine and Shinmyo, 2004). Mientras que *E2Fa* es un activador de la expresión génica y estimula la división celular y la endorreplicación (De Veylder *et al.*, 2002; Rossi and Varotto, 2002), *E2Fc* es un inhibidor de la división que restringe la proliferación en ausencia de luz (del Pozo *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* existen otros tres miembros de la familia E2F, *E2Fd*, *E2Fe* y *E2Ff* (Ramírez-Parra *et al.*, 2004), también conocidos como DEL2, DEL1 y DEL3 (Vandepoele *et al.*, 2002), respectivamente. Aunque estas últimas proteínas han sido poco caracterizadas, *E2Ff* (homólogo de E2F7) parece estar involucrado en la represión de genes de biosíntesis de la pared celular durante la elongación de células diferenciadas (Ramírez-Parra, 2004). De acuerdo con Vandepoele y col. (2002) en el genoma de *Arabidopsis* también están presentes dos genes *DP* (*DPa* y *DPb*), los cuales exhiben una organización de dominios similar a la de su contraparte animal. Tanto en los miembros de la familia E2F como DP es notable la conservación del dominio de unión al DNA; lo anterior sugiere que los factores de unión E2F-DPs vegetales se unen a las mismas secuencias del DNA de mamíferos. De acuerdo al análisis del genoma de *Arabidopsis*, se

han identificado 183 genes dianas potenciales de E2F, con el elemento activador TTTCCCGCC o TCTCCCGCC en su promotor, entre los cuales se incluyen genes involucrados en la replicación del DNA, regulación del ciclo celular, transcripción, respuesta de defensa, estrés y señalización (Vandepoele *et al.*, 2002; De Veylder *et al.*, 2003; Ramirez-Parra *et al.*, 2003).

En lo que se refiere a las ciclinas, en *Arabidopsis* se han identificado diez secuencias para ciclinas tipo D y éstas se clasifican en siete subclases. Usando la clasificación de las ciclinas tipo D en *Arabidopsis*, la subclase CYCD3 tiene tres miembros, la familia CYCD4 dos y los otros grupos tienen un solo miembro (Meijer and Murray, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). De acuerdo con Menges y colaboradores (2005) los patrones característicos de expresión de ciclinas tipo D en la fase G₁ temprana y tardía varían dependiendo de si las células reinician un nuevo ciclo de división (G₁ → S) o si, una vez que salieron del ciclo celular, son reintroducidas a él (G₀ → G₁ → S). Los datos obtenidos en cultivos en suspensión de células de tabaco BY-2 sugieren que CDKA;3 forma dímeros con CYCD2;1 y CYCD3;3, siendo necesaria la fosforilación de los residuos T-191 de CYCD3;3 para que el dímero tenga actividad cinasa *in vitro* sobre RBR1 e histona H1 (Sekine and Shinmyo, 2004). En *Arabidopsis* se han identificado siete genes que codifican proteínas con cierta homología con la familia de inhibidores de CDK Kip/Cip animal, los cuales son llamadas proteínas relacionadas con Kip (KRPs) o inhibidores de la CDK (ICKs). Aparte de la región relacionada con Kip, la homología general de las KRPs es baja (De Veylder *et al.*, 2001; Rossi and Varotto, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002; Verkest *et al.*, 2005). Las proteínas KRP1 y KRP2 son los que están relacionados con la inhibición de la actividad del complejo CDKA-CYCD3;3 durante la reentrada al ciclo celular (G₀ → G₁) (Menges *et al.*, 2005).

1.1.3.2. Transición G₂ → M

Aunque los descubrimientos de los últimos años han incrementado la caracterización de los eventos moleculares que controlan la entrada a la fase S en vegetales, la regulación de la entrada a mitosis todavía está pobremente caracterizada. En los vegetales las cinasas que controlan la transición G₂ → M son las CDKs tipo A y B (Menges *et al.*, 2005) (Figura 1.2). CDKA es el homólogo de Cdc2 de levadura y Cdk1 de mamífero (Joubès *et al.*, 2000). Las CDKs tipo B probablemente regulan características específicas del ciclo celular vegetal, debido a que no se reconocen contrapartes de estas CDKs en otros organismos (Joubès *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2003).

Las plantas tienen homólogos de las ciclinas mitóticas de animales tipo A y B. Las ciclinas tipo A son producidas y degradadas en la fase más temprana del ciclo celular que las ciclinas tipo B, y presentan funciones distintas y no redundantes en la progresión del ciclo celular (Menges *et al.*, 2005). En plantas se han identificado tres subclases diferentes de ciclinas tipo A (A1, A2 y A3) (Chaubet-Gigot, 2000), y todas se encuentran en el genoma de *Arabidopsis*, comprendiendo un total de 10 ciclinas A (Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004); miembros representativos de las tres clases principales de ciclinas A han sido encontrados en *N. tabacum*. El patrón de expresión del mRNA de CYCA2;1 es constante en todas las fase del ciclo celular en cultivos en suspensión sincronizados de alfalfa (*Medicago sativa* cv. R2) (Mészáros *et al.*, 2000), mientras que en cultivos en suspensión de *Arabidopsis thaliana* los picos máximos de expresión de las subclases CYCA1 y CYCA2 se encuentran en la transición $G_2 \rightarrow M$ (Menges *et al.*, 2005). En células de tabaco BY-2 CYCA3;1 aparece exclusivamente en el núcleo durante la transición S/ G_2 , permanece durante la fase G_2 y posiblemente es degradada durante la profase temprana; patrones similares se encontraron para CYCA2;1 en *Medicago sativa* (Chaubet-Gigot, 2000; Parmentier *et al.*, 2004).

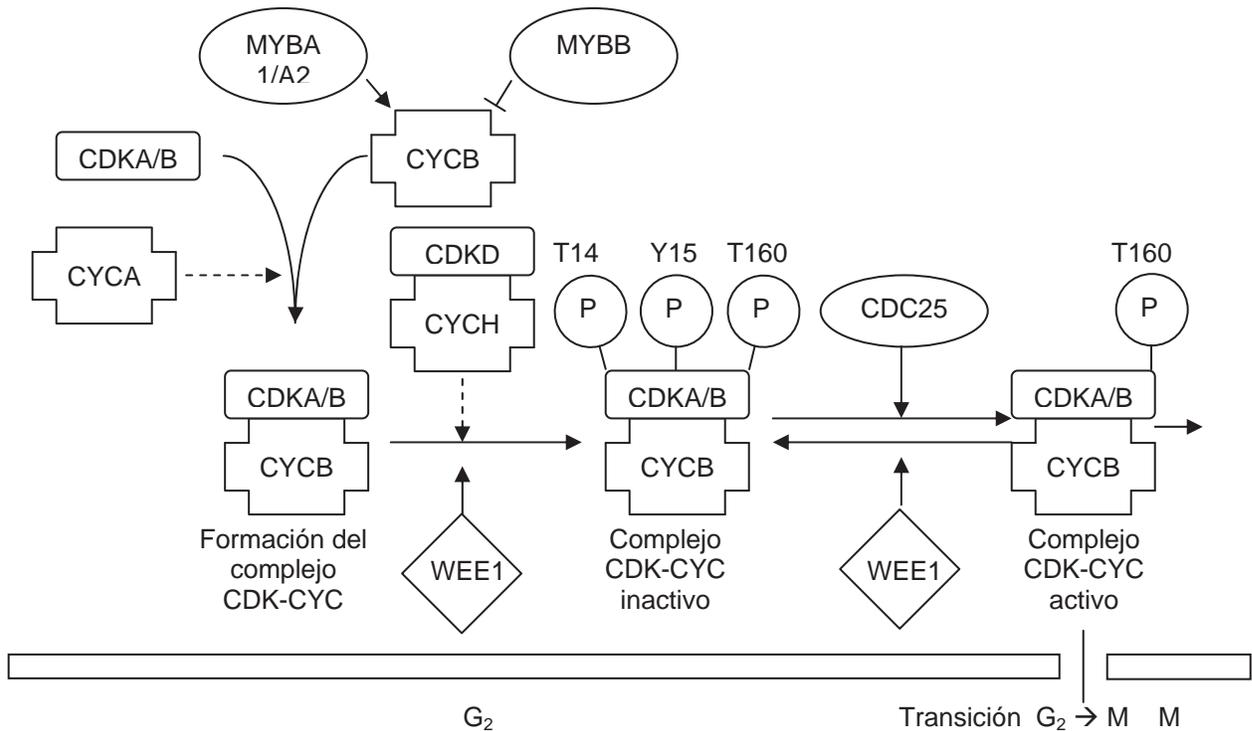


Figura 1.2. Esquema general del mecanismo de regulación de la transición $G_2 \rightarrow M$ en plantas; las flechas punteadas indican rutas probables; ver texto para explicación (modificado de varios autores).

Todas las ciclinas tipo B identificadas en plantas, están subdivididas en dos subclases, CYCB1 y CYCB2 (Ito, 2000), aunque en el genoma de *Arabidopsis* se identificó un gen ciclina tipo B sin la caja típica de destrucción tipo B, el cual se designó como CYCB3. En *Arabidopsis* existen once genes que codifican ciclinas tipo B (Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Aparte de la diferencia en las secuencias, las ciclinas tipo B se distinguen de las ciclinas tipo A en su patrón de expresión posterior durante el ciclo celular (Ito, 2000; Mézáros *et al.*, 2000). La expresión ectópica de *CYCB2*;2 de alfalfa estimula la transición $G_2 \rightarrow M$ (Schnittger, 2002). De acuerdo con Menges y colaboradores (2005) los picos máximos de expresión de los tres tipos de ciclinas B se encuentran en la transición $G_2 \rightarrow M$. En células de tabaco BY-2 las ciclinas *CYCB1*;1 y *CYCB1*;3 se localizan principalmente en el citoplasma durante la transición S/ G_2 , siendo importadas al núcleo en la transición G_2/M donde se acumulan alrededor de la membrana y el material nuclear, para ser posteriormente degradadas durante la metafase. No obstante de la misma localización subcelular, existen diferencias entre las ciclinas B animales y vegetales: primero, en células de tabaco BY-2 no se observó la presencia de ciclinas B1 en el huso mitótico; y segundo, las ciclinas B1 de tabaco en las cuales la caja D (caja de destrucción de RxxLxxxxN a GxxVxxxxN) estaba mutada podían unirse a los cromosomas, a diferencia de las ciclinas B de mamífero con la caja D mutada las cuales no pueden unirse (Parmentier *et al.*, 2004). Así, tanto las ciclinas tipo A como las ciclinas tipo B son probablemente responsables de iniciar los eventos mitóticos en el punto de control de la transición $G_2 \rightarrow M$ (Figura 1.2).

Los promotores de las ciclinas tipo B contiene un elemento activador común, llamado elemento activador específico de fase M (MSA), el cual es necesario y suficiente para dirigir la expresión específica de genes de $G_2 \rightarrow M$. El motivo MSA presenta un núcleo pentamérico central, AACGG, el cual es flanqueado en ambos extremos por secuencias menos conservadas ricas en C y T. La secuencia consenso del elemento MSA es TCYAACGGYYA (donde Y indica C o T), la cual es similar a las secuencias de unión de los factores de transcripción animales c-Myb (JCCAACNGYC, donde J indica A o C) y v-Myb (SYAACGG, donde S indica G o C). En la búsqueda de factores de unión a MSA se identificaron en tabaco tres proteínas diferentes parecidas a Myb, NtMYBA1, NtMYBbA2 y NtMYBB. El gen *NtMYBB* se expresa constitutivamente durante el ciclo celular, mientras que *NtMYBA1* y *NtMYBA2* presentan un perfil de expresión parecido al de las ciclinas B. Además, NtMYBB es un represor de los promotores que contienen elementos MSA, a diferencia de NtMYBA1 y NtMYBA2 que son activadores (Figura 1.2). Por lo tanto, las

plantas al igual que los animales tienen proteínas Myb involucradas en la proliferación celular (Ito, 2000; Ito, 2004). Recientemente se reportó que la caja GCCCR (sitio de unión del factor de transcripción TCP20) es necesaria y suficiente para la expresión de altos niveles de CYCB1;1 durante la transición $G_2 \rightarrow M$ (Li *et al.*, 2005).

Como se muestra en la figura 1.2, la transición $G_2 \rightarrow M$ está controlada por el estado de fosforilación del complejo CDK-ciclina B. La primer CAK vegetal se identificó en arroz y se designó como R2, probablemente esta cinasa es específica de monocotiledóneas (Stals *et al.*, 2000). En el genoma de *Arabidopsis* se identifican dos clases funcionales de CAKs, clasificadas como CDKDs, con tres miembros, y CDKF, con un miembro (Vandepoele *et al.*, 2002). A diferencia de las CAKs monoméricas de otros eucariontes, las CDKDs de *Arabidopsis* no exhiben actividad como monómeros, sugiriendo la necesidad de una modificación postraducciona l o la asociación con una subunidad reguladora. La ciclina H (CYCH) de arroz específicamente interactúa con R2, pero no con otras CAKs, incrementando su actividad cinasa, sugiriendo que CYCH es la subunidad reguladora de las CAKs (Figura 1.2) (Dewitte and Murray, 2003). En maíz y *Arabidopsis* se reportó un homólogo de la cinasa WEE1, que específicamente inhibe la actividad cinasa del complejo CDK-ciclina mitótica fosforilando los residuos T14 y Y15 de la subunidad catalítica (Figura 1.2) (Sorrell *et al.*, 2002; De Veylder *et al.*, 2003). Recientemente se identificó en *Arabidopsis* un gen que codifica una pequeña fosfatasa CDC25, que carece de dominio regulador, pero que desfosforila los residuos T14 y Y15 de las CDKs vegetales (Figura 1.2) (Landrieu *et al.*, 2004).

1.2. Cultivos de Células en Suspensión

El término cultivo de células vegetales se utiliza para designar al conjunto de técnicas de cultivo y crecimiento de células vegetales *in vitro*, bajo condiciones físicas y químicas definidas y en condiciones de esterilidad (Franklin and Dixon, 1994; Loyola-Vargas and Vázquez-Flota, 2006). El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de pequeños racimos celulares, distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento; se le llama subcultivo o inóculo al trasplante de células desde un frasco de cultivo a otro (Franklin and Dixon, 1994; Godoy-Hernández and Vázquez-Flota, 2006). Las células vegetales cultivadas en suspensión presentan ventajas únicas, tales como la homogeneidad de los tipos celulares dentro de la población, el control de parámetros extracelulares y la continua disponibilidad de biomasa. Además, es más sencillo observar y manipular células cultivadas que células dentro de

los órganos Este sistema es un poderoso implemento para llevar a cabo tanto estudios bioquímicos como moleculares del ciclo celular vegetal (Renaudin, 2004). Un cultivo primario es el originado a partir de células, tejidos u órganos que provienen directamente del organismo y cuyas células mueren después de varios subcultivos; por otro lado una línea celular que se origina a partir de un cultivo primario, es perenne y las células presentan características homogéneas. Debido a estas particularidades las líneas celulares son ampliamente utilizadas en diversos estudios, especialmente en los relacionados con el ciclo celular (Nagata *et al.*, 2004; Veilleux *et al.*, 2005).

1.2.1. Origen y Usos de la Línea Celular NT-1

Los cultivos en suspensión de células del género *Nicotiana* han sido ampliamente utilizados en la investigación de la biología celular vegetal. En 1939, P.R. White estableció un cultivo de *N. tabacum in vitro* a partir de tumores genéticos (Ichikawa and Syōno, 1991; Caponetti *et al.*, 2005). La línea celular de tabaco BY-2 (también llamada TBY-2) fue establecida durante la década de 1960 a partir de plántulas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2, en las instalaciones del Central Research Institute of the Japan Tobacco and Salt Public Corporation (actualmente Tobacco Science Research Laboratory, Japan Tobacco, Inc.). En 1981 Ohno, T., proporcionó material de la línea celular TBY-2 a Nagata, T., quien a su vez se lo facilitó a An, G., en 1982 y es este último investigador quien estableció la línea celular NT-1. Desde entonces la línea celular NT-1 ha sido mantenida en diversos laboratorios, principalmente en Norte América (Kato *et al.*, 1972; An, 1985; Nagata *et al.*, 1992; Nagata and Kumagai, 1999; Geelen *et al.*, 2001; Nagata, 2004).

Las células de tabaco NT-1 han sido utilizadas en estudios de transformación con vectores binarios por *Agrobacterium tumefaciens* (An, 1985; An, 1986; Allen *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1996), de localización subcelular de proteínas (Persson *et al.*, 2001) y de producción de proteínas recombinantes (Hellwig *et al.*, 2004). La línea celular NT-1 no se ha utilizado en experimentos de sincronización para estudios de ciclo celular.

1.2.2. Características de la Línea Celular NT-1

De acuerdo con Nagata *et al.* (1992, 1999) la línea celular NT-1 es genéticamente igual a las células TBY-2. El tabaco (*Nicotiana tabacum*) es un híbrido interespecífico (*Nicotiana sylvestris* x *Nicotiana tomentosiformis*) alotetraploide ($2n = 4x = 48$), perteneciente al género *Nicotiana*, subgénero *tabacum*, sección *Genuinae* (Singh, 2002).

En fase estacionaria, la mayoría de las células de tabaco NT-1 tienen un contenido de DNA 2C, lo que equivale a 11,466 Mbp (el valor 1C para *N. tabacum* es 5.85 pg de DNA, la conversión actual es 1pg \equiv 980 Mpb) (Singh, 2002; Cullis, 2004). Actualmente no se dispone de información genómica a gran escala sobre el tabaco en las bases de datos públicas. Matsuoka *et al.* (2004) reportan un estudio de microarreglos de cDNA utilizando la línea celular TBY-2, con 9,216 fragmentos de ESTs (*expression sequence tag*) correspondiendo aproximadamente a 7,000 genes.

Los cultivos de células en suspensión de tabaco NT-1 son heterogéneos y menos friables que las células TBY-2 (el término friable se utiliza para describir la capacidad de separación de las células), observándose en los primeros dos tipos celulares: células redondeadas (30 – 50 μm) formando agregados o racimos y células alargadas, de 2 a 5 veces más alargadas en uno de sus ejes, formando cadenas lineales o zarcillos (Álvarez *et al.*, 1994; Nagata and Kumagai, 1999). En condiciones de cultivo similares a las células TBY-2, las células NT-1 alcanzan la fase estacionaria a los 7 – 8 días después del subcultivo en tanto que las células TBY-2 a los 6 – 7 días, con una densidad de 15×10^6 células por mililitro o un PCV del 40 % (V/V) (*packed cell volume*) (Álvarez *et al.*, 1994; Robledo-Paz *et al.*, 2006). Debido a estas características de crecimiento heterogéneo y lento, las células NT-1 no se han utilizado en experimentos de sincronización (Nagata and Kumagai, 1999).

1.3. Sincronización de Cultivos Celulares en Suspensión

La sincronización consiste en el arresto y posterior liberación de células en una fase del ciclo celular. Aunque ciertos aspectos celulares pueden ser estudiados en células individuales y por lo tanto no requieren de una coordinación en el periodo de división entre células, los análisis bioquímicos y moleculares de la división celular dependen de poblaciones de células con la capacidad de ser sincronizadas. Los sistemas útiles para un análisis detallado de los aspectos moleculares de la división celular son los cultivos de células vegetales en suspensión sincronizados. En dichos sistemas la división celular esta separada de cualquier contexto del desarrollo; así, en un cultivo sincronizado ideal, todas las células avanzan a través del ciclo celular a la misma velocidad a partir del mismo punto de inicio (Sharma, 1999; Buchanan *et al.*, 2000; Planchais *et al.*, 2000).

Normalmente las células en suspensión son asincrónicas, por lo que se han desarrollado diversos métodos de sincronización. Los métodos de sincronización se pueden dividir en sincronización por selección (también llamado sincronización natural),

en el que las células en un estadio en particular son apartadas de las células asincrónicas y sincronización por inducción, en la que un cultivo asincrónico es tratado para bloquear el ciclo celular en una fase (Eriksson, 1972). La sincronización por selección es un método comúnmente utilizado en células de levadura y animales, pero es especialmente difícil en sistemas vegetales. La sincronización por inducción consiste en arrestar una población de células en una fase específica del ciclo celular por privación de algún factor de crecimiento o nutriente (métodos indirectos), o por la adición de reactivos químicos (métodos directos), siendo este último tipo el más utilizados en células vegetales (Sharma, 1999).

1.3.1. Sincronización por Inducción: Consideraciones Generales

Aunque cada estrategia de sincronización del ciclo celular tiene limitaciones y ventajas, la eficiencia en el nivel de sincronía depende de cuatro factores: (1) la especificidad y reversibilidad de la estrategia de sincronización, el efecto del tratamiento tiene que ser específico de una fase y el bloqueo debe ser reversible, en el caso de usar un reactivo químico, éste tiene que ser eficiente a bajas concentraciones y efectivo rápidamente, para evitar anomalías en las fases sucesivas; (2) especificidad del cultivo, las condiciones óptimas del tratamiento de sincronización, la duración del tratamiento y el tiempo de reingreso al ciclo celular tienen que ser optimizados para cada cultivo celular; (3) las características del cultivo en suspensión; y (4) el procedimiento de sincronización, cabe mencionar que el nivel de sincronía disminuye gradualmente a partir del momento en el que el cultivo es liberado del bloqueo (Sharma, 1999; Planchais *et al.*, 2000).

1.3.2. Monitoreo del Nivel de Sincronía

Una vez que las células han sido arrestadas es necesario evaluar el nivel de sincronía; los métodos para monitorear dicha sincronía son: marcaje con timidina tritiada, análisis por citómetro de flujo, citogenética y marcadores moleculares (Sharma, 1999; Planchais *et al.*, 2000; Fiorani and Beemster, 2006).

Marcaje con timidina tritiada (timidina³H). Este método es utilizado para monitorear la replicación del DNA (fase S). Las células son incubadas en presencia de nucleótidos de timidina tritiados (³H]TTP) e incorporan los ³H]TTP en el DNA recién sintetizado durante la replicación. La incorporación de timidina³H] se estima cuantificando la radioactividad en un contador de centelleo líquido. La velocidad de incorporación de

timidina [^3H] es proporcional a la cantidad de células en fase S (Fiorani and Beemster, 2006). Aunque este método ha sido utilizado en cultivos en suspensión (Kapros *et al.*, 1992; Reichheld *et al.*, 1995; Genschik *et al.*, 1998; Sorrell *et al.*, 1999; Porceddu *et al.*, 2001), actualmente está en desuso debido a fallas de la técnica (como la perturbación en la dinámica del ciclo celular por el decaimiento de la marca) (Fiorani and Beemster, 2006).

Análisis por citómetro de flujo. El citómetro de flujo o citofluorímetro es utilizado para monitorear las fases G_1 , S y G_2 . El sistema consigue que la suspensión celular llegue en condiciones de flujo laminar, formando una corriente muy fina que, como consecuencia de la dilución, contiene células individuales en sucesión. Éstas pasan así, de una en una a través de un haz láser luminoso, cuya longitud de onda permite la excitación de los marcadores fluorescentes incorporados previamente a la célula. En la luz emergente de cada célula se analiza la dispersión y la intensidad de la fluorescencia (emisión). Aunque en el método univariado convencional, que consiste en la incorporación de un colorante fluorescente al DNA, no se distinguen las células en G_1 de aquellas en G_0 , el análisis bivariado permite la detección de células que han progresado de un ciclo celular al siguiente por la incorporación del análogo de timidina 5-bromodesoxiuridina (BrdU). Una metodología de cuantificación alternativa es la detección de BrdU con un anticuerpo anti-BrdU, en el cual se determina el porcentaje de células en fase S en relación al resto de células o índice de marcaje (LI, *labeling index*) (Coba de la Peña and Brown, 2001). La citometría de flujo es un método ampliamente utilizado en estudios de ciclo celular (Conia *et al.*, 1987; Conia *et al.*, 1990; Magyar *et al.*, 1993; Perennes *et al.*, 1993; Magyar *et al.*, 1997; Planchais *et al.*, 1997; Reichheld *et al.*, 1998; Tréhin *et al.*, 1998; Joubès and Chevalier, 2000; Boniotti and Gutierrez, 2001; Porceddu *et al.*, 2001; Menges and Murray, 2002; Menges and Murray, 2004; Pathirana and Eason, 2006), siendo la principal limitante la disponibilidad del equipo y los reactivos.

Citogenética. La citogenética se utiliza principalmente para determinar la proporción de células en mitosis o índice mitótico (MI, *mitotic index*), que es el número de figuras mitóticas en relación con el número total de células. Una variante del índice mitótico, es el índice M/A que indica la relación entre el número de células en metafase y las células en anafase. Después de fijar y teñir las células con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o bisbenzamida de Hoechst 33342, el número de células en división se estima por microscopía con luz UV. Mientras que el citómetro de flujo no puede detectar las células en mitosis (anafase y metafase principalmente), ya que el análisis del contenido de DNA requiere núcleos intactos, el análisis citogenético evalúa con bastante precisión y

exactitud las células en mitosis (Coba de la Peña and Brown, 2001; Singh, 2002). Debido a lo sencillo y económico de la técnica es una herramienta invaluable en el estudio del ciclo celular en cultivos vegetales en suspensión sincronizados (Eriksson, 1972; Conia *et al.*, 1987; Kapros *et al.*, 1992; Nagata *et al.*, 1992; Reichheld *et al.*, 1995; Shaul *et al.*, 1996; Magyar *et al.*, 1997; Planchais *et al.*, 1997; Genschik *et al.*, 1998; Reichheld *et al.*, 1998; Samuels *et al.*, 1998; Nagata and Kumagai, 1999; Sorrel *et al.*, 1999; Tréhin *et al.*, 1999; Boniotti and Gutierrez, 2001; Porceddu *et al.*, 2001; Menges and Murray, 2002; Pathirana and Eason, 2006).

Marcadores moleculares. La expresión de numerosos genes del ciclo celular esta regulada por el ciclo y aparecen en distintas fases. La detección de expresión de genes se realiza por Northern blot (inmunotransferencia tipo Northern) o RT-PCR. El análisis por Northern blot comprende la extracción del RNA de las células en suspensión, la electroforesis del RNA en geles desnaturalizantes, transferencia e inmovilización del RNA en papel de nitrocelulosa y detección de RNA específicos con sondas marcadas complementarias de RNA o DNA (Teakle *et al.*, 2002). Por ejemplo, en células de tabaco BY-2 la *CycD3;2* marca la entrada de las células de G₀ a G₁ (Sorrell *et al.*, 1999) y los transcritos de histona *H4* caracterizan la fase S (Meshi *et al.*, 2000), de tal manera que con estos dos transcritos se pueden verificar dos fases específicas del ciclo celular. Estudios similares donde se analizan patrones de expresión de genes del ciclo celular se han reportado en *Medicago sativa* (Mészáros *et al.*, 2000) y *Arabidopsis thaliana* (Shaul *et al.*, 1996). El uso de este método se limita a los genes que previamente han sido analizados en un cultivo celular en particular.

1.3.3. Métodos Indirectos de Sincronización por Inducción

Como se menciona anteriormente, esta estrategia experimental para sincronizar cultivos celulares consiste en la remoción de algún nutriente (fosfato o sacarosa), o algún factor regulador del crecimiento (auxina).

Eliminación de fosfato. El fósforo es un elemento clave en la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y azúcares fosfatados, por lo tanto es un nutriente esencial para los cultivos celulares. Aunque se ha observado un cierto nivel de sincronía en diversos cultivos vegetales, los mejores resultados se han obtenido con el método de doble privación de fosfato (Kodama *et al.*, 1994) en cultivos celulares de *Catharanthus roseus*. (Tabla 1.1). El método de doble privación de fosfato consiste en lavar con medio sin fosfato un cultivo de dos días de crecido e incubarlo por tres días en medio sin fosfato,

posteriormente transferirlo a un medio con 0.2 mM de KH_2PO_4 , después de un día de crecimiento, el cultivo se lava y transfiere a un medio libre de fosfato por cuatro días, adicionando finalmente KH_2PO_4 a una concentración final de 0.675 mM (Kodama *et al.*, 1994). En el método de privación simple de fosfato, un cultivo de siete u ocho días de crecido se transfiere a medio fresco sin fosfato por tres días, posteriormente las células son reintroducidas al ciclo celular adicionando KH_2PO_4 a una concentración igual o superior a la que tenía el medio original (Sano *et al.*, 2004). Aunque la eliminación de fosfato bloquea los cultivos celulares preferentemente en la fase G_1 , el mecanismo de acción no es claro. En una biblioteca de cDNA elaborada a partir de células en fase S de cultivos sincronizados de *C. roseus* por doble privación de fosfato, Ito y col. (1991) identificaron la expresión de un gen similar a las histonas de mamífero y otros genes característicos del ciclo celular (Kodama *et al.*, 1994). En células de tabaco BY-2 se aislaron dos genes inducidos por fosfato, *phi-1* y *phi-2* (*phosphate-induced genes*). Aunque no se han encontrado homólogos significativos para *phi-1* en las bases de datos, el gen *phi-2* tiene una estructura canónica bZIP homóloga a proteínas relacionadas con la ruta de señalización por ácido abscísico (ABA), por ejemplo TRAB1 y ABI5 (Sano *et al.*, 2004).

Tabla 1.1.

Características de la eliminación de fosfato en cultivos celulares vegetales							
Cultivo celular	$[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ inicial	$[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ final	Periodo sin fosfato	Método de evaluación de sincronía	Tiempo después de la liberación	Fase y nivel de sincronía	Referencia
<i>Catharanthus roseus</i> L. cv B*	1.25 mM	0.675 mM	5 días	Citométrico	4 horas	G_1 70 – 80%	Ito <i>et al.</i> , 1991
<i>Medicago varia</i> cv Rambler (A_2)*	1.25 mM	0.675 mM	5 días	Citogenético	30 horas	M 8%	Kapros <i>et al.</i> , 1992
<i>Nicotina tabacum</i> cv BY-2**	2.72 mM	2.72 mM	3 días	Citogenético	16 horas	M 26%	Sano <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia**	1.25 mM	2.72 mM	3 días	Citométrico	12 horas	G_2 70%	Phthirana and Eason, 2006

*Método de doble privación de fosfato

**Método de privación simple de fosfato.

Eliminación de sacarosa. En la mayoría de las plantas, la sacarosa es la principal forma de transporte de carbohidratos. La disponibilidad de carbono en forma de sacarosa

es determinante en la división celular, por lo que existen mecanismos para censar los niveles de azúcar y mediar un control apropiado del ciclo celular. Se han reportado diversos procedimientos para la sincronización de cultivos celulares de vegetales privándolos de sacarosa ([87.64 mM]) (Tabla 1.2). En cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* la sacarosa induce la transcripción de *CycD3;1* y *CycD31*, por lo que la eliminación del nutriente arresta a las células en G₁ (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000).

Tabla 1.2.

Características de la eliminación de sacarosa en cultivos celulares vegetales					
Cultivo celular	Periodo sin sacarosa	Método de evaluación de sincronía	Tiempo después de la liberación	Fase y nivel de sincronía	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Lansberg erecta	24 horas	Marcaje con timidina[³ H]	8 horas	S, ~ 700 cpm/ μg DNA	Riou-Khamlichi <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Lansberg erecta, línea celular MM1	24 horas	Citogenético	18 horas	M, 16%	Menges and Murray, 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Lansberg erecta, línea celular MM2d	24 horas	Citogenético	19 horas	M, 11%	Menges and Murray, 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia	27 horas	Citogenético	24 horas	M, 11.5%	Phthirana and Eason, 2006

Eliminación de auxina. Las auxinas son compuestos naturales o sintéticos con actividad biológica similar, pero no necesariamente idéntica, a la de la auxina natural, el ácido indol-3-acético (IAA); en plantas superiores las respuestas a auxina incluyen elongación celular en secciones aisladas de coleótilo y tallo, división celular en callos en presencia de citocina, formación de raíces laterales, crecimiento de frutos partenocárpicos y producción de etileno (Taiz and Zeiger, 2006). En cultivos de células vegetales en suspensión suelen utilizarse auxinas sintéticas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1-naftalenacético (NAA) (Franklin and Dixon, 1994). Actualmente se han identificado diversos blancos de acción de la auxina en el ciclo celular. En protoplastos de tabaco, se ha observado un incremento en la expresión de los promotores de los genes *CDKA;1* y *CycB1;1* de *Arabidopsis thaliana* después de la adición de auxina y citocinina (Roef and Van Onckelen, 2004); la expresión de *CDKA;1* en cultivos de protoplastos de mesófilo de *Petunia hybrida* también depende de 2,4-D y citocinina (BA, N⁶-benziladenina) (Tréhin *et al.*, 1998). Los resultados en experimentos de privación de auxina (Tabla 1.3) en células de tabaco BY-2 sugieren que las células son arrestadas en G₀ (Renaudin, 2004).

Tabla 1.3.

Características de la eliminación de auxina en cultivos celulares vegetales.						
Cultivo celular	[Auxina]	Periodo sin auxina	Método de evaluación de sincronía	Tiempo después de la liberación	Fase y nivel de sincronía	Referencia
<i>Catharanthus roseus</i> L. cv. Little-Pinky	2,4-D 4.4 μ M	48 horas	Citométrico	3 – 4 horas	G ₁ , 70 – 80%	Ito <i>et al.</i> , 1991; Nishida <i>et al.</i> , 1992
<i>Nicotina tabacum</i> cv BY-2	2,4-D 0.9 μ M	72 horas	Citogenético	12 horas	M, 20%	Ishida <i>et al.</i> , 1993
	2,4-D 0.9 μ M	72 horas	Citogenético	16 horas	M, 15%	Mizoguchi <i>et al.</i> , 1994
	2,4-D 0.9 μ M	72 horas	Citogenético	21 horas	M, 15%	Tena and Renaudin, 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ecotipo Columbia (Col-0)	NAA 1 μ M	48 horas	Marcadores moleculares	NR	Expresión de CDKB1;1, CDKA;1 y CYCB1;1	Richard <i>et al.</i> , 2002
<i>Nicotina tabacum</i> cv BY-2	2,4-D 0.9 μ M	72 horas	Citogenético	12 horas	M, 10.5%	Sano <i>et al.</i> , 2004

1.3.4. Métodos Directos de Sincronización por Inducción

Los reactivos químicos que arrestan el ciclo celular vegetal actúan sobre la maquinaria del ciclo celular (actividad de las CDKs), en el huso mitótico o en las enzimas involucradas en la síntesis de DNA (Planchais *et al.*, 2000). La acción específica de los principales inhibidores químicos del ciclo utilizados en cultivos vegetales en suspensión se resume en la tabla 1.4.

Tabla 1.4.

Inhibidores químicos utilizados para sincronizar cultivos celulares vegetales en suspensión				
Maquinaria	Nombre	Blanco	Bloqueo	Referencia
Transiciones G ₁ /S y G ₂ /M	Olomoucina	Actividad de las CDKs	G ₁ /S y G ₂ /M	Glab <i>et al.</i> , 1994
	Roscovitina	Actividad de las CDKs	G ₁ /S y G ₂ /M	Planchais <i>et al.</i> , 1997
Huso mitótico	Colchicina	Despolimerización de microtúbulos	Metafase	Morejohn <i>et al.</i> , 1984
	Orizalina	Despolimerización de microtúbulos	Metafase	Morejohn <i>et al.</i> , 1987
	Propizamida	Despolimerización de microtúbulos	Metafase	Akashi <i>et al.</i> , 1988
	MG132	Proteosoma	Metafase	Genschik <i>et al.</i> , 1998
Síntesis de DNA	Mimosina (MIMO)	No determinado	G ₁ /S	Perennes <i>et al.</i> , 1993
	Afidicolina (Aφ)	Subunidades α y δ de la DNA polimerasa	S	Nagata <i>et al.</i> , 1992
	Hidroxiurea (HU)	Ribonucleótido reductasa	S	Eriksson, 1972

1.3.4.1. Bloqueadores de las transiciones G₁/S y G₂/M

La olomoucina (2-(2-hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-metilpurina) y la roscovitina (2-(1-D, L-hidroximetilpropilamina)-&-bencilamino-9isopropilpurina) son análogos de purina y fueron desarrollados como fármacos antitumorales, que actúan sobre las Cdk como inhibidores competitivos del ATP. En células animales, las cinasas Cdk1, Cdk2 y Cdk5 son sensibles a la olomoucina, mientras que las Cdk4 y Cdk6 exhiben una menor sensibilidad y no se presenta efecto en el complejo Cdk4-Ciclina D1 (Veselý *et al.*, 1994). En células vegetales la olomoucina no muestra especificidad por algún grupo de CDKs, por lo que bloquea el ciclo celular en las transiciones G₁/S y G₂/M (Tabla 1.5) (Glab *et al.*, 1994).

Tabla 1.5.

Bloqueadores de las transiciones G ₁ /S y G ₂ /M						
Inhibidor	Cultivo celular	Concentración y tiempo de exposición	Método de evaluación de sincronía	Tiempo después de la liberación	Fase y nivel de sincronía	Referencia
Olomoucina	Protoplastos de mesófilo de <i>Petunia hybrida</i>	100 μM por 24 horas	Citométrico	24 horas	G ₁ , 59% y G ₂ , 32%	Glab <i>et al.</i> , 1994
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100 μM por 20 horas	Citométrico	5 horas	G ₁ , 58% y G ₂ , 30%	Glab <i>et al.</i> , 1994
Roscovitina	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	50 μM por 13 horas	Citométrico	No liberadas 7 horas	G ₁ , 83% G ₂ , 81%	Planchais <i>et al.</i> , 1997; Boniorti and Gutierrez, 2001
	Protoplastos de mesófilo de <i>Petunia hybrida</i>	25 μM por 24 horas	Citométrico	24 horas	15% G ₁ , S 13% y G ₂ 72%	Tréhin <i>et al.</i> , 1998

En células animales comparado con la olomoucina, la roscovitina tiene una elevada actividad inhibitoria en Cdk1, selectividad por Cdk2 y Cdk5 y actividad antimitótica en la transición G₂/M. En células de tabaco BY-2 la roscovitina actúa en dos puntos, si las células se encuentran en fase estacionaria (DNA 2C, fase G₁) el 83% de las células son arrestadas en G₁/S, pero si las células se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento (DNA 4C, fases S y G₂) 81% se encontraran en la transición G₂/M (Planchais *et al.*, 1997; Boniorti and Gutierrez, 2001). Como en las células de tabaco BY-2, los cultivos primarios de protoplastos de mesófilo de *Petunia hybrida* son arrestados en alguna de las dos transiciones dependiendo de la fase de crecimiento (Tabla 1.5) (Tréhin *et al.*, 1998). Por otro lado, Planchais *et al.* (2000) utilizando roscovitina al 50 μM en células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* reportan un bloqueo reversible específicamente en la fase G₁.

Debido a la falta de especificidad en la fase de bloqueo, los inhibidores de las CDKs son poco recomendables para estudios que involucren la sincronización en células vegetales en suspensión (Planchais *et al.* 2000).

1.3.4.2. Bloqueadores del huso mitótico

El huso mitótico (aparato mitótico) es una estructura temporal especializada, formada por una matriz de microtúbulos con orientación bipolar, presente en las células eucariontes durante la mitosis, que captura, orienta y separa los cromosomas hacia polos opuestos de la célula durante la metafase y anafase. Los microtúbulos son polímeros tubulares proteicos huecos, rígidos y no ramificados, consistentes en 13 protofilamentos de moléculas globulares diméricas de tubulina (α - y β -tubulina), dichos microtúbulos están polarizados en sus extremos, un extremo positivo (+) y un extremo negativo (-), con diferentes comportamientos de polimerización (Morgan, 2007). El mecanismo de acción de las drogas antimicrotúbulos es inhibir la polimerización de los microtúbulos (por el extremo positivo) durante la formación del huso mitótico, lo cual arresta a las células en la transición metafase/anafase. Así, se pueden arrestar las células en metafase utilizando drogas antimicrotúbulos como la colchicina, la orizalina y la propizamida (Planchais *et al.*, 2000). Estos reactivos químicos no bloquean indefinidamente a las células en metafase, por lo que después de ~14 horas los cromosomas se descondensan y forman micronúcleos (Singh, 2002).

La colchicina, un producto del azafrán otoñal (*Colchicum autumnale*), impide la polimerización de los protómeros de tubulina. En experimentos de unión a colchicina realizados en cultivos en suspensión de rosa (*Rosa sp.* cv. Paul's scarlet), hibisco (*Hibiscus rosa-senensis*) y zanahoria (*Daucus carota*) se demostró que los microtúbulos de células vegetales son 100 a 1000 veces más resistentes a los tratamientos con colchicina que los microtúbulos de células animales (Morejohn *et al.*, 1984). Este inhibidor es ampliamente utilizado para estudios de análisis y clasificación de cromosomas vegetales por citometría de flujo (Tabla 1.6) (Singh, 2002). Sin embargo, es preferible arrestar células vegetales en fase M con otras drogas antimicrotúbulos diferentes a la colchicina, las cuales tienen el mismo efecto pero a concentraciones micromolares, de esta manera es más fácil lavarlas del cultivo y evitar anomalías en las células.

La orizalina (3,5-dinitro-*N,N*-dipropilsulfonilamida) se utiliza como herbicida debido a su afinidad por los microtúbulos vegetales, arrojando a las células en la metafase (Morjohn *et al.*, 1987). Aunque se han observado resultados favorables en cultivos en

suspensión (Tabla 1.8), su uso esta poco generalizado principalmente porque se tienen mejores resultados con otros inhibidores.

Tabla 1.6.

Bloqueadores del huso mitótico						
Inhibidor	Cultivo celular	Concentración y tiempo de exposición	Método de evaluación de sincronía	Tiempo después de la liberación	Fase y nivel de sincronía	Referencia
Colchicina	Protoplastos de hojas de <i>Petunia hybrida</i>	2.5 μ M por 15 horas	Citogenético	Inmediato	M, 10%	Conia <i>et al.</i> , 1987
Orizalina	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	15 μ M por 24 horas	Citogenético	7 horas	M, 26 – 29%	Shaul <i>et al.</i> , 1996
	Protoplastos de mesófilo de <i>Petunia hybrida</i>	3 μ M por 14 horas	Citométrico	Inmediato	66% G ₂ /M	Glab <i>et al.</i> , 1994
Propizamida	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	6 μ M por 4 horas o 3 μ M por 10 – 14 horas	Citogenético	30 minutos	M, 25%	Akashi <i>et al.</i> , 1988
MG132	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	100 μ M por 4 horas	Citométrico	Inmediato hasta 4 horas	M, 50%	Genschik <i>et al.</i> , 1998

La propizamida, o pronamina, por ser un inhibidor específico de las células vegetales (no tiene efecto en los microtúbulos de animales), es el ingrediente activo del herbicida comercial Kerb. En cultivos celulares en suspensión, la repolarización de los microtúbulos del huso mitótico se observa 15 minutos después de la liberación, por lo que el pico mitótico se observa inmediatamente después (Akashi *et al.*, 1988; Samuels *et al.*, 1998). Nagata y colaboradores (1992, 1999, 2004) hicieron experimentos con cultivos de células TBV-2 tratando de obtener un mejor nivel de sincronía, para esto, adicionaron al cultivo primero afidicolina y posteriormente agregaron propizamida. Utilizando esta estrategia ellos reportan un nivel de sincronía de hasta el 95% de MI. Este protocolo ha sido difícil de reproducir y los resultados reportados muestran niveles de sincronía de 40 hasta el 80% de MI (Samuels *et al.*, 1998).

El proteosoma 26S (en ocasiones escrito “proteosoma”) es un complejo proteico de varias subunidades de gran tamaño (~2,000 kDa, 26S) que degrada proteínas citosólicas en oligopéptidos de 7 a 8 residuos de longitud. El proteosoma 26S consiste en un núcleo catalítico en forma de barril llamado proteosoma 20S (~670 kDa) y dos casquetes 19S (~700 kDa; también denominados PA700 y el regulador 19S), que se asocian con los extremos del proteosoma 20S y estimulan su actividad. El proteosoma 20S hidroliza sólo proteínas no plegadas en forma independiente de ATP; los casquetes 19S intervienen en

la identificación y la degradación de los sustratos de proteínas unidas a ubiquitina. (Voet y Voet, 2006; Morgan, 2007). Otros bloqueadores usados son los inhibidores del proteosoma 26S, que bloquean el ciclo celular en la transición metafase/anafase, debido a que las proteínas marcadas por el complejo APC con ubiquitina no pueden ser degradadas. El MG132 (N^α-benciloxicarbonil-L-leucil-L-leucinal) o Z-Leu-Leu-Leu-H es un péptido modificado, en este caso con un aldehído en el posible sitio de hidrólisis, y por lo tanto es capaz de bloquear al proteosoma de manera reversible o irreversible (Bongyo *et al.*, 1997). Probablemente el tratamiento de células vegetales con MG132 no sea del todo reversible; en estudios en células TBY-2 se observaron figuras en anafase aberrantes y un retraso de 4 horas en el reingreso al ciclo celular (Tabla 1.6) (Genschik *et al.*, 1998). En cultivos celulares en suspensión de *Arachis hypogea* se ha utilizado MG132 (20 μM por una hora) para determinar el efecto de las auxinas exógenas en cultivos osmóticamente estresados (Nag *et al.*, 2006).

1.3.4.3. Inhibidores de la Síntesis de DNA

Durante la fase S, la replicación del DNA depende de la síntesis de desoxirribonucleótidos y de la actividad de las enzimas de la maquinaria de replicación. La mimosina (MIMO) es un aminoácido vegetal extraído de las semillas de la planta koa hoale (*Acacia koa*). Este inhibidor bloquea la progresión del ciclo celular en la interfase G₁/S, antes del establecimiento de las horquillas de replicación alterando el metabolismo de los desoxirribonucleótidos, pero el mecanismo preciso de acción todavía se desconoce (Mosca *et al.*, 1992). Los núcleos de protoplastos de mesófilo de *Petunia hybrida* pueden ser arrestados en G₁ con este inhibidor (Tabla 1.7) (Perennes *et al.*, 1993). De acuerdo con Reichheld *et al.* (1998) en células de tabaco BY2 tratadas con MIMO se detecta muy poca síntesis del transcrito de la histona H3, lo que sugiere un bloqueo en la transición G₁/S.

Los desoxirribonucleótidos se sintetizan a partir de sus ribonucleótidos correspondientes por reducción de su posición C2', en vez de la síntesis *de novo* a partir de precursores que contienen desoxirribosa. Las enzimas que catalizan la formación de desoxirribonucleótidos se denominan ribonucleótido reductasas (RNR). Se conocen tres o cuatro clases de RNR, que difieren en estructura, sustratos (nucleótidos di- o trifosfatados), en los cofactores que emplean y en la manera en que obtienen los equivalentes reductores. Las RNRs clase I son enzimas estrictamente anaerobias, que se

dividen en dos subclases, Ia y Ib; las plantas, al igual que los demás eucariontes, tienen RNRs clase Ia (Fontecave, 1998).

Tabla 1.7.

Bloqueadores de la síntesis de DNA						
Inhibidor	Cultivo celular	Concentración y tiempo de exposición	Método de evaluación de sincronía	Tiempo después de la liberación	Fase y nivel de sincronía	Referencia
Mimosina	Protoplastos de mesófilo de <i>Petunia hybrida</i>	2 mM por 24 horas	Citométrico	Inmediato	> 60% en G ₁	Perennes <i>et al.</i> , 1993
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1 mM por 28 horas	Citogenético	16 horas	M, 10%	Furest <i>et al.</i> , 1996
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	2 mM por 24 horas	Marcadores moleculares	No liberado	Expresión de <i>H3</i>	Reichheld <i>et al.</i> , 1998
Hidroxiurea	<i>Haplopappus gracilis</i>	3 Mm por 24 horas	Citogenético	12 horas	M, 34%	Eriksson, 1972
	<i>Datura innoxia</i> Mill.	10 mM por 12 a 24 horas	Citométrico	14 – 15 horas	G ₂ , 74%	Conia <i>et al.</i> , 1990
	<i>Medicago varia</i> cv. Rambler (A2)	5 mM por 24 horas	Citométrico	19 horas	G ₂ /M, 75%	Magyar <i>et al.</i> , 1993
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	60 mM por 24 horas	Marcadores moleculares	Inmediato	Inhibición de la expresión de <i>H4</i>	Reichheld <i>et al.</i> , 1995
	<i>Triticum monococcum</i>	5 mM por 36 horas	Marcadores moleculares	2 horas	Expresión de <i>PCNA</i>	Boniotti and Gutierrez, 2001
Afidicolina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.5 mM por 24 horas	Citométrico	1 horas	G ₁ , ~70%	Pathirana and Eason, 2006
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2	16 μM por 24 horas	Citogenético	6 a 7 horas	M, de 30 a 80%	Nagat <i>et al.</i> , 1992; Samuels, <i>et al.</i> , 1998.
	<i>Catharanthus roseus</i> cv. B	50 μM por 24 horas	Marcaje con timidina[³ H]	No liberadas	~ 1x10 ⁴ cpm/ 1x10 ⁵ células	Ito <i>et al.</i> , 1991
	<i>Medicago varia</i> cv. Rambler (A2)	30 a 60 μM por 36 horas	Citométrico	17 horas	G ₂ /M, 75%	Magyar <i>et al.</i> , 1997
	<i>Arabidopsis thaliana</i> línea celular MM1	12 μM por 21.5 horas	Citogenético	13 horas	M, 12%	Menges and Murray, 2002
	<i>Arabidopsis thaliana</i> línea celular MM2d	12 μM por 21.5 horas	Citogenético	13 horas	M, 12%	Menges and Murray, 2002
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	12 μM por 24 horas	Citométrico	3 horas	G ₂ /M, 70 – 80%	Pathirana and Eason, 2006.

Las RNRs clase Ia son heterotetrámeros formados por dos homodímeros sin actividad catalítica con estructura $\alpha 2\beta 2$. El componente mayor ($\alpha 2$), llamado proteína R1, contienen el sitio de unión al sustrato, así como tres sitios efectores de unión independientes que controlan la actividad catalizadora de la enzima y su especificidad de

sustrato; entre los residuos catalizadores de R1 se incluyen varios grupos tiol activos en reacciones redox (radicales cisteinil). El componente menor ($\beta 2$), llamado proteína R2, contiene un grupo prostético binuclear Fe(III), cuyos dos iones Fe^{3+} están conectados por un ion O^{2-} (un puente μ -oxo). El complejo Fe(III) interactúa con un radical tirosilo inusual (TyrO \cdot), dicha interacción magnética es más fuerte en la R2 de *A. thaliana* que en la R2 de ratón o *Escherichia coli*, lo que sugiere una distancia menor a los 10Å entre el radical y el complejo de hierro (Sauge-Merle *et al.*, 1997; Fontecave, 1998).

A partir de una librería de cDNA de células de tabaco BY-2 sincronizadas en fase S se clonó un cDNA que corresponde a R2 y dos cDNAs de R1. Experimentos de Southern blot revelan que R2 es monogénico, mientras que R1 es codificado por una pequeña familia multigénica (Chabouté *et al.*, 1998). *A. thaliana* posee tres genes que codifican la subunidad R2 (*TSO2*, *RNR2A* y *RNR2B*), los cuales son críticos para la progresión del ciclo celular, reparación de daños en el DNA y procesos de desarrollo (Wang and Liu, 2006). En cultivos celulares de tabaco BY-2 el nivel de RNR es regulado por el ciclo celular mostrando un máximo de expresión en fase S; a mediados de la fase S los transcritos de R2 muestran un nivel mayor que los de R1 (Chabouté *et al.*, 1998).

La hidroxurea inhibe la actividad de la RNR, bloqueando el ciclo celular en fase S temprana, destruyendo de manera específica el radical tirosilo de R2 que quela los iones Fe^{3+} (Fontecave, 1998). El tratamiento con HU es muy utilizado para sincronizar tejidos vegetales en estudios de cariotipos (Singh, 2002). Antes de que se generalizara el uso de la afidicolina en células TBV-2, los mejores resultados de sincronización se habían obtenido con HU en cultivos en suspensión de *Haplopappus gracilis* (Eriksson, 1972) y *Datura innoxia* Mill (Conia *et al.*, 1990). Resulta notable que la cantidad de inhibidor requerida para bloquear la actividad en células TBV-2 sea 3 a 10 veces mayor que la que se necesita en otros cultivos (Tabla 1.7).

La DNA polimerasa es la enzima que sintetiza DNA *de novo* a partir de un templado de DNA de hebra sencilla. Las células eucariontes expresan al menos cuatro tipos distintos de DNA polimerasas implicadas en la replicación del DNA durante la fase S, DNA polimerasas (pol) α , δ , ϵ y γ (alternativamente POLA, POLG, POLD1 y POLE) (Lewin, 2004). La afidicolina es una molécula extraída del hongo *Cephalosporium aphidicola*, inhibe la DNA polimerasa α y δ al competir con los dCTPs por el sitio de unión a la enzima (Oguro *et al.* 1979, Nagata *et al.*, 1992). Al bloquear células de tabaco BY-2 con afidicolina a 5 μ g/ mL (16 μ M) utilizando el método de Nagata *et al.*, (1992) se obtuvo un índice mitótico de el 80%; mientras que empleando el método de doble sincronización con

afidicolina y propizamida se reporta un MI de el 95%. Aunque existen numerosos ejemplos de sincronizaciones exitosas en células TBY-2 usando afidicolina (Nagata et al., 2004), el protocolo es notoriamente problemático y sólo se tienen reportes de estos niveles de sincronía en células TBY-2, los cuales, son poco reproducibles (tabla 1.7). Por otro lado, la eficiencia de la afidicolina varía de un fabricante a otro, dando resultados de sincronización que varían usando concentraciones que van de 3 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9 a 18 μM) (Samuels *et al.*, 1998), además de ser un reactivo costoso y, una vez reconstituido, con una vida de anaquel corta.

De los diferentes reactivos químicos disponibles para sincronizar cultivos celulares vegetales, los más utilizados son HU y A ϕ debido a su especificidad en una sola fase del ciclo celular, a que el arresto no se debe a muerte celular o a anomalías en la mitosis y a que sus resultados son homogéneos en distintas especies.

1.4. Síntesis de Proteínas

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos que actúan en concierto con factores accesorios para “traducir” la información genética del mRNA a proteína. El proceso dinámico de traducción del mRNA es usualmente dividido en tres fases: iniciación, elongación y terminación. En la fase de iniciación se ensambla el ribosoma con el RNA de transferencia iniciador. Posteriormente tiene lugar la fase de elongación, donde se forman los enlaces peptídicos en el centro catalítico del ribosoma y finaliza en la fase de terminación.

El ribosoma alcanza el codón de paro, el polipéptido es liberado y el ribosoma se separa del mRNA. En el proceso de inicio de la síntesis de proteínas (fase que regula la velocidad de síntesis) las células eucariontes requieren varios factores de iniciación (eIFs). La iniciación de la traducción comprende cuatro pasos subsecuentes (fig. 1.3): (I) formación del complejo de preiniciación 43S el cual incluye la subunidad ribosomal pequeña (40S), los factores eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 y eIF5, y el Met-tRNA_i^{Met}; (II) el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5' cap del mRNA; (III) escrutinio de la región 5' no traducida (5' UTR) del mRNA y el reconocimiento del codón de inicio; y (IV) unión de la subunidad ribosomal grande (60S) para ensamblar un ribosoma completo (80S) (Pestova and Hellen, 2000; Pestota and Kolupaeva, 2002; Preiss and Hentze, 2003).

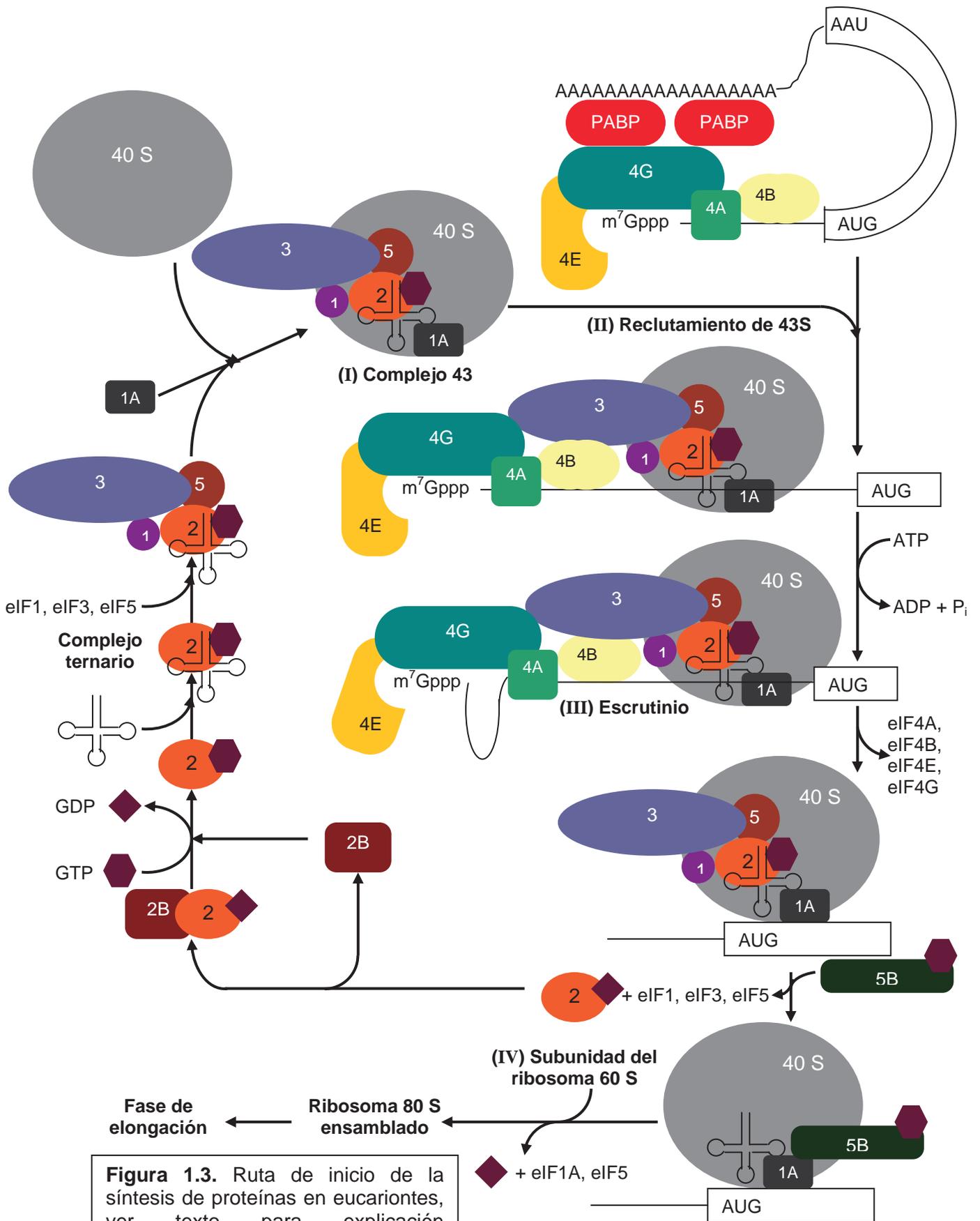


Figura 1.3. Ruta de inicio de la síntesis de proteínas en eucariontes, ver texto para explicación (modificado de varios autores).

Existen varios puntos de control traduccional, entre los que destacan dos: la regulación de la actividad por los factores de iniciación eIF2 y eIF4F (complejo formado por los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A). En el caso de eIF2, cinasas específicas lo fosforilan, excluyéndolo de la ruta de inicio de la síntesis de proteínas. Aunque existe evidencia de que las plantas tienen una cinasa de eIF2 α , todavía es incierta la manera en como se regula esta ruta (Browning, 2004). Por otra parte, la regulación de eIF4F esta determinada por la disponibilidad de la subunidad eIF4E, la cual tiene el potencial de unirse tanto a eIF4G como a la proteína 4E-BP. La capacidad de 4E-BP de unirse a eIF4E es regulada por su estado de fosforilación y, en general, la fosforilación de 4E-BP inhibe su capacidad de unirse a eIF4E (Merrick, 2003). En mamíferos, la cinasa Mnk1 fosforila el eIF4E, lo cual promueve su asociación con eIF4G. La aparente ausencia en plantas de una proteína 4E-BP y del dominio de unión a Mnk-1 en eIF4E, sugieren que la maquinaria para la regulación de la síntesis de proteínas es diferente en vegetales (Browning, 2004).

Aunque las formas de regulación descritas son las más conocidas no se excluye la existencia de otras rutas de regulación generales o específicas. Por ejemplo, el eIF4A de plantas esta asociado con una CDK durante la proliferación celular activa, por lo que se podría especular que las plantas no utilizan las rutas dependientes de eIF2 y eIF4F para la regulación general de la síntesis de proteínas y que existen otras rutas menores. Es probable que los vegetales posean rutas diferentes de regulación del inicio de la síntesis de proteínas, las cuales todavía no son identificadas (Browning, 2004).

1.4.1. Características del eIF3 de Plantas

Las condiciones fisiológicas favorecen la asociación de las subunidades ribosomales 40 y 60S para completar un ribosoma 80S. Así, el primer requisito para la iniciación de la síntesis de proteínas es promover la disociación de ribosomas vacantes en sus subunidades. Lo anterior es realizado por el factor eIF3, el cual también promueve la unión del complejo ternario a la subunidad 40S y es requerido para unir el complejo 43S al mRNA (Fig. 1.3) (Preiss y Hentze, 2003). Este factor de inicio de la traducción consiste de un núcleo de cinco subunidades altamente conservadas (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3i y eIF3g en levaduras de gemación) y de subunidades adicionales diferentes, seis en mamíferos y siete en plantas (Tabla 1.8) (Burks *et al.*, 2000).

La subunidad eIF3f no esta presente en el complejo eIF3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Una región de eIF3f cercana al N terminal contiene un motivo conservado similar a la familia de proteínas Mov34. La subunidad Mov34 del proteosoma 26S murino

(subunidad S12, p40) exhibe una similitud significativa con dos subunidades del eIF3, eIF3f y eIF3h (Aravind and Ponting, 1998). Hoffmann y Bucher (1998) describieron simultáneamente el motivo MPN, en el N-terminal de las proteínas Mpr1p y Pad1p de levaduras y, como se mencionó antes, dicho motivo se presentaba también en dos subunidades del proteosoma, dos subunidades del eIF3 y otras proteínas eucarióticas. El dominio MPN se expande por ~140 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de las proteínas. Cabe mencionar que las proteínas que contienen el dominio MPN forman parte de grandes complejos multiproteicos.

Tabla 1.8.

Subunidades del factor eIF3 en diferentes organismos (Modificado de Burks <i>et al.</i>, 2002; Zhou <i>et al.</i>, 2004).						
Subunidad	Motivo consenso	Humano	Trigo	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
eIF3a	PCI	p170	p116	p114	p110	p107
eIF3b	RBD	p116	p83	p82	p90	p84
eIF3c	PCI	p110	p107	p105	p93	p104
eIF3d	Ninguno	p66	p87	p66	Ninguna	Moe1p
eIF3e	PCI	p48	p45	p51	Ninguna	Int6p
eIF3f	Mov34	p47	p34	p32	Ninguna	Csn6p
eIF3g	RBD, dedos de zinc	p44	p36	p33, p35	p33	Tif35p
eIF3h	Mov 34	p40	p41b	p38	Ninguna	p40
eIF3i	WD40	p36	p41a	p36	p39	Sum1p
eIF3j	Ninguno	p35	Ninguna	Ninguna	p30	Ninguna
eIF3k	PCI	p35	p28	p25	Ninguna	Ninguna
eIF3l	PCI	p28	p56	p65	Ninguna	Ninguna
eIF3m	PCI	GA17(?)	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Csn7Bp

La presencia del dominio Mov34 en complejos multiproteicos con diversas funciones (proteosoma 26S, COP9 y complejos traduccionales) sugiere que ellas evolucionaron a partir de un ancestro común. La función del dominio Mov34 es desconocida, pero parece ser que tiene una función estructural en complejos multiproteicos. Por otro lado, es posible que estos motivos permitan la interacción con otros grandes complejos, tales como el proteosoma o COP9, ejerciendo una función reguladora (Aravind and Ponting, 1998; Hoffmann and Bucher, 1998).

Aunque la función de eIF3f no es del todo clara, se han realizado algunos estudios sobre la expresión de este factor en cereales durante el desarrollo y condiciones de estrés por calor. Un hecho interesante es que esta subunidad es altamente expresada durante el

desarrollo de las semillas de trigo cuando otras subunidades del eIF3 no son expresadas, además esta presente en mayor cantidad en las hojas de trigo en expansión. Los niveles de expresión de eIF3f se incrementan cuando las plántulas son sometidas a estrés por calor. Estos datos sugieren que esta subunidad podría tener funciones específicas de tejido o ser un regulador durante situaciones de estrés o desarrollo (Gallie *et al.*, 1998).

Recientemente se han reportado los fenotipos de pérdida de función de mutantes por inserción de T-DNA de otras subunidades del eIF3. La mutante de la subunidad eIF3h presenta defectos pleitrópicos del desarrollo, requieren azúcar exógena para pasar de la germinación a un estado vegetativo, aunque son hipersensibles a cantidades elevadas de azúcar (Kim *et al.*, 2004). Por otro lado, la mutante de la subunidad eIF3e presenta un fenotipo normal durante la germinación, sin embargo, durante la etapa reproductiva, las flores carecen de pétalos y tienen un número reducido de estambres, lo que resulta en una esterilidad parcial (Yahalom *et al.*, 2005).

Lo anterior sugiere que algunas subunidades que forman parte del complejo eIF3 tienen otras funciones, posiblemente por asociación con otros complejos proteicos. En eritrocitos de mamífero, la asociación directa entre la proteína eritroide 4.1 (proteína del citoesqueleto que estabiliza la estructura reticular del esqueleto de la membrana que subyace a la bicapa de fosfolípidos) y el eIF3g sugiere que esta última podría actuar como una proteína de anclaje al citoesqueleto (Hou *et al.*, 2000). Otro ejemplo es el de eIF3e, el cual puede interactuar con el signalosoma COP9 (CSN) y el proteosoma 26S; la pérdida de la regulación de eIF3e, ocasionada por el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), cambia su localización subcelular al núcleo (Watkins and Norbury, 2004). Los anteriores, son solo algunos ejemplos de subunidades de eIF3 cuya asociación con otras proteínas sugieren funciones alternativas. Así que, es probable que eIF3f tenga otras funciones al asociarse con otros complejos multiproteicos, además de ser parte del factor eIF3.

1.4.2. Antecedentes de la Función de eIF3f

Por medio de experimentos de Expresión Diferencial efectuados en frijol infestado con *Rhizobium tropici*, nuestro grupo de trabajo descubrió un gen adscrito al ciclo celular (*caf1*), el cual estaba regulado por algunos factores de crecimiento (citocininas y auxinas). Por medio de análisis bioinformáticos se determinó que *caf1* era homólogo de p47 de humano (eIF3f). En cultivos celulares sincronizados de la línea TBY-2, se demostró que *caf1* presentaba un patrón de expresión limitado a la transición G₂/M del ciclo celular, y cuya ausencia impedía la división celular. Lo anterior sugirió que la expresión de *caf1* era

necesaria durante la fase G₂/M del ciclo celular. Puesto que p47 forma parte del factor de inicio de la síntesis de proteínas eIF3, esto planteaba la posibilidad de que Caf1 estuviera participando en dicho proceso (Higareda *et al.*, 2003).

Para comprobar esta posible función, Farias (2002) utilizó un sistema acoplado de transcripción y traducción *in vitro*, encontrando que al expresarse Caf1 en el sistema, se inhibía la síntesis de las proteínas para los genes ensayados (ciclina B1 y B2, o bien la luciferasa). Además, en esta serie de experimentos se determinó que la inhibición de la síntesis de proteína era dependiente de la dosis de Caf1. Con base en lo anterior el nombre del gen se cambió a *psif* (*protein synthesis inhibition factor*).

Llanderal (2003) utilizó cultivos en suspensión de células de tabaco (línea BY-2) sincronizados con afidicolina, y por medio de experimentos de pulso y caza determinó que la síntesis de proteínas durante la transición G₂/M era inhibida al inducir la expresión de eIF3f *in vivo*, mientras que la inducción del antisentido de eIF3f no inhibía la síntesis de proteínas en dicha fase de transición. Los experimentos de Llanderal permitieron corroborar que eIF3f no es una parte permanente del complejo eIF3, puesto que el efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas no se observa durante todo el ciclo celular. Guzmán (2005) reportó resultados similares en células de mamífero, observando un patrón de expresión del homólogo del gen *eIF3f* de humano similar al de células de tabaco, lo que señala que la función de *eIF3f* esta conservada entre diferentes reinos de eucariontes.

Asano y colaboradores en 1997 reportaron que la proteína eIF3f estaba en una proporción inferior comparada con otras subunidades del complejo eIF3. Con base en éstas y otras publicaciones Farias (2002) propone que eIF3f no es una subunidad permanente del eIF3, sino que se une temporalmente durante la fase G₂/M, donde presenta su pico máximo de expresión, provocando la inhibición de la síntesis de proteínas y la entrada a mitosis.

Por otra parte, Hernández (2005) reportó en vegetales un sitio de reconocimiento en el gen eIF3f por CDK, dicho sitio no se presenta en los genes de los homólogos de eIF3f de otros organismos. Este motivo comprende a los residuos 272 – 278 (SSITRT), que se proponen como huella específica de eIF3f en plantas. Lo antes mencionado sugiere que la función celular de eIF3f podría consistir en la inhibición de la síntesis de proteínas en la fase G₂/M del ciclo celular y que dicha inhibición sería esencial para la progresión del ciclo. Además, debido a su presencia en la transición G₂/M, podríamos utilizar a la proteína eIF3f como marcador de ciclo celular en experimentos de sincronización.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en suspensión de la línea celular NT-1 son sincronizables por métodos directos e indirectos.

2.2. Objetivo General

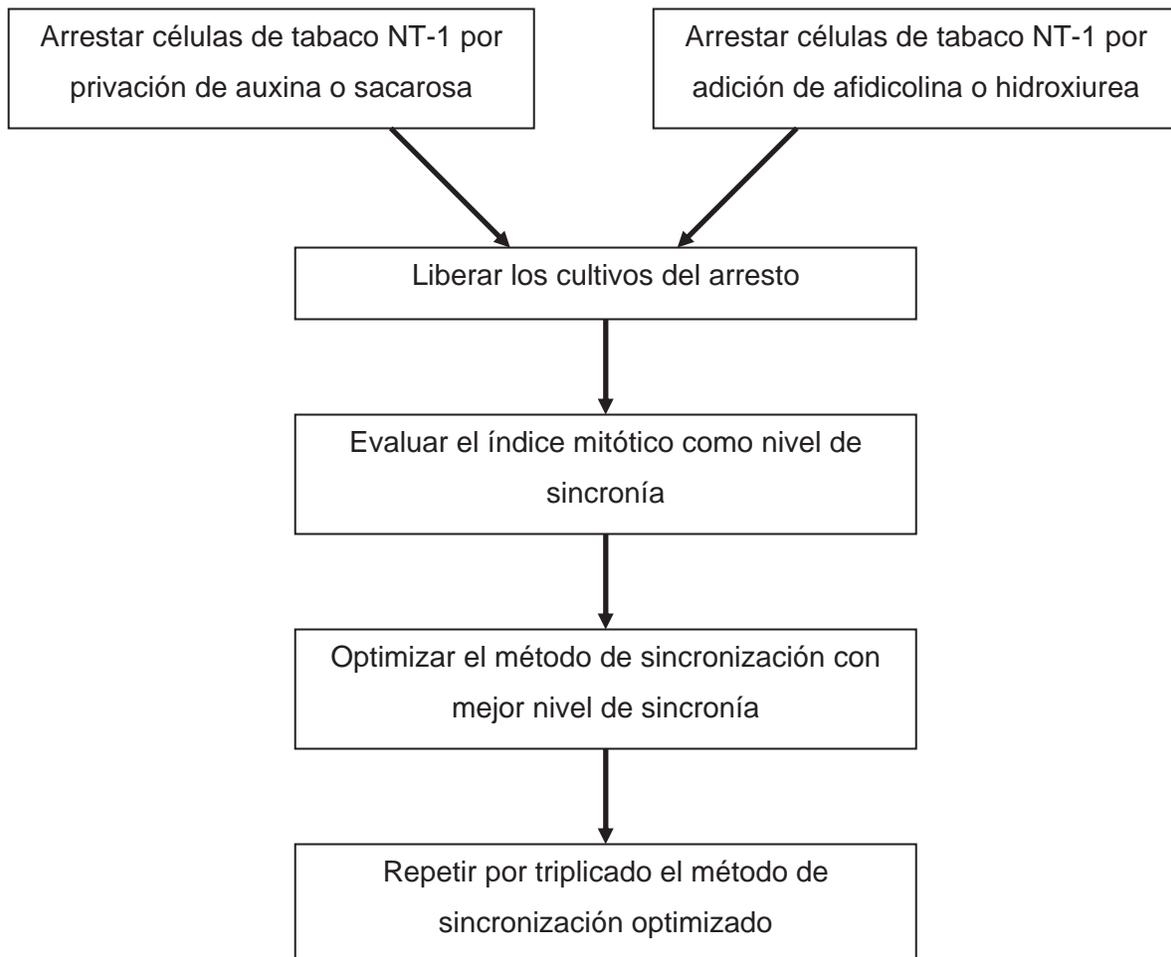
Establecer un protocolo de sincronización adecuado para los cultivos en suspensión de tabaco de la línea celular NT-1.

2.3. Objetivos Particulares

- Evaluar y probar métodos de sincronización indirectos, por privación de auxina y sacarosa, o directos, con adición de afidicolina e hidroxiquinolina, para la línea celular NT-1.
- Optimizar el método de sincronización con el mejor índice mitótico.

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo Celular en Suspensión de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2), Línea Celular NT-1

Este cultivo ha sido mantenido en nuestro laboratorio por más de 3 años, después de que fue proporcionado por el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV), Unidad Irapuato, en 2003.

4.1.1. Mantenimiento de la Línea Celular NT-1

Las células de tabaco NT-1 (An, 1985) se mantienen en medio LS (Linsmaier and Skoog, 1964) con las modificaciones descritas por Nagata *et al.*, 1992. Las células se subcultivan cada 7 días (células en fase estacionaria) a medio fresco e incubadas a 25° C en oscuridad en un agitador orbital a 120 – 130 r.p.m.

El subcultivo se realiza con una pipeta graduada de 10 mL, diámetro de la boca de 2 mm, con filtros de silicón. Se transfieren 7% (v/v) de inóculo a matraces Erlenmeyer con rosca de 500 mL con 100 mL de medio LS modificado, en condiciones de esterilidad. La rosca de los matraces se deja parcialmente abierta y el borde es cubierto con micropore.

4.1.2. Medio LS Modificado

Para preparar medio LS (Linsmaier and Skoog, 1964) modificado por Nagata y col. (1992) se disuelven en agua tridestilada 30 g L⁻¹ de sacarosa (87.64 mM) (Bioxon), 4.3 g L⁻¹ mezcla de sales MS (1X) (Sigma) y 0.2 g L⁻¹ KH₂PO₄ (1.47 mM) (Babel); se ajusta el pH a 5.8 con KOH 1 N. Se esteriliza en autoclave por 20 minutos. Una vez a temperatura ambiente, se añaden 2 mL L⁻¹ de solución stock de vitaminas y 0.5 mL L⁻¹ de solución stock de 2,4-D.

Solución Stock de Vitaminas

Se disuelven en 10 mL de agua tridestilada 5 mg de tiamina-HCl (Sigma) y 0.5 g de myo-inositol (Sigma), se esteriliza con filtro (tamaño de malla 0.22 µM); se toman alícuotas de 1.5 mL y se almacenan a -20° C (Franklin and Dixon, 1994). La concentración de los stocks de tiamina HCl y myo-inositol es de 15 y 277.55 mM, y la concentración final en el medio es de 1.2 µM y 555.10 µM, respectivamente.

Solución Stock de 2,4-D (Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético)

Se pesan 0.004 g de 2,4-D y disuelva en 10 mL de KOH 0.1 N. Esterilizar con filtro (tamaño de malla 0.22 μM). Se prepara solución de stock cada vez que se necesite, no se almacena. La concentración de stock es de 1.81 mM y la concentración final es de 0.9 μM (Franklin and Dixon, 1994).

4.2. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Afidicolina

El método de sincronización utilizado fue el establecido para células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 por Nagata *et al.*, (1992, 1999) con las modificaciones descritas por Samuels y col. (1998). Para iniciar la sincronización, se transfieren con una pipeta estéril (10 mL de volumen, abertura de boca 2mm) 12 mL de un cultivo de tabaco NT-1 de 7 días de crecido a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio LS modificado y 50 μL del stock de afidicolina (10 mg mL⁻¹). El cultivo se incuba por 24 horas bajo las condiciones de cultivo estandarizadas.

Para liberar a las células del bloqueo con afidicolina el cultivo se lava con 1 L de medio LS modificado incompleto (sin vitaminas ni auxina), utilizando un tamiz de acero inoxidable con tamaño de malla de 20. El contenido del matraz con afidicolina se vierte sobre el tamiz, permitiendo a la solución drenar a un contenedor en la parte inferior. Las células colectadas en la malla se lavan lentamente con medio LS incompleto, agitando constantemente con una espátula estéril. Después de lavadas, las células son resuspendidas en 100 mL de medio LS completo. A partir de este momento (tiempo 0) se toman alícuotas de 500 μL cada hora durante 16 horas para determinar el índice mitótico.

Solución Stock de Afidicolina

La solución stock de afidicolina se prepara en DMSO (dimetil sulfóxido) a 10 mg mL⁻¹ y se almacena a -20° C. De acuerdo con Samuels *et al.*, (1998) el DMSO no tienen efecto en los microtúbulos de las células de tabaco en división a una concentración igual o menor al 0.1%.

4.3. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 por Privación de Auxina

Procedimiento modificado de Chen *et al.*, (2001) y Sano *et al.*, (2004). La sincronización se inicia con 100 mL de cultivo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se transfiere un cultivo de 7 días de crecido a un tamiz de acero estéril con tamaño de malla de 20 μm en una unidad de filtrado de 47 mm de diámetro. Las células colectadas en la

malla se lavan con 500 mL de medio LS modificado incompleto (sin vitaminas y 2,4-D) y se transfieren con una espátula estéril a 100 mL de medio LS modificado sin 2,4-D. El cultivo se incuba durante tres días bajo las condiciones de cultivo estandarizadas.

Para liberar a las células del arresto, 50 mL del cultivo se transfieren a un tamiz de acero estéril (tamaño de malla de 20 μm , unidad de filtrado de 47 mm de diámetro), las células colectadas se regresan al medio original; este paso se realiza con el fin de concentrar las células del cultivo. Utilizando una pipeta de 10 mL (abertura de boca 2 mm, con filtro de silicón), se transfieren 12 mL del cultivo de células concentradas a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio LS modificado completo. A partir de este momento (tiempo 0) se toman alícuotas de 500 μL cada hora por 16 horas para la determinación del índice mitótico.

4.4. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 por Privación de Sacarosa

Protocolo adaptado de Riou-Khamlichi y colaboradores (2000). La sincronización se inicia con 100 mL cultivo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se transfiere un cultivo de 7 días de crecido a un tamiz de acero estéril con tamaño de malla de 20 μm en una unidad de filtrado de 47 mm de diámetro. Las células colectadas en la malla se lavan con 500 mL de medio LS modificado incompleto (sin sacarosa, vitaminas y 2,4-D), y se transfieren con una espátula estéril a 100 mL de medio LS modificado sin sacarosa; se incuban durante un día bajo las condiciones de cultivo estandarizadas.

Para liberar a las células del arresto, 50 mL del cultivo se transfiere a un tamiz de acero estéril (tamaño de malla de 20 μm , unidad de filtrado de 47 mm de diámetro), las células colectadas se regresan al medio original; este paso se realiza con el fin de concentrar las células del cultivo. Utilizando una pipeta de 10 mL (abertura de boca 2 mm, con filtro de silicón), se transfieren 12 mL del cultivo de células concentradas a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio LS modificado completo. A partir de este momento (tiempo 0) se toman alícuotas de 500 μL cada hora por 16 horas para la determinación del índice mitótico.

4.5. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 por Privación de Sacarosa e Incubación con Sorbitol

Adaptado de Riou-Khamlichi *et al.*, (2000) y Menges and Murray (2002, 2004). La sincronización inicia con 100 mL cultivo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se transfiere un cultivo de 7 días de crecido a un tamiz de acero estéril con tamaño de malla

de 20 μm en una unidad de filtrado de 47 mm de diámetro. Las células colectadas en la malla se lavan con 500 mL de medio LS modificado incompleto (sin sacarosa, vitaminas y 2,4-D) y se transfieren con una espátula estéril a 100 mL de medio LS modificado sin sacarosa y con sorbitol (0.5 M). El sorbitol, un azúcar no metabolizable, mantiene la presión osmótica del medio con la ventaja que es menos cristalizable (Blackhall *et al.*, 1994). Se incuba el cultivo durante un día bajo las condiciones de cultivo estandarizadas.

Para liberar a las células del arresto, el cultivo se transfiere a un tamiz de acero estéril (tamaño de malla de 20 μm , unidad de filtrado de 47 mm de diámetro), las células colectadas se lavan con 500 mL de medio LS modificado incompleto (sin vitaminas y 2,4-D) y se transfieren a 50 mL de medio LS modificado. Utilizando una pipeta de 10 mL (abertura de boca 2 mm, con filtro de silicón), se transfieren 12 mL del cultivo de células lavadas y concentradas a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio LS modificado completo. A partir de este momento (tiempo 0) se toman alícuotas de 500 μL cada hora por 16 horas para la determinación del índice mitótico.

4.6. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Hidroxiurea

El método de sincronización utilizado es el reportado por Eriksson (1972) y Reichheld *et al.* (1995). Para iniciar la sincronización, se transfiere con una pipeta estéril (10 mL de volumen, abertura de boca 2mm) 12 mL de un cultivo de tabaco NT-1 de 7 días de crecido a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio LS modificado e hidroxiurea a diferentes concentraciones (60, 30, 5, 2, 1, 0.75 o 0.5 mM). El cultivo se incuba por 24 horas bajo las condiciones de cultivo estandarizadas.

Para liberar a las células del bloqueo con hidroxiurea el cultivo se lava con 1 L de medio LS modificado incompleto (sin vitaminas ni auxina), utilizando un tamiz de naylon estéril con tamaño de malla de 20 μm en una unidad de filtrado de 47 mm de diámetro. El contenido del matraz con HU se vierte sobre el tamiz, permitiendo a la solución drenar a un contenedor en la parte inferior. Las células colectadas en la malla se lavan lentamente con medio LS incompleto, agitando constantemente con un asa estéril. Después de lavadas, las células se resuspenden en 100 mL de medio LS completo. A partir de este momento (tiempo 0) se toman alícuotas de 500 μL cada hora por 16 horas para la determinación del índice mitótico.

Solución de Hidroxiurea

La hidroxiurea se disuelve en agua tridestilada y se esteriliza con filtro (tamaño de malla $0.22 \mu\text{M}$). La solución se prepara inmediatamente antes de usar, no se recomienda su almacenamiento.

4.7. Colecta, Fijación y Tinción de las Células

Las muestras se colectan con puntas de 1 mL recortadas a ~ 0.5 cm de la punta para no destruir las estructuras celulares. Las células colectadas se dejan sedimentar en hielo durante 15 – 20 min., se retira el sobrenadante y se resuspenden en un volumen igual al colectado de solución fijadora de paraformaldehído – glutaraldehído (Preece, 1980). Las células se almacenan en solución fijadora al menos 12 horas a 4°C . La solución fijadora preserva selectivamente la organización morfológica y el contenido químico de la célula en división (Singh, 2002).

El índice mitótico se determina con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) el cual se prepara como una solución stock 10 mg mL^{-1} en agua y se usa a una concentración final de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. A las células se les retira el sobrenadante (solución fijadora), se les añade 0.5 mL de 1 mL PBS 1X : $1 \mu\text{L}$ stock de DAPI y se incuban por un mínimo de 6 horas a 4°C . El índice mitótico se determina por microscopía de epifluorescencia (Microscopio Leica IM50) como el número de células en mitosis dividido por el número total de células contadas (400 células por punto de muestreo) por 100 (Singh, 2002).

Fijador de Paraformaldehído – Glutaraldehído

Se calientan 25 mL de buffer de fosfatos salinos 1X (PBS) pH 7.4 a 60 o 70°C y se añaden lentamente 2 g de paraformaldehído (4% w/v), se agita constantemente hasta que se disuelva. Se deja enfriar y se añaden 3 mL de glutaraldehído acuoso al 50%. La solución se afora a 50 mL con PBS 1X pH 7.4 y se almacena a 4°C (Preece, 1980).

Buffer de Fosfatos Salinos (PBS)

El PBS 10X se prepara disolviendo en un litro de agua 80 g de NaCl (1.37 M), 2 g de KCl (26.83 mM), 14.4 g de Na_2HPO_4 (101.44 mM) y 2.4 g de KH_2PO_4 (17.64 mM). El pH se ajusta con HCl al 50% (v/v), se esteriliza en autoclave por 20 minutos y se almacena a 4°C .

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Afidicolina

Se realizó una sincronización utilizando la técnica reportada por Nagata et al., (1992) para células de la línea de tabaco BY-2. Aunque las líneas celulares TBY-2 y NT-1 deben ser genéticamente iguales (Nagata y Kumagai, 1999), se observan diferencias en los resultados utilizando la misma técnica de sincronización. Las células NT-1 alcanzan un pico mitótico de aproximadamente el 30% 9 horas después de liberadas del arresto con afidicolina (Figura 5.1), lo que contrasta con el 80% de MI registrado de 6 a 7 horas después de la liberación en células BY-2 (Nagata *et al.*, 1992; Samuels *et al.*, 1998; Nagata and Kumagai, 1999). Cabe resaltar que aunque se ha trabajado con la línea celular TBY-2 en nuestro laboratorio, los resultados obtenidos de 45% de MI de 7 a 8 horas después de la liberación (Llanderal, 2003) difieren considerablemente del 80 – 95% de MI reportado por Nagata *et al.* (1992, 1999, 2004). Hasta donde se sabe, la línea NT-1 no ha sido utilizada en experimentos de sincronización, simplemente se ha subcultivado durante más de 20 años sin asegurarse de mantener una elevada velocidad de crecimiento. Por lo tanto, es probable que debido a este mantenimiento subóptimo las células NT-1 muestren una velocidad de crecimiento menor a las células BY-2, completando su ciclo celular en 16 horas en comparación con el ciclo celular de 13 – 14 horas de las células TBY-2. Es importante resaltar que no hay antecedentes documentados acerca de la duración del ciclo celular de las células NT-1.

En las primeras 5 horas después de la liberación del arresto (Figura 5.1) se observa que el arresto no es absoluto, persisten algunas células en división, lo que sugiere que una parte de la población es menos sensible a la concentración de 16 μM de afidicolina utilizada. Aunque la sincronía no es perfecta, representa aproximadamente un enriquecimiento de 10 veces la cantidad de células en mitosis en comparación con el control asincrónicas (Figura 5.1.). Este nivel de sincronía probablemente se deba a las diferencias en la morfología de las células, siendo preferentemente afectadas las células aisladas en lugar de las que forman racimos o cadenas (Álvarez et al., 1994). Una vez más, se atribuye esta diferencia fenotípica entre las líneas celulares NT-1 y TBY-2 a las diferencias en su cultivo y mantenimiento.

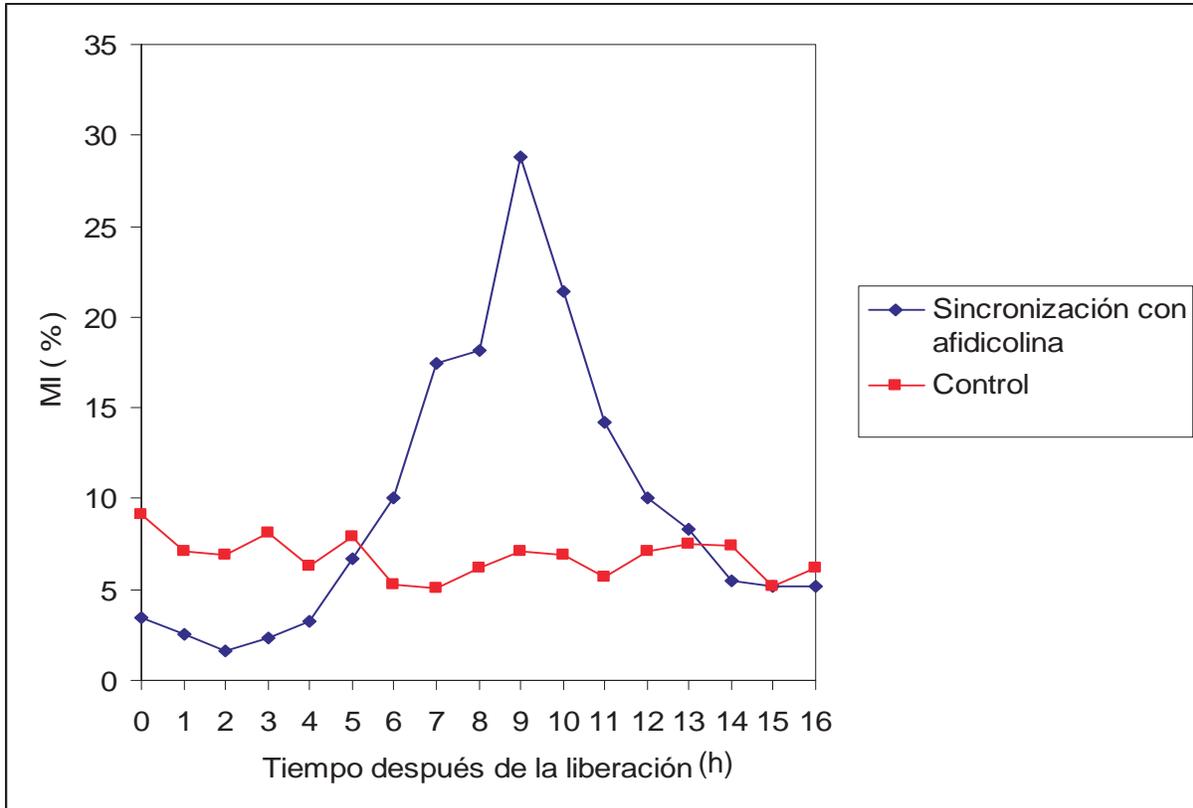


Figura 5.1. Sincronización de células NT-1 con afidicolina.

La cinética de la figura 5.1 se usa para comparar con los experimentos de sincronización sin auxina, sacarosa o con adición de hidroxurea. En experimentos similares realizados en el laboratorio con las células NT-1 el índice mitótico varió de 16 a 22% (Méndez, 2006). Esto podría deberse a la procedencia de la afidicolina, ya que de acuerdo con Samuels *et al.*, (1998) ésta es una fuente de variación en este tipo de experimentos. Además, una vez reconstituida la afidicolina en DMSO su vida media de anaquel a -20°C es de aproximadamente 6 semanas, después de los cuales su eficiencia disminuye. Debido a la variabilidad inherente de esta técnica y a los elevados costos de la afidicolina, este procedimiento es poco adecuado para sincronizar la línea celular NT-1.

5.2. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Privación de Auxina

Auxinas y citocininas se añaden a los cultivos celulares vegetales para mantener la actividad mitótica. En las células TBY-2 se ha demostrado la presencia de hormonas endógenas como ácido indol-3-acético (IAA), 16 citocininas y ácido abscísico. La concentración de IAA endógena es de 50 nmol por kg de peso húmedo en las células y de 0.5 nmol por litro en el medio. Estos valores de IAA no permiten actividad mitótica, por

lo que es necesario añadir auxina al medio de cultivo (Redig *et al.*, 1996). En el caso de las células de tabaco BY-2 y NT-1 se añade 0.2 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), una auxina sintética.

Como se muestra en la figura 5.2., si el 2,4-D es eliminado del medio de cultivo, la división de las células NT-1 se detiene completamente. De acuerdo con varios autores (Ishida *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994; Tena and Renaudin, 1998), la reincorporación de 2,4-D al medio después de 72 horas induce una semisincronía en la división de células TBV-2. En el caso de las células NT-1 después 16 horas de reincorporada la auxina se observa un arresto total (Figura 5.2), aunque el cultivo celular eventualmente se recuperó, por lo que este arresto fue transitorio. Una posibilidad de este comportamiento podría deberse a que, al ser una línea celular de crecimiento más lento que las TBV-2, le toma más tiempo de la duración de un ciclo celular en reasumir la división. Dicha interpretación se corrobora con el hecho de que en células de tabaco BY-2 se ha demostrado que la concentración de 2,4-D utilizada rutinariamente para su mantenimiento, resulta subóptima cuando las células están muy diluidas (Renaudin, 2004). Como puede observarse en la figura 5.2. las células NT-1 no reanudan su división durante las 16 horas de registro, a diferencia de lo que esta reportado para las TBV-2 (Ishida *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994; Tena and Renaudin, 1998). Por otro lado, frecuentemente se observa una sincronía mitótica diferente entre las células agrupadas en racimos y en cadenas (Renaudin, 2004); puesto que las células NT-1 tienen patrones de agrupación diferentes a las TBV-2, es probable que esto también afecte el comportamiento de división celular al eliminar la auxina.

Los resultados mostrados anteriormente también sugieren una menor sensibilidad de la línea NT-1 al 2,4-D con respecto a la línea celular original, ya que aunque las células no reanudan la división celular durante el periodo correspondiente a un ciclo de división, el cultivo después de 8 días se recuperó. Es frecuente observar variaciones heredables estables en los requerimientos de hormonas en los cultivos celulares vegetales. Estos cambios se presentan cuando los cultivos son mantenidos con diferentes concentraciones de hormonas (Meins, 1989). En los reportes donde se utiliza la línea celular NT-1 no se documenta una concentración de auxina diferente a la utilizada en las células BY-2 ($0.9 \times 10^{-7} \text{ M}$) (An, 1985; An, 1986; Allen *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 2001; Hellwig *et al.*, 2004;). Por lo tanto, si en realidad las células NT-1 son menos sensibles a la concentración de auxina de $0.9 \mu\text{M}$, esta diferencia se debe a otras características del medio de cultivo que no es la concentración de auxina.

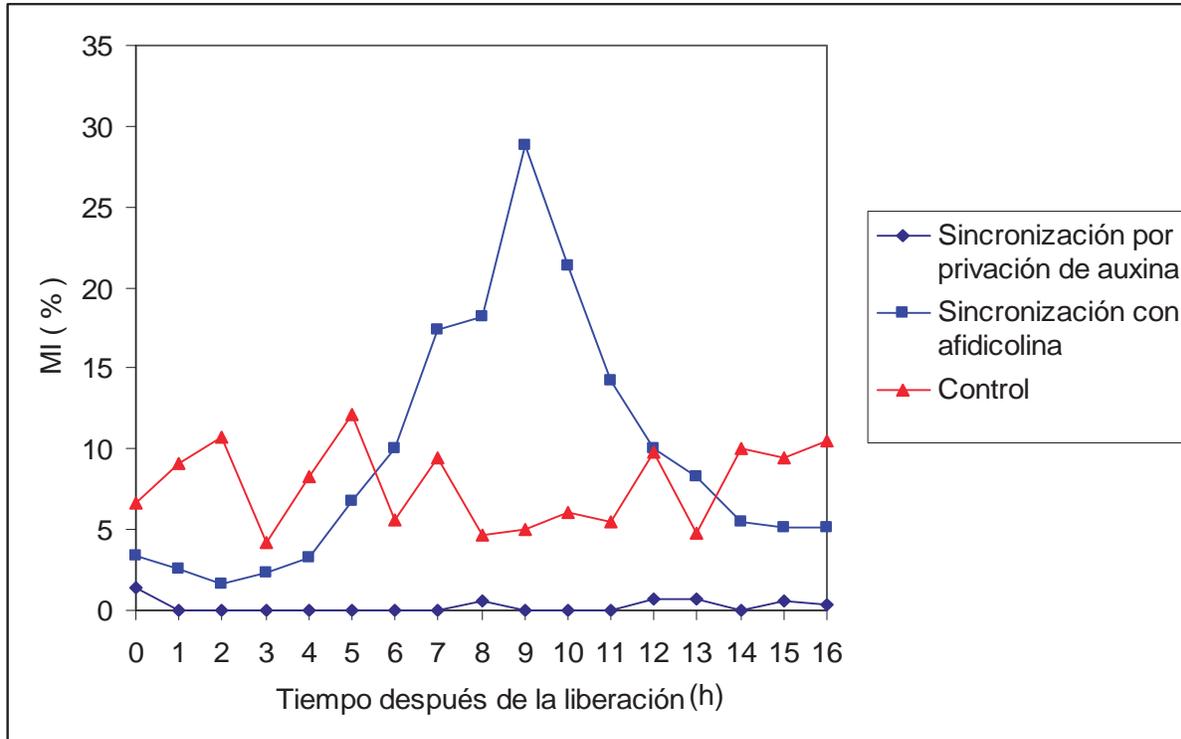


Figura 5.2. Sincronización de células NT-1 por privación de auxina.

5.3. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Privación de Sacarosa

Debido a que los cultivos celulares de tabaco NT-1 no son fotosintéticos es necesario añadir una fuente de carbono, en este caso sacarosa. Al ser la sacarosa la única fuente de carbono disponible, al eliminarla del medio de cultivo es de esperarse un cierto grado de sincronía. Como se observa en la figura 5.3 las células de tabaco NT-1 privadas de sacarosa efectivamente son arrestadas (tiempo 0 a 3), pero no exhiben ningún nivel de sincronía en su división (tiempo 4 en adelante). El tiempo transcurrido entre la liberación del arresto y los primeros indicios de división activa es tan corto (tiempo 9), que es improbable que las células se encuentren en G_0 . En cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* privados de sacarosa el pico mitótico se observa 18, 19 y 24 horas después de la liberación, lo que sugiere que las células son arrestadas en G_0 . (Menges and Murray, 2002; Phathirana and Eason, 2006) Si consideramos las diferencias en los tamaños de las células en el cultivo, los resultados parecen indicar que las células más pequeñas, con menores requerimientos de carbono, reingresan al ciclo celular más rápido que las más grandes.

En *Arabidopsis* se han identificado diez secuencias para ciclinas tipo D (Meijer and Murray, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). En cultivos en suspensión de

Arabidopsis thaliana *CycD3;1* y *CycD2;1* se inducen por la presencia de sacarosa en el medio (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). En las líneas celulares de *Arabidopsis thaliana* MM1 y MM2d sincronizadas por privación de sacarosa el arresto se registra en G₀/G₁, la adición de sacarosa promueve la expresión de los genes *CycD3;1* y *CycD2;1* (Menges and Murray, 2002). Un análisis global de la expresión de los genes de ciclo celular en células MM2d sincronizadas por privación de sacarosa, reveló que los genes *CycD* muestran una gran diversidad en sus patrones de expresión; *CycD5;1* y *CycD3;3* se acumulan en la fase G₁ temprana y disminuyen marcadamente conforme las células avanzan hacia la fase S; *CycD4;1*, *CycD4;2* y *CycD3;1* se acumulan en la fase tardía de G₁ y muestran un pico en la transición G₁/S (Menges *et al.*, 2005). En células de *Nicotiana tabacum* no hay reportes de la expresión de genes a través del ciclo celular al privar el cultivo de sacarosa. Al ser una especie anfiploide, potencialmente tiene un gran número de genes relacionados con funciones redundantes, entre ellos los de *CycD* (Sekine and Shinmyo, 2004). Por lo tanto, si los genes de ciclinas tipo D son los responsables del reingreso de las células privadas de sacarosa al ciclo celular, probablemente las células de tabaco NT-1 posean genes *CycD* que responden más rápido a la presencia de sacarosa, o que incluso no la necesitan para su expresión, por lo que después de añadir sacarosa al cultivo las células progresan asincrónicamente a través del ciclo celular.

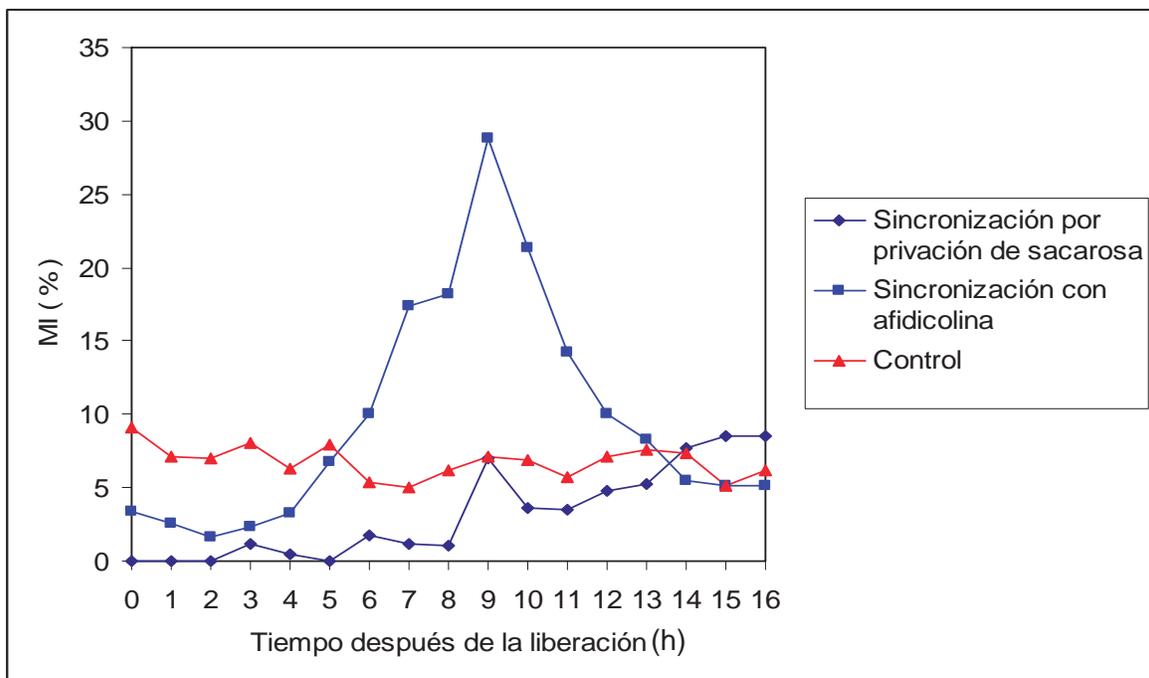


Figura 5.3. Sincronización de células NT-1 por privación de sacarosa.

Comúnmente se utilizan azúcares no metabolizables, como sorbitol o manitol, en cultivos celulares vegetales en suspensión para incrementar su viabilidad al ser sometidos a situaciones de estrés (Blackhall *et al.*, 1994; Singh, 2002; Veilleux *et al.*, 2005). Cultivos en suspensión de tabaco BY-2 criopreservados con sorbitol como osmorregulador, al ser recuperados no muestran efectos adversos en experimentos de sincronización (Menges and Murray, 2004). Al privar células de tabaco NT-1 de sacarosa en presencia de sorbitol (Figura 5.4), las células no muestran signos de arresto o sincronía. Al comparar las primeras horas (tiempo 1 a 2) de las figuras 5.3 y 5.4 se observa cómo en presencia de sorbitol las células tienen actividad mitótica. Esto sugiere que el bloqueo observado en la fig. 5.3 se debe a una disminución en la viabilidad de un sector de la población, una parte sensible a los cambios en la presión osmótica.

Debido a que no se obtuvieron resultados de sincronización satisfactorios por los métodos indirectos evaluados, se probaron metodologías por métodos directos alternativas al uso de afidicolina.

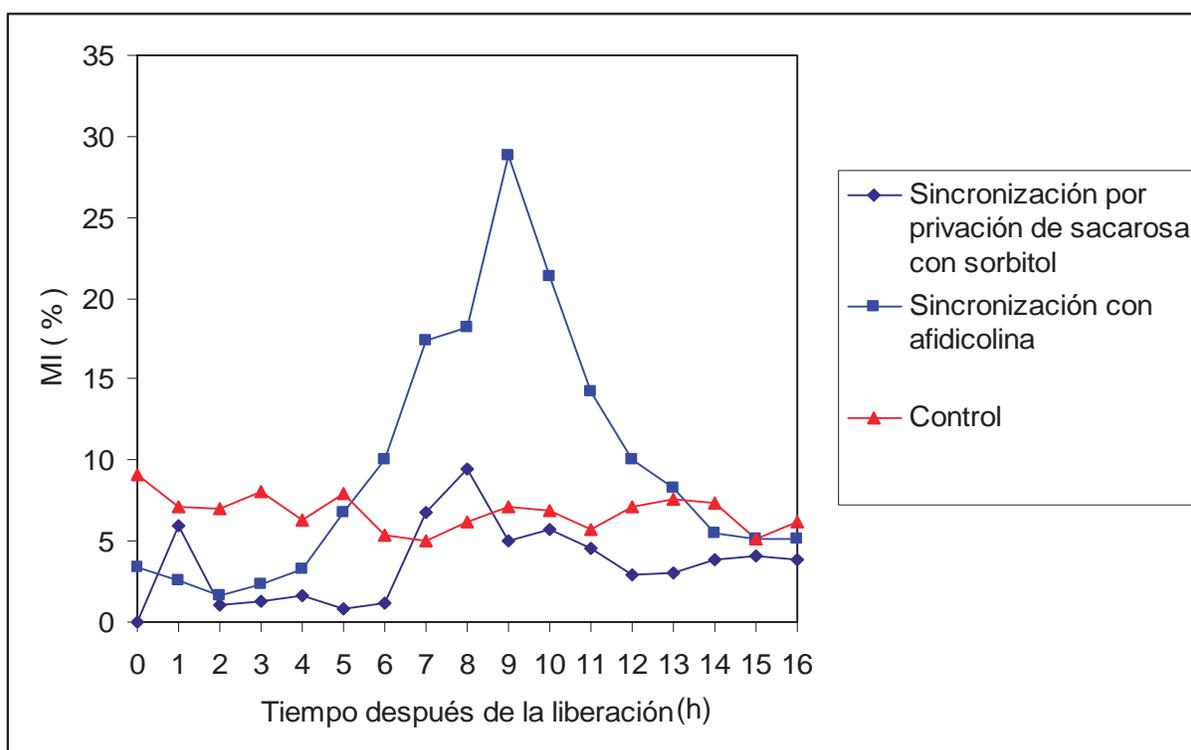


Figura 5.4. Sincronización de células NT-1 por privación de sacarosa con sorbitol.

5.4. Sincronización de Células de Tabaco NT-1 con Hidroxiurea

La hidroxiurea es un reactivo más económico que la afidicolina, que ha sido ampliamente utilizado en experimentos de sincronización de cultivos celulares vegetales (Tabla 1.7). Utilizando una concentración de hidroxiurea de 5, 30 o 60 mM (Figura 5.5) las células NT-1 permanecieron arrestadas. Con la concentración de 60 mM se perdió el cultivo, éste es el único caso en todos los experimentos realizados que el cultivo no se logró recuperar. En la figura 5.5 a 30 mM de HU se observa cierta actividad mitótica durante las primeras horas. A una concentración de 5 mM el cultivo permanece arrestado, aunque se aprecia una actividad mitótica aumentada durante las horas 3 a 5 del registro. Estos resultados contrastan con los reportes para las células TBY-2 (Reichheld *et al.*, 1995), donde encuentran que la concentración de HU óptima va de 30 o 60 mM. Al comparar las diferentes concentraciones de HU utilizadas en otros cultivos (Tabla 1.7) se aprecia como en la mayoría de los casos, con excepción de las células TBY-2, el intervalo de concentración se encuentra entre 2.5 y 10 mM. Por lo tanto, se evaluaron concentraciones menores de HU para sincronizar cultivos de células NT-1.

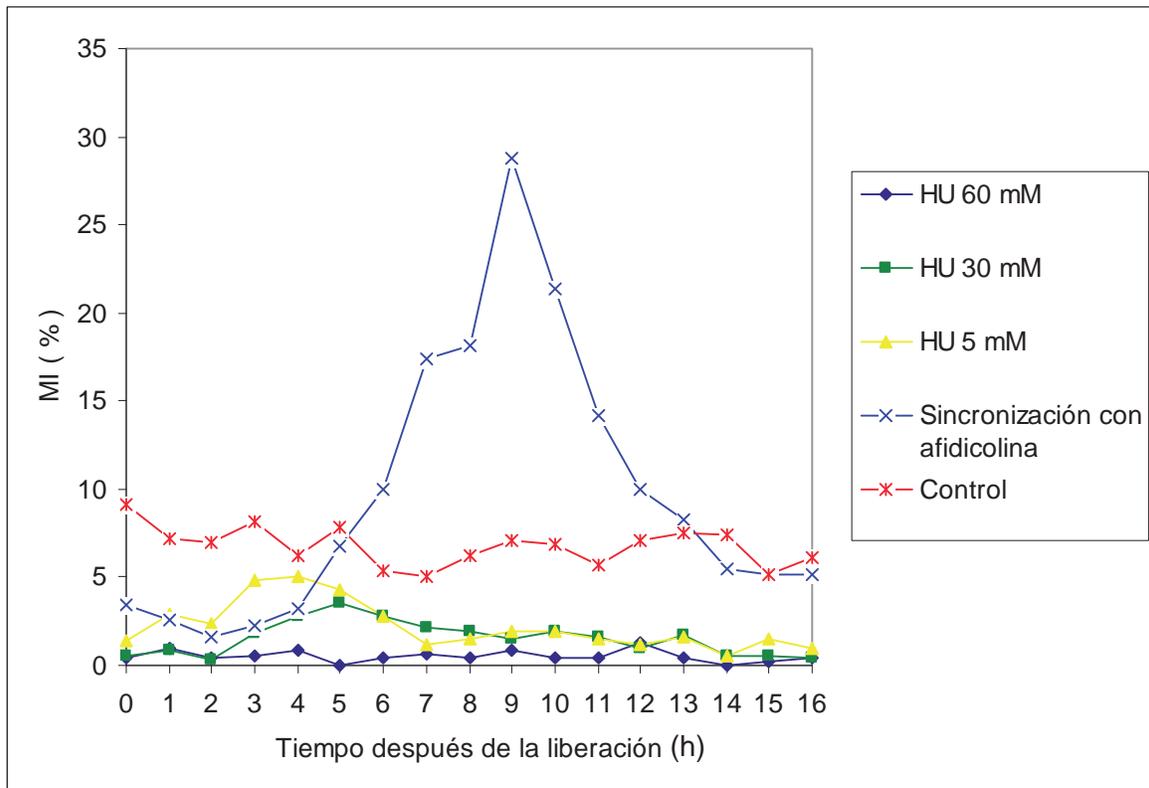


Figura 5.5. Sincronización de células NT-1 con 60, 30 y 5 mM de hidroxiurea

En la figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos con concentraciones de 1 y 0.5 mM de HU inoculados con cultivos diferentes. Las concentraciones de 1 y 0.5 mM resultaron adecuadas para experimentos de sincronización, observándose picos mitóticos de 22 y 15% durante las horas 12 y 9, respectivamente. Es importante notar que con una concentración 30 veces menor que la reportada en células TBY-2, hayamos obtenido resultados favorables en la sincronización de las células NT-1.

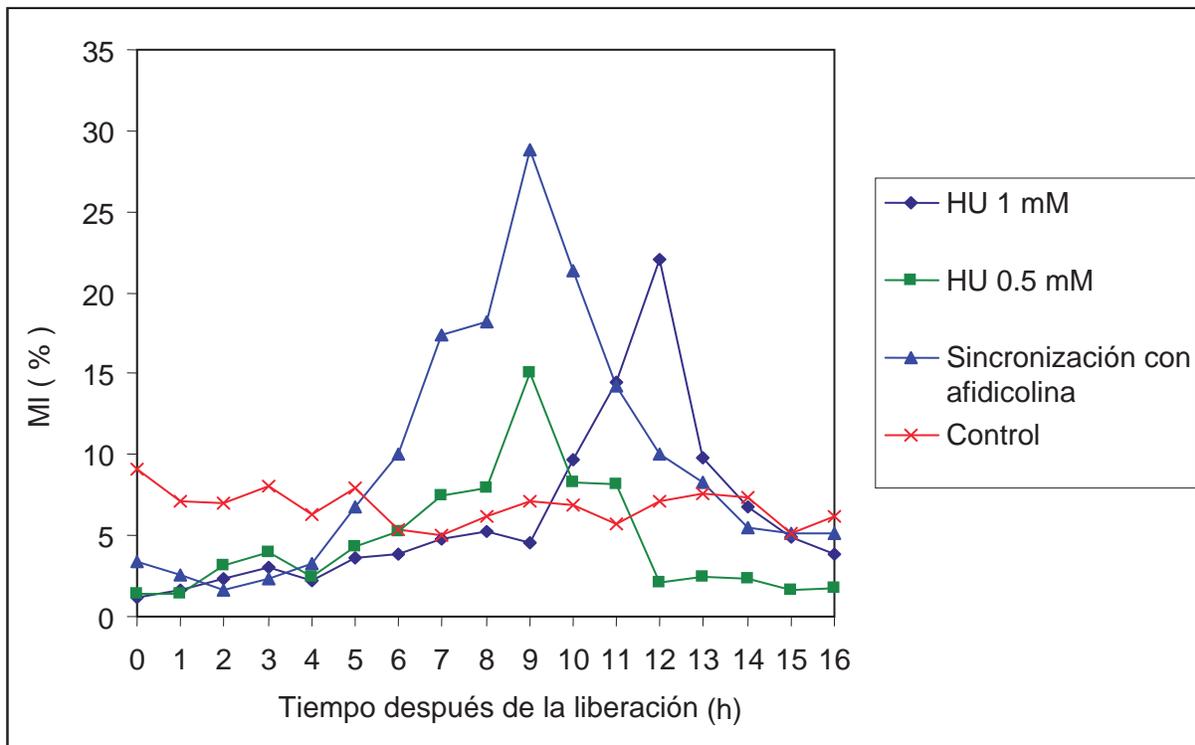


Figura 5.6. Sincronización de células NT-1 con 1 y 0.5 mM de hidroxIUrea.

Para determinar si las diferencias en los resultados de sincronización entre las concentraciones de HU se debían a que se inocularon con cultivos distintos, se decidió evaluar el efecto de 0.5, 0.75, 1, 2 y 5 mM de HU partiendo del mismo cultivo inicial. Los resultados se muestran en la figura 5.7. Con la concentración de 5 mM de HU permanece arrestado el cultivo durante las horas de registro. Aunque con 2 mM se aprecia un pico mitótico durante la hora 12, éste no es claro debido a que la división celular se reanuda de forma desfasada (tiempo 13 a 16). Con las concentraciones de 1, 0.75 y 0.5 mM se obtienen picos mitóticos de 25, 30 y 15% durante las horas 12, 11 y 9, respectivamente; éstos resultados corroboran los obtenidos antes (Figura 5.6) partiendo de distintos cultivos. La reproducibilidad de los experimentos se verificó por triplicado (Figura 5.8,

panel A – C). El protocolo de sincronización con HU es óptimo a 0.75 mM, con un pico mitótico de aproximadamente 30% durante la hora 11 (fig. 5.8, panel C).

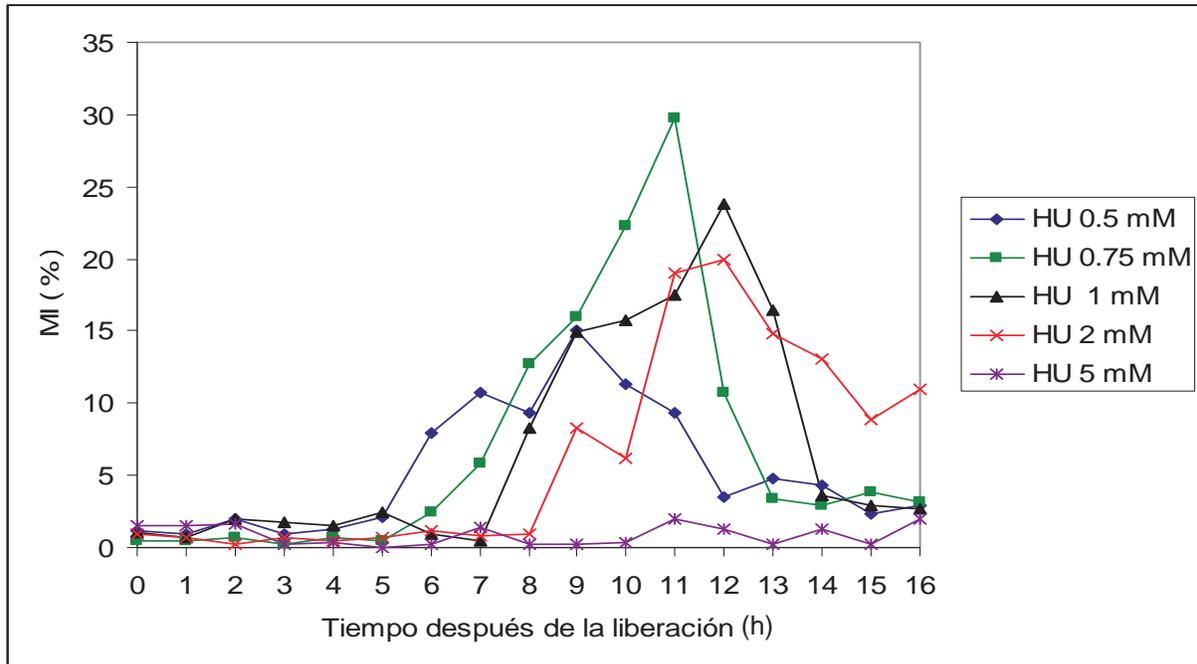


Figura 5.7. Sincronización de células NT-1 con de hidroxiiurea a distintas concentraciones partiendo del mismo cultivo inicial.

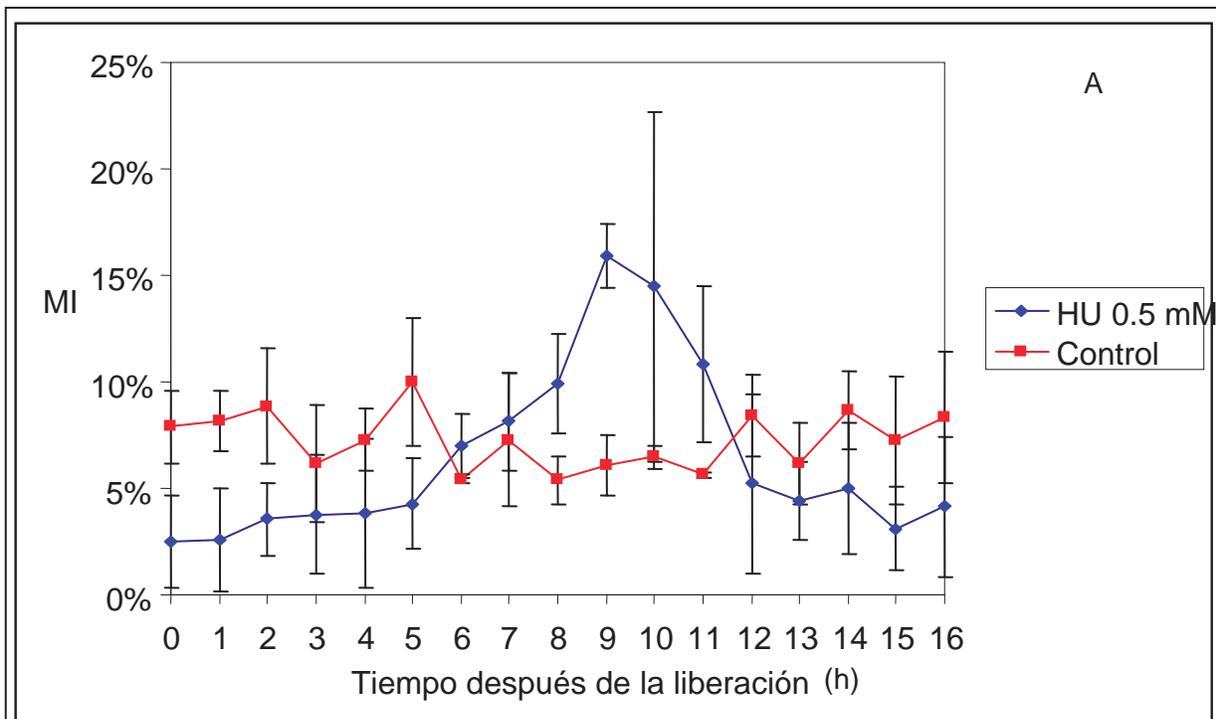


Figura 5.8. Sincronización de células NT-1 ($n = 3$) con 0.5 (A), 1.0 (B) y 0.75 (C) mM de HU.

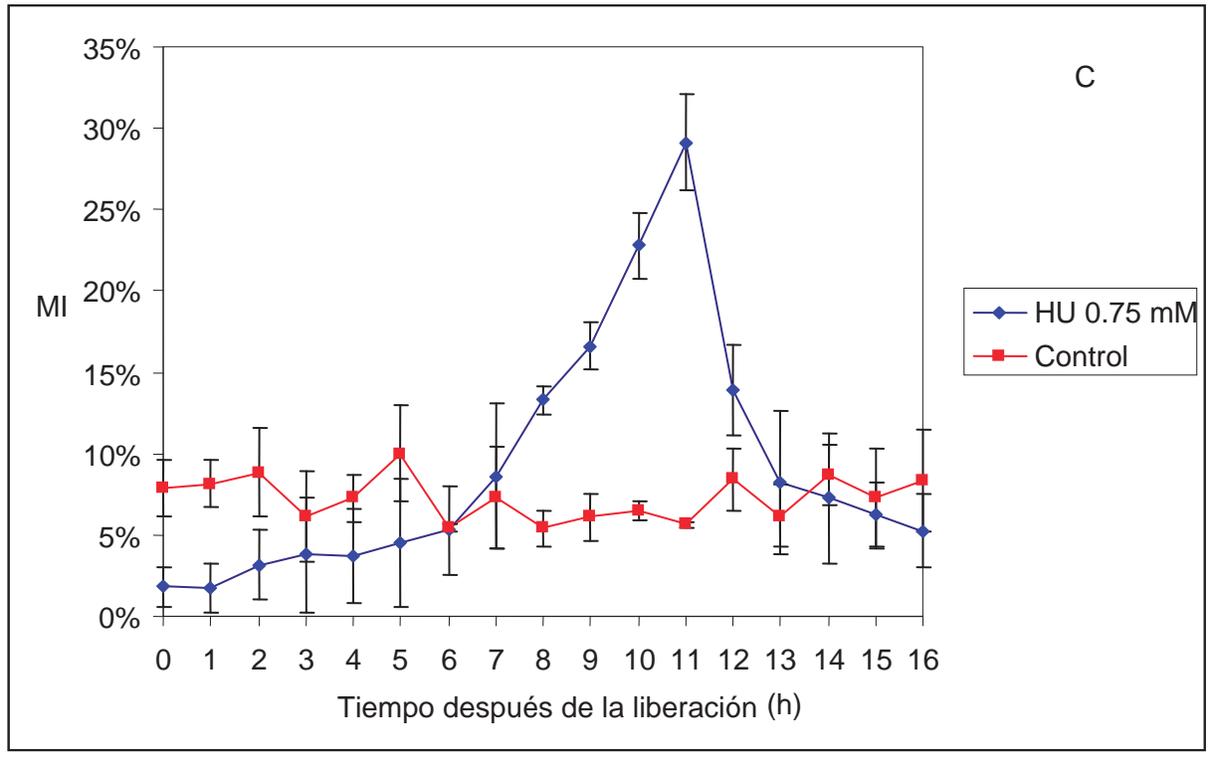
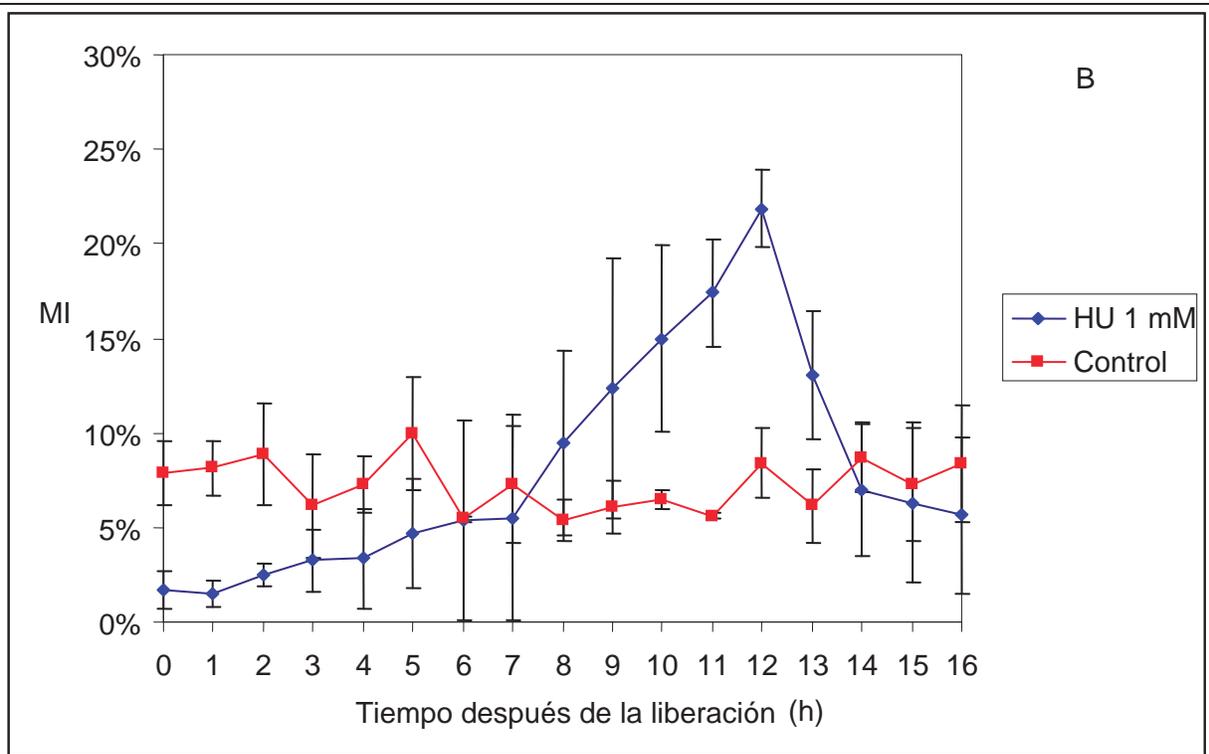


Figura 5.8. Sincronización de células NT-1 ($n = 3$) con 0.5 (A), 1.0 (B) y 0.75 (C) mM de HU.

Al comparar las curvas de sincronización con A ϕ (16 μ M) y HU (0.75 mM) se observa un intervalo de aproximadamente 3 horas en los picos mitóticos (Figura 5.8, panel B). Esto se debe a que el bloqueo con A ϕ se revierte inmediatamente, debido a que la acción de la afidicolina se efectúa sobre la DNA polimerasa α , la cual se encuentra disponible y activa para continuar con la replicación del DNA. Por el contrario, la HU bloquea la actividad de la RNR, por lo que al liberar a las células de éste inhibidor primero se tienen que sintetizar los dNTPs para que estén disponibles para la DNA polimerasa α . Otra característica interesante es el desfase de 1 hora en el pico mitótico entre las concentraciones de HU de 1, 0.75 y 0.5 mM. En experimentos similares con HU en cultivos de *Haplopappus gracilis* se observa un pico mitótico durante la hora 12 a concentraciones de 1, 3 y 10 mM (Eriksson, 1972). Las diferencias entre las horas y porcentaje en el pico mitótico a diferentes concentraciones de HU probablemente se deban a la heterogeneidad del cultivo. Así, lo que se registra en los diferentes experimentos sea la susceptibilidad de distintas subpoblaciones de células.

Al hacer un análisis de varianza (ANOVA) con un procedimiento de Tukey para encontrar una diferencia significativa entre las medias de los picos mitóticos, sólo se encontraron diferencias significativas para el pico mitótico (Figura 5.8, tiempo 11) con 0.75 mM de HU, con una diferencia significativa de $p = 0.05$ y $p = 0.01$ (Tablas 5.1 y 5.2 respectivamente). Con los otros tratamientos, 0.5 mM y 1.0 mM, al realizar el mismo análisis estadístico no se observan diferencias significativas en el índice mitótico entre el tiempo con el pico mitótico y los puntos de muestreo que le anteceden y preceden. Como se muestra en la tabla 5.3, al comparar el tiempo 11 del tratamiento con 0.75 mM de HU con el mismo tiempo de los tratamientos con 0.5 y 1.0 mM también se observan diferencias significativas. Por lo tanto, de acuerdo al objetivo de la prueba de Tukey se puede considerar que el tratamiento con 0.75 mM efectivamente permite observar diferencias significativas en el índice mitótico en el pico mitótico. Es interesante resaltar que en ninguna de las referencias consultadas se reportan repeticiones o análisis estadísticos de algún tipo.

Tabla 5.1

Prueba de Tukey HSD para los tiempos 9, 10, 11 y 12 del tratamiento con 0.75 mM de HU, n = 3, p = 0.05, MS = 5.7.				
Tiempo después de la liberación	9	10	11	12
9				
10	0.052181			
11	0.001095	0.047204		
12	0.541237	0.008152	0.000425	

Tabla 5.2

Prueba de Tukey HSD para los tiempos 9, 10, 11 y 12 del tratamiento con 0.75 mM de HU, n = 3, p = 0.01, MS = 5.7.				
Tiempo después de la liberación	9	10	11	12
9				
10	0.052185			
11	0.001095	0.047204		
12	0.541237	0.008152	0.000425	

Tabla 5.3

Prueba de Tukey HSD para los tiempos 11 con los distintos tratamientos de HU (mM), p = 0.05				
Tiempo después de la liberación	Control	0.5	0.75	1.0
Control				
0.5	0.174888			
0.75	0.000242	0.000373		
1.0	0.003689	0.075755	0.003771	

La variación se define como diferencias fenotípicas estables y heredables (Meins, 1983, 1989). Aunque las células TBY-2 y NT-1 tienen el mismo fondo genético (Nagata *et al.*, 1999), son claras las diferencias fenotípicas en los experimentos de sincronización. En cultivos en suspensión las células exhiben cambios metabólicos y morfológicos significativos en respuesta a cambios en el medio extracelular (Meins 1983, 1989; Singh, 1985). Entre los parámetros que pueden afectar el fenotipo celular se encuentran las concentraciones de azúcares, vitaminas, minerales, hormonas, densidad celular, contenido de gases solubilizables (carbonato, etileno, etc.). Además, pequeños cambios

en las condiciones ambientales como temperatura, luz, agitación, volumen del cultivo vs. volumen del matraz, permeabilidad de los gases, pH del medio, protocolo de esterilización, etc. tienen efectos impredecibles en el crecimiento y fisiología de las células (Renaudin, 2004). Las células NT-1 se han subcultivado más de 25 años en condiciones subóptimas en comparación con las células TBY-2 (Nagata *et al.*, 1992, 1999). El término subóptimo se emplea para describir condiciones de cultivo diferentes a las establecidas para las células TBY-2, las cuales modifican la velocidad de crecimiento de las células NT-1. Entre las diferencias documentadas en el mantenimiento de las células NT-1 se encuentran pH de 5.6 – 5.7 (Robledo-Paz *et al.*, 2006), concentración de KH_2PO_4 de 2.57 mM (Allen *et al.*, 1993, 1996), temperatura de 27° C (Persson *et al.*, 2001), agitación de 110 a 150 r.p.m. (Allen *et al.*, 1993; Persson *et al.*, 2001; Robledo-Paz *et al.*, 2006) y fotoperiodo de 16 horas de luz ($15 \mu\text{E}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Álvarez *et al.*, 1994). La diversidad en las condiciones de mantenimiento de la línea celular NT-1 probablemente originó una enorme variabilidad en las células del cultivo, ya sea como resultado de la selección de mutaciones genéticas, cambios epigenéticos o una combinación de procesos (Meins, 1983). Esto explica las diferencias no solo entre las células TBY-2 y NT-1, sino las diferencias observadas entre las mismas células NT-1 (Figura 5.7 – 10).

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo de sincronización para la línea celular de tabaco (*Nicotiana tabacum*) NT-1 con afidicolina (16 μ M) e hidroxiurea (0.75 mM), el cual puede utilizarse para estudiar a eIF3f a través del ciclo celular.
2. El método de sincronización con hidroxiurea resultó económico y reproducible.

BIBLIOGRAFÍA

- Akashi, T., Izumi, K., Nagano, M., Enomoto, E., Mizuno, K., and H. Shibaoka. 1988. "Effects of propizamide on tobacco cell microtubules *in vivo* and *in vitro*". *Plant Cell Physiol.* 29: 1053 – 1062.
- Allen, G. C., Hall, G. E., Childs, L. C., Weissinger, A. K., Spiker, S., and W. F. Thompson. 1993. "Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells" *Plant Cell.* 5: 603 – 613.
- Allen, G. C., Hall, G. E., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A. K., and W. F. Thompson. 1996. "High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco". *Plant Cell.* 8: 889 – 913.
- Álvarez, R. C., Nissen, S. J., and S. G. Ernst. 1994. "Selection, enrichment and initial characterization of an elongated cell culture of tobacco". *Plant Sci.* 103: 73 – 79.
- An, G. 1985. "High efficiency transformation of cultured tobacco cells". *Plant Physiol.* 79: 568 – 570.
- An, G. 1986. "Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells". *Plant Physiol.* 81: 86 – 91.
- Aravind, L., and C. P. Ponting. 1998. "Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation". *Protein Sci.* 7: 1250 – 1254.
- Asano, K., Vornlocher, H-P., Richter-Cook, N. J., Merrick, W. C., Hinnebusch, A. G., and J. W. B. Hershey. 1997. "Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits". *J. Biol. Chem.* 43: 27042 – 27052.
- Attwooll, C., Denchi, E. L., and K. Helin. 2004. "The E2F family: specific functions and overlapping interests". *EMBO J.* 23: 4709 – 4716.
- Blackhall, N. W., Davey, M. R., and J. B. Power. 1994. "Isolation, culture, and regeneration of protoplasts". Dixon, R. A., and R. A. Gonzales (Eds.). *Plant Cell Culture*. In: The practical approach series, vol. 145 (eds. Rickwood, D., and B. D. Hames). Oxford University Press. Second edition. U. K. 230: 27 – 39.
- Beemster, G. T. S., Mironov, V., and D. Inzé. 2005. "Turning the cell-cycle engine for improved plant performance". *Curr. Opin. Biotech.* 16: 142 – 146.

- Blilou, I., Frugier, F., Folmer, S., Serralbo, O., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., Eloy, N. B., Ferreira, P. C. G., Weisbeek, P., and B. Scheres. "The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation" *Genes Dev.* 16: 2566 – 2575.
- Bongyo, M., Gaczynska, M., and H. L. Ploegh. 1997. "Proteasome inhibitors and antigen presentation". *Biopoly.* 43: 269 – 280.
- Boniotti, M. B., and C. Gutierrez. 2001. "A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDK/cyclin D complex". *Plant J.* 28: 341 – 350.
- Browning, K.S. 2004. "Plant translation initiation factors: it is not easy to be green". *Biochem. Soc. Trans.* 32: 589 – 591.
- Buchanan, B . B., Gruissem, W., and R. L. Jones. 2000. "Biochemistry & Molecular Biology of Plants". *American Society of Plant Physiologists*. U.S.A. 1367: 528 – 565.
- Burks, E. A., Bezerra, P. P., Le, H., Gallie, D. R., and K. S. Browning. 2000. "Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit". *J. Biol. Chem.* 276: 2122 – 2131.
- Caponetti, J. D., Gray, D. J., and R. N. Trigiano. 2005. "History of plant tissue and cell culture". Trigiano, R. N. and D. J. Gray (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. U.S.A. 358: 213 – 224.
- Capron, A., Ökrész, L., and P. Genschik. 2003. "First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin – protein ligase". *Trends Plant Sci.* 8: 83 – 89.
- Chabouté, M-E., Combettes, B., Clément, B., Gigot, C., and G. Philipps. 1998. "Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells". *Plant. Mol. Biol.* 38: 797 – 806.
- Chaubet – Giot, N. 2000. "Plant A-type cyclins". *Plant Mol. Biol.* 43: 659 – 690.
- Chen, J., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R., and A. M. Jones. 2001. "ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis". *Genes Dev.* 15: 902 – 911.
- Coba de la Peña, T., and S. Brown. 2001. "Flow cytometry". Hawes, Ch., and B. Satiét-Jeunemaitre (Eds.). *Plant cell biology*. In: *The practical approach series*, vol. 250. Oxford University Press. Second edition. U. K. 338: 85 – 106.

- Conia, J., Alexander, R. G., Wilder, M. E., Richards, K. R. Rice, M. E., and J. Jackson. 1990. "Reversible accumulation of plant suspension cell cultures in G₁ phase and subsequent synchronous traverse of the cell cycle". *Plant Physiol.* 94: 1568 – 1574.
- Conia, J., Bergounioux, C., Perennes, C., Muller, P., Brown, S., and P. Gadad. 1987. "Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia hybrida* protoplasts". *Cytometry.* 8: 500 – 508.
- Cullis, C. A. 2004. "Plant genomics and proteomics". Wiley-Liss, Inc. U.S.A. 1 – 22.
- Dashek, W. V., and M. Harrison (Eds.). 2006. "Plant Cell Biology". Science Publishers. U.S.A. 487: 197 – 226.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T. S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and D. Inzé. 2001. "Functional analysis of cyclin-dependent kinases inhibitors of *Arabidopsis*". *Plant Cell.* 13: 1653 – 1667.
- De Veylder, L., Joubès, J., and D. Inzé. 2003. "Plant cell cycle transitions". *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6: 536 – 543.
- del Pozo, J. C., Boniotti, M. B., and C. Gutierrez. 2002. "Arabidopsis E2F_c functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF^{AtSKP2} pathway in response to light". *Plant Cell.* 14: 3057 – 3071.
- del Pozo, J. C., López –Matas, M. A., Ramirez – Parra, E., and C. Gutierrez. 2005. "Hormonal control of the plant cell cycle". *Physiol. Plant.* 123: 173 – 178.
- Dewitte, W., and J. A. H. Murray. 2003. "The plant cell cycle". *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 235 – 264.
- Durfee, T., Feiler, H. S., and W. Grissem. 2000. "Retinoblastome – related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts?" *Plant. Mol. Biol.* 43: 635 – 642.
- Eriksson, T. R. 1972. "Growth and cell division of cultured cells and protoplasts". Terui, G. (Ed.). Fermentation technology today. Proc. IV IFS. Osaka, Japan. 890: 673 – 676.
- Farias, E. A. 2002. "Estudios *in vitro* acerca de la función molecular de la proteína caf1". Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Fiorani, F., and G. T. S. Beemster. 2006. "Quantitative analysis of cell division in plants". *Plant. Mol. Biol.* 60: 936 – 979.
- Fontecave, M. 1998. "Ribonucleotide reductase and radical reactions". *Cell Mol. Life Sci.* 54: 684 – 695.

- Franklin, C. I., and R. A. Dixon. 1994. "Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures". Dixon, R. A., and R. A. Gonzales (Eds.). *Plant Cell Culture*. In: The practical approach series, vol. 145 (eds. Rickwood, D., and B. D. Hames). Oxford University Press. Second edition. U. K. 230: 1 – 25.
- Furest, R., Soni, R., Murray, J.H.A., and K. Lyndsey. 1996. "Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*". *Plant Physiol.* 112: 1023 – 1033.
- Gallie, D. R., Le, H., Tanguay, R. L., and K. S. Browning. 1998. "Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock". *Plant J.* 14: 715 – 722.
- Geelen, D. N. V., and D. G. Inzé. 2001. "A bright future for the bright yellow-2 cell culture". *Plant Physiol.* 127: 1375 – 1379.
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., and J. Fleck. 1998. "Cell cycle-dependent proteolysis in plants: identification of destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132". *Plant Cell.* 10: 2063 – 2075.
- Glab, N., Labidi, B., Qin, L-X., Trehin, C., Bergounioux, C., and L. Meijer. 1994. "Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinase activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions". *FEBS Lett.* 353: 207 – 211.
- Godoy-Hernández, G., and F. Vázquez-Flota. 2006. "Growth measurements". Loyola-Vargas, V. M., and F. Vázquez-Flota (Eds.). *Plant Cell Culture Protocols*. In: Methods in Molecular Biology, vol. 318 (ed. Walker, J. M.). Humana Press Inc. Second edition. U.S.A. 393: 51 – 58.
- Gutierrez, C. 2005. "Coupling cell proliferation and development in plants". *Nat. Cell Biol.* 7: 535 – 541.
- Guzmán, Y. 2005. "Análisis de la región reguladora del gen psif humano". Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., and R. Fischer. 2004. "Plant cell cultures for production of recombinant proteins". *Nat. Biotechnol.* 22: 1415 – 1422.
- Higareda, A. E., Farias, E. A., Llanderal, J., Méndez, A., and M. A. Pardo. 2003. "A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G₂/M transition". *Miami Nat. Biot. Short Rep.* 14, 111.

- Hofmann, K., and P. Bucher. 1998. "The PCI domain: a common theme in the multiprotein complexes". *Trends Biochem. Sci.* 23: 204 – 205.
- Hou, Ch-L., Tang, Ch. C., Roffler, S. R., and T. K. Tang. 2000. "Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translational apparatus". *Blood.* 96: 747 – 753.
- Ichikawa, T., and K. Syōno. 1991. "Tobacco Genetic Tumors". *Plant Cell Physiol.* 32: 1123 – 1128.
- Inzé, D. 2003. "Why should we study the plant cell cycle". *J. Exp. Bot.* 54: 1125 – 1126.
- Inzé, D. 2005. "Green light for the cell cycle". *EMBO J.* 24: 657 – 662.
- Ishida, S., Takahashi, Y., and T. Nagata. 1993. "Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein beta subunit-like protein from tobacco BY-2 cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11152 – 11156.
- Ito, M. 2000. "Factors controlling cyclin B expression". *Plant Mol. Biol.* 43: 677 – 690.
- Ito, M. 2004. "Transcriptional regulation during the plant cell cycle: involvement of Myb proteins in cyclin B transcription". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347: 24 – 36.
- Ito, M., Kodama, H. and A., Komamine. 1991. "Identification of a novel S-phase-specific gene during the cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant J.* 1: 141 – 148.
- John, P. C. L., Sek, F. J., and M. G. Lee. 1989. "A homolog of the cell cycle control protein p34cdc2 participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa". *Plant Cell.* 1: 1185 – 1193.
- Joubès, J., and C. Chevalier. 2000. "Endoreduplication in higher plants". *Plant Mol. Biol.* 43: 753 – 745.
- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle –Bars, E., Inzé, D., Umeda, M., and J. Renaudin. 2000. "CDK – related protein kinases in plants". *Plant Mol. Biol.* 43: 603 – 620.
- Jürgens, G. 2005. "Cytokinesis in higher plants". *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 281 – 299.
- Kapros, T., Bögre, L., Németh, K., Bakó, L., Györgyey, J., Wu, S. Ch., and D. Dudits. 1992. "Differential expression of histone H3 gene variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa". *Plant Physiol.* 98: 621 – 625.

- Karp, G. 2005. “Biología celular y molecular: conceptos y experimentos”. McGraw-Hill – Interamericana. Cuarta edición. México, D. F. 899: 621 – 670.
- Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M., and E. Tamaki. 1972. “Liquid suspension culture of tobacco cells”. Terui, G. (Ed.). Fermentation technology today. Proc. IV IFS. Osaka, Japan. 890: 689 – 695.
- Kim, T-H., Kim, B-H., Yahalom, A., Chamovitz, D. A., and A. G. von Amim. 2004. “Translational regulation via 5´m RNA leader sequences revealed by mutational analysis of the *Arabidopsis* translation initiation factor subunit eIF3h”. *Plant Cell*. 16: 3341 – 3356.
- Kodama, H., Ito, M., and A. Komamine. 1994. “Studies of the plant cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells”. *Plant Cell Physiol*. 35: 592 – 537.
- Landrieu, I., da Costa, M., and L. De Veylder. 2004. “A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*”. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101: 13380 – 13385.
- Lewin, B. 2004. “Genes VIII”. Pearson Prentice-Hall. Eighth edition. 1027: 387 – 492.
- Li., C., Potuschak, T., Colón-Carmona, A., Gutiérrez, R. A., and P. Doerner. 2005. “Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways”. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 36: 12978 – 12938.
- Linsmaier, E. M., and F. Skoog. 1964. “Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures”. *Physiol Plant*. 18: 100 – 127.
- Llenderal, J. 2003. “Estudios in vivo sobre la función de la proteína psif en la división celular de *Nicotiana tabacum*”. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., y J. Darnell. 2005. “Biología Celular y Molecular”. Editorial Médica Panamericana. Quinta edición. 973.
- Loyola-Vargas, V. M., and F. Vázquez-Flota. 2006. “An Introduction to Plant Cell Culture”. Loyola-Vargas, V. M., and F. Vázquez-Flota (Eds.). Plant Cell Culture Protocols. In: Methods in Molecular Biology, vol. 318 (ed. Walker, J. M.). Humana Press Inc. Second edition. U.S.A. 393: 3 – 8.
- Magyar, Z., Bakó, L., Böger, L., Dedeoğlu, D., Kapros, T., and D. Dudits. 1993. “Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells”. *Plant J*. 4: 151 – 161.

- Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deán, M., Fehér, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bakó, L., Koncz, C., and D. Dudits. 1997. "Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells". *Plant Cell*. 9: 223 – 235.
- Maines, F. 1983. "Heritable variation in plant cell culture". *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 327 – 346.
- Maines, F. 1989. "Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones". *Annu. Rev. Genet.* 23: 395 – 408.
- Matsuoka, K., Demura, T., Galis, I., Horiguchi, T., Sasaki, M., Tashiro, G., and H. Fukuda. 2004. "A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells". *Plant Cell Physiol.* 45: 1280 – 1289.
- May, M. J., and C. J. Leaver. 1993. "Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures". *Plant Physiol.* 103: 621 – 627.
- Meijer, M., and J. A. H. Murray. 2000. "The role of D-Type cyclins in the plant cell cycle". *Plant Mol. Biol.* 43: 621 – 633.
- Méndez-Bravo, A. 2006. "Análisis de la región reguladora del gen psif de *Arabidopsis thaliana*". Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Menges, M., and J. H. A. Murray. 2002. "Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity". *Plant J.* 30: 203 – 212.
- Menges, M., and J. H. A. Murray. 2004. "Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures". *Plant J.* 37: 635 – 644.
- Menges, M., de Jager, S. M., Gruissem, W., and J. H. A. Murray. 2005. "Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control". *Plant J.* 41: 546 – 566.
- Merrick, W. C. 2003. "Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes". *Biochemistry and Molecular Biology Education.* 31: 378 – 385.
- Meshi, T., Taoka, K-I., and M. Iwabuchi. 2000. "Regulation of histone gene expression during the cell cycle". *Plant. Mol. Biol.* 43: 643 – 654.

- Mészáros, T., Miskolczi, P., Ayuydin, F., Pettkó – Szandtner, A., Peres, A., Magyar, Z., Horváth, G. V., Baké, L., Fehér, A., and D. Dudits. 2000. “Multiple cyclin – dependent kinasa complexes and phosphatases control G₂/M progression in alfalfa cells”. *Plant Mol. Biol.* 43: 595 – 605.
- Mironov, V., Veylder, L. D., Von Montagu, M., and D. Inzé. 1999. “Cyclin – dependent kinases and cell division in plants – the nexus”. *Plant Cell.* 11: 509 – 522.
- Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H., and K. Shinozaki. 1994. “Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells”. *Plant J.* 5: 111 – 122.
- Morejohn, L. C., Bureau, T. E., Molè-Bajer, and D. E. Fosket. 1987. “Orizalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro”. *Planta.* 172: 252 – 264.
- Morejohn, L. C., Bureau, T. E., Tocchi, L. P., and D. E. Fosket. 1984. “Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially”. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 1440 – 1444.
- Morgan, D. O. 1997. “Cyclin – dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors”. *Annu. Rev. Cell Div. Biol.* 13: 261 – 291.
- Morgan, D. O. 2007. “The cell cycle: principles and control”. New Science Press Ltd, Sinauer Associates, Inc., Publishers and Oxford University Press. U.K. 297: 2 – 54, 111 – 137.
- Mosca, P. J., Dijkwel, P. A., and J. L. Hamlin. 1992. “The plant amino acid mimosine may inhibit initiation at origins of replication in chinese hamster cells”. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4375 – 4383.
- Murray, A. W. 2004. “Recycling the cell cycle: cyclins revisited”. *Cell.* 116: 221 – 234.
- Nacry, P., Mayer, U., and G. Jürgens. 2000. “Genetic dissection of cytokinesis”. *Plant Mol. Biol.* 43: 719 – 733.
- Nag, R., Maity, M. K., Seal, A., Hazra, A., and M. DasGupta. 2006. “Protein turnover in response to transient exposure to exogenous auxin is necessary for restoring auxin autotrophy in a stressed *Arachis hypogea* cell culture”. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 17 – 26.

- Nagata, T. 2004. "When I encountered tobacco BY-2 cells!". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347: 1 – 5.
- Nagata, T., and F. Kumagai. 1999. "Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line". *Meth. Cell Sci.* 21: 123 – 127.
- Nagata, T., Nemoto, Y., and S. Hasezawa. 1992. "Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cells in the cell biology of higher plants". *Int. Rev. Cytol.* 132: 1 – 30.
- Nagata, T., Sakamoto, K., and T. Shimizu. 2004. "Tobacco BY-2 cells: the present and beyond". *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 40: 163 – 166.
- Nishida, T., Ohnishi, N., Kodama, H., and A. Komamine. 1992. "Establishment of synchrony by starvation and readdition of auxin in suspension cultures of *Catharanthus roseus* cells". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28: 37 – 43.
- Oguro, M., Suzuki-Hori, Ch., Pagano, H., Mano, Y., and S. Ikegami. 1979. "The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase α ". *Eur. J. Biochem.* 97: 603 – 607.
- Parmentier, Y., Criqui, M. C., Potuschak, T., and P. Genschik. 2004. "Expression, localization and stability of mitotic cyclins in tobacco BY-2 cells". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347: 52 – 65.
- Pathirana, R., and J. R. Eason. 2006. "Establishment and characterization of a rapidly dividing diploid cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* suitable for cell cycle synchronization". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85: 125 – 136.
- Perennes, C., Qin, L-X., Glab, N., and C. Bergounioux. 1993. "Petunia p34^{cdc2} protein kinase activity in G₂/M cells obtained with a reversible cell cycle inhibitor, mimosine". *FEBS Lett.* 333: 141 – 145.
- Persson, S., Wyatt, S. E., Love, J., Thompson, W. F., Robertson, D., and W. F. Boss. 2001. "The Ca²⁺ status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants". *Plant Physiol.* 126: 1092 – 1104.
- Pestova, T. V., and C. U. T. Hellen. 2000. "The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis". *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57: 651 – 674.

- Pestova, T. V., and V. G. Kolupaeva. 2002. "The role of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection". *Genes Dev.* 16: 2906 – 2922.
- Planchais, S., Glab, N., Inzé, D., and C. Bergounioux. 2000. "Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies". *FEBS Lett.* 476: 78 – 83.
- Planchais, S., Glab, N., Tréhin, Ch., Perennes, C., Bureau, J-M., Meijer, L., and C. Bergounioux. 1997. "Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G₂/M transition in tobacco BY-2 cell suspension". *Plant J.* 12: 191 – 202.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J-P., Segers, G., De Veylder, L., Barrôco, R., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., and V. Mironov. 2001. "A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G₂/M progression in plants". *J. Biol. Chem.* 276: 36354-36360.
- Preece, H. T. 1980. "Histologic technicians". Little, Brown and Company. Third edition. U. S. A. 428: 105 – 140.
- Preiss, T., and M. W. Hentze. 2003. "Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation". *Bioess.* 25: 1201 – 1211.
- Ramirez-Parra, E., Fründt, C., and C. Gutierrez. 2003. "A genome wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*". *Plant J.* 33: 801 – 811.
- Ramirez-Parra, E., López-Matas, M. A., Fründt, C., and C. Gutierrez. 2004. "Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation". *Plant Cell.* 16: 2350 – 2363.
- Redig, P., Shaul, O., Inzé, D., Van Montagu, M., and H. Van Onckelen. 1996. "Levels endogenous cytokinines, indole-3-acetic and acid abscisic during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells". *FEBS Lett.* 39: 175 – 180.
- Reichheld, J-P., Gigot, C., and N. Chaubet-Gigot. 1998. "Multilevel regulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells". *Nucleic Acids Res.* 26: 3255 – 3262.
- Reichheld, J-P., Sonobe, S., Clément, B., Chaubet, N., and C. Gigot. 1995. "Cell cycle-regulated histone gene expression in synchronized plant cells" *Plant J.* 7: 245 – 252.

- Renaudin, J-P. 2004. "Growth and physiology of suspension-cultured plant cells: the contribution of tobacco BY-2 cells to the study of auxin action". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347: 160 – 180.
- Renaudin, J-P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., and J. A. H. Murray. 1996. "Plant cyclines: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclines based on sequence organization". *Plant Mol. Biol.* 32: 1003 – 1018.
- Richard, C., Lescot, M., Inzé, D., and L. De Veylder. 2002. "Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 167 – 176.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. S., and J. A. H. Murray. 2000. "Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression". *Mol. Cell Biol.* 13: 4513 – 4521.
- Robledo-Paz, A., Vázquez-Sánchez, M. N., Adame-Álvarez, R. M., and A. E. Jofre-Garfias. 2006. "Callus and suspension culture induction, maintenance and characterization". Loyola-Vargas, V. M., and F. Vázquez-Flota (Eds.). Plant Cell Culture Protocols. In: Methods in Molecular Biology, vol. 318 (ed. Walker, J. M.). Humana Press Inc. Second edition. U.S.A. 393: 59 – 86.
- Roef, L., and H. Van Onckelen. 2004. "Hormonal control of the plant cell cycle". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347: 133 – 148.
- Rossi, V., and S. Varotto. 2002. "Insights into the G1/S transition in plants". *Planta.* 215: 345 – 356.
- Sabelli, P. A., Dante, R. A., Leiva-Neto, J. T., Jung, R., Gordon-Kamm, W. J. and B. A. Larkins. 2005. "RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 13005 – 13012.
- Samuels, A. L., Meehl, J., Lipe, M., and L. A. Staehelin. 1998. "Optimizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization". *Protopl.* 202: 232 – 236.

- Sano, T., Shimizu, T., Sakamoto, K., and T. Nagata. 2004. "Block points in the cell cycle progression of plant cells: deduced lessons from tobacco BY-2 cells". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347:149 – 159.
- Sauge-Merle, S., Laulhère, J-P., Covès, J., le Pape, L., Ménages, S., and M. Fontecave. 1997. "Ribonucleotide reductase from the higher plant *Arabidopsis thaliana*: expression of the R2 component and characterization of its iron-radical center". *JBIC*. 2: 586 – 594.
- Schnittger, A., Schöbinger, U., Stierhof, Y. D., and M. Hülskamp. 2002. "Ectopic B-type cyclin expression includes mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis trichomes*". *Curr. Biol*. 12: 415 – 420.
- Sekine, M., and A. Shinmyo. 2004. "Control of the G1/S phase transition in tobacco BY-2 cells". Nagata, T., Hasezawa, S., and D. Inzé (Eds.). Tobacco BY-2 cells. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 53 (ed. by Nagata, T. Lörz, H., and J. M. Widholm). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag. 347: 37 – 65.
- Sharma, A. K. 1999. "Synchronization in plant cells – an introduction". *Meth. Cell Sci*. 21: 73 – 78.
- Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., and D. Inzé. 1996. "Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells". *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93: 4868 – 4872.
- Singh, N. K., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., and R. A. Bressan. 1985. "Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl". *Plant Physiol*. 79: 126 – 137.
- Singh, R. J. 2002. "Plant cytogenetics". CRC. Second edition. U.S.A. 463: 7 – 57, 277 – 326.
- Sorrell, D. A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C., and J. A. H. Murray. 1999. "Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells". *Plant Physiol*. 199: 343 – 351.
- Sorrell, D. A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J. R., Rogers, H. J., and D. Francis. 2002. "A *WEE1* homologue from *Arabidopsis thaliana*". *Planta*: 215: 518 – 522.
- Stals, H., Casteels, P. Van Montagu, M., and D. Inzé. 2000. "Regulation of cyclin – dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Mol. Biol*. 43: 583 – 593.

- Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. "Plant Physiology". Sinauer Associates, Inc. Fourth edition. U.S.A. 764: 467 – 507.
- Teakle, G. R., Scutt, C. P., and P. M. Gilmartin. 2002. "Transcript analysis". Gilmartin, P. M., and C. Bowler (Eds.). Molecular plant biology, vol. 2. In: The practical approach series, vol. 258. Oxford University Press. U. K. 332: 3 – 40.
- Tena, G., and J-P. Renaudin. 1998. "Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells". *Plant J.* 102: 271 – 279.
- Tréhin, Ch., Glab, N., Perennes, C., Planchais, S., and C. Bergounioux. 1999. "M phase-specific activation of the *Nicotiana sylvestris cyclin B1* promoter involves multiple regulatory elements" *Plant J.* 17: 263 – 273.
- Tréhin, Ch., Planchais, S., Glab, N., Perennes, C., Treger, J., and C. Bergounioux. 1998. "Cell cycle regulation by plant growth regulators: involvement of auxin and cytokinin in the re-entry of *Petunia* protoplasts into the cell cycle". *Planta.* 206: 215 – 224.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Vaylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., and D. Inzé. 2002. "Genome – wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*". *Plant Cell.* 14: 903 – 916.
- Veilleux, R. E., Compton, M. E., and J. A. Saunders. 2005. "Use of protoplast for plant improvement". Trigiano, R. N. and D. J. Gray (Eds.). Plant Development and Biotechnology. CRC Press. U.S.A. 358: 213 – 224.
- Verkest, A., Weini, C., Inzé, D., De Veylder, L., and A. Schnittger. 2005. "Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control". *Plant Physiol.* 139: 1099 – 1106.
- Veselý, J., Havlíček, L., Sornad, M., Blow, J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D. S., Kato, J-Y., Detivaud, L., LeClerc, S., and L. Meijer. 1994. "Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues". *FEBS J.* 224: 771 – 786.
- Voet, D., y J. G. Voet. 2006. "Bioquímica". Editorial Medica Panamericana. Tercera edición. Colombia. 1756: 1403 – 1415, 1552 – 1561.
- Wang, Ch., and Z. Liu. 2006. "*Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development". *Plant Cell.* 18: 350 – 365.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., dePamphilis, C. W., and H. Ma. 2004. "Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins". *Plant Physiol.* 135: 1084 – 1099.

- Watkins, S. J., and C. J. Norbury. 2004. "Cell cycle-related variations in subcellular localization of eIF3e/INT6 in human fibroblasts". *Cell Prolif.* 37: 149 – 160.
- Yahalom, A., Kim, T-H., von Amim, A. G., and D. A. Chamovitz. 2005. "Precise regulation of the dosage of eIF3e is a prerequisite for normal development in *Arabidopsis*". The 5th symposium on post-transcriptional regulation of plant gene expression". 88: 34.
- Zhou, C., Arslan, F., Wee, S., Krishnan, S., Ivanov, A. R., Oliva, A., Leatherwood, J., and D. A. Wolf. 2005. "PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes". *BMC Biology.* 3: 14.