

Aceleración y frenado de la proliferación celular*

CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA
*Académica Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

RESUMEN

Las células de plantas poseen análogos estructurales y funcionales de los complejos CDK-ciclina de levaduras y animales que permiten iniciar o avanzar la proliferación celular. Las células vegetales presentan además versiones específicas de CDKs y ciclinas sin homología con las del hombre, tales como las implicadas en citocinesis, un proceso que difiere en ambos reinos. Finalmente, las plantas no sólo poseen homólogos de la CAK humana (CDKDs) que activan otras CDKs por fosforilación de una treonina situada en su lazo T, sino también otra segunda CAK (CDKF1) y un grupo de ciclinas, las P, que son homólogas de las existentes en levaduras. Ello apoya una historia de endosimbiosis ocasional entre levaduras y la célula precursora de plantas, con transmisión horizontal de genes. Las plantas también conservan los mecanismos de frenado por rutas de chequeo que retrasan la activación de CDKs, generalmente al evitar la defosforilación de la treonina14 y la tirosina 15 mediante inhibición de la fosfatasa Cdc25 o sus homólogos funcionales, cuando las condiciones de la propia célula son inadecuadas para afrontar sin riesgos una transición irreversible entre fases consecutivas del ciclo.

Palabras clave: Quinasas dependientes de ciclinas.—Ciclinas.—Transmisión de señales antimitogénicas.—Rutas de chequeo.

* Revisión realizada con motivo de la Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el 20 de enero de 2005.

ABSTRACT**Acceleration and brake of cell proliferation**

Plants possess the structural and functional homologs of the yeast and human CDK-cyclin complexes, apart from some specific ones as those that participate in cytokinesis, a process that differs essentially in plant and animal cells. Apart from the human CAK homologue that activates CDKs by phosphorylating the threonine residue in the T-loop, plant cells have an additional CAK (CDKGF1) and a whole group of cyclins, the P ones, that are orthologues of the yeast ones. This unveils an occasional endosymbiotic process with a horizontal gene transfer between yeast and plant genomes. Plant cells also possess the braking mechanisms that prevent CDK activation to face an irreversible transition between subsequent cycle phases when the cell is not completely ready for it. Such mechanisms mostly prevent CDK activation by inhibiting dephosphorylation of the CDK threonine14-tyrosine15 residues brought about by the Cdc25 phosphatase plant homolog.

Key Words: Cyclin-dependent kinases.—Cyclins.—Antimitogenic signal transduction.—Checkpoints.

EXTENSIVE ABSTRACT

Most cyclin-dependent kinases and cyclins found in plant cells are structural and functional homologs of those found in human cells. However, other components of the cycle machinery are plant specific, as the plant B1-type CDKs that co-localize with the microtubular assemblies responsible for the division of cytoplasm, i.e. the preprophase band of microtubules and the phragmoplast.

In relation to the general principle of CDK activation by phosphorylation of the T160 residue mediated by the CAKs (*CDK-activating kinases*), plant cells have the peculiarity of possessing, in addition to the CDK type D catalytic subunits of CAKs homologue to those in man, an alternative CDK type F subunit and a whole group of cyclins (the P ones) that are homologues to those in yeast. They may result from horizontal transmission of genes from yeast to plant cells by occasional endosymbiosis, one of the recently postulated motors of evolution.

Plant cells possess as many CDKs and more cyclins than do mammalian cells. Cyclins integrate the transcriptional control into the proliferative cycle. This is because of their synthesis in precise times of the cycle. In the case of the mitotic cyclins, this is supported by the presence of a Myb-like element in their promoters that is shared by other mitotic proteins. Additionally, cyclins are labile because they are targeted to proteolysis by the proteasome by the binding of poly-ubiquitin tails shortly after their synthesis. Our group has shown that the B2;2 cyclin is one positive rate-limiting regulator of late interphase progression, with a role in the induction of mitotic chromosomal condensation similar to that played by the A-cyclin in mammals. Their proteolysis coincides with the entry into the irreversible portion of prophase in both plant and animal cells.

Superimposed to the CDK-induced activation of cycle progression, plant cells also possess a series of checkpoint controls that ensures safe irreversible transitions. They depend on sensor molecules and specific kinases working early in checkpoint signal transduction such as the ATM/ATR ones. By the way, the lack of the ATM kinase induces the ataxia-telangiectasia in humans, a cancer-prone condition. This kinase is also present in plants. The checkpoint response is followed by a signal transduction chain that is completed by the effector kinases CHK1 and CHK2 that may prevent the activation of the CDK.

The major checkpoints recognised in plants are the following: 1) one that controls the transition from quiescence to proliferation, under the so-called retinoblastoma (RB) pathway 2) the one controlling the onset of replication (G1 to S transition), 3 and 4) two intra-S checkpoints (at the start of elongation of the newly synthesized DNA chains from both early and late replicating origins, respectively), 5) the G2 checkpoint controlling entry into mitosis, and 6) the spindle checkpoint that regulates the metaphase to anaphase transition.

The physiology of checkpoints in plant cells has shown, first, that checkpoint signal transduction mechanisms are dispensable at the first cycles after the stimulation of cell proliferation in previously dormant tissues. At each checkpoint, multiple cellular conditions are checked to give rise to a single mitogenic or antimitogenic output. The content in positive rate-limiting molecules as plant cyclin B2;2 is also computed by checkpoints. Moreover, there are redundant checkpoint routes for each single irreversible transition between cycle phases. As a consequence of these properties, checkpoints can be spontaneously overridden without accomplishment of the specific requirement that activated them. Though this is known as adaptation, it is actually an undue override of checkpoints without fulfilment of a crucial requirement. Such checkpoint override results in the appearance of genome instability that initiates an experiment in microevolution.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la biosfera depende, en última instancia, de la capacidad proliferativa, multiplicadora, de las células de los organismos que la forman. La proliferación celular no sólo permite el crecimiento en número de células de todos los seres vivos a partir del cigoto, sino también la renovación de las células viejas o dañadas presentes en los tejidos de individuos adultos. El ciclo es sólo un modelo que esquematiza los procesos que tienen lugar en las células durante su proliferación.

La replicación del ADN y su reparto entre las dos células que resultan de una mitosis tienen lugar en las fases S (o de síntesis de ADN) y M (Mitosis), respectivamente. En G1 y G2 se produce la

auto-valoración de la capacidad celular para enfrentarse a la transición a la fase siguiente, así como la integración de señales procedentes de otras células sobre la conveniencia o no de iniciar o continuar, en su caso, el proceso de proliferación.

Las células quiescentes con contenido de ADN 2C (idéntico al de las células G1) se dice que se encuentran en G0. Por el contrario, las que poseen el contenido G2 (4C) se dice que se encuentran en periodo G0,2 o periodo R. Ante un exceso de señales mitogénicas, las células quiescentes pueden reprogramarse para proliferar de nuevo.

Por otra parte, cuando la proliferación se vuelve incontrolada, aumenta el número de células que forman un tejido. Esto tiene consecuencias negativas sobre ese tejido, sobre otros tejidos e incluso sobre el organismo como un todo. Dicho crecimiento incontrolado se conoce, en las células humanas, como cáncer.

1. UNIVERSALIDAD DE LA MAQUINARIA QUE HACE AVANZAR A LA CÉLULA A TRAVÉS DEL CICLO

Pero ¿cuál es el factor citoplásmico que hace progresar a la célula por el ciclo celular? En 1988 se describió el complejo proteico bautizado como MPF (*Maturation Promoting Factor*) que induce la maduración de oocitos en *Xenopus*. El MPF es un heterodímero formado por una quinasa dependiente de ciclina (CDK) y una ciclina de las llamadas B o mitóticas como subunidad reguladora. Su presencia en la célula induce la condensación cromosómica que caracteriza tanto la transición de G2 a mitosis como a meiosis, previa fosforilación de residuos de serina y treonina en la histona H1 internucleosomal, entre otras dianas. Lo extraordinario es que tanto la CDK como la mitótica son comunes a todas las células eucarióticas (1). La CDK de *Schizosaccharomyces pombe* es el producto del gen *Cdc2*, siendo sus ortólogos CDC28 en *S. cerevisiae*, CDKA en plantas y CDK1 y 2 en animales.

Las quinasas que constituyen la herramienta que controla la replicación del ADN de la célula y su segregación entre las dos células hijas que se originan al final de la mitosis, son polipéptidos de unos 43 kDa de masa, de estructura bilobulada, su extremo amino-terminal formando el lóbulo menor (Fig. 1). En la hendidura entre ambos

lóbulo se encuentra el dominio catalítico de la quinasa, donde tiene lugar la fosforilación de sus sustratos. El lóbulo mayor se pliega sobre la hendidura, en lo que se conoce como lazo T, cubriendo parcialmente su entrada.

Monómero CDK (inactivo)



FIGURA 1. Esquema mostrando la estructura básica de la quinasa dependiente de ciclina (CDK), como monómero inactivo. Se muestran, a la izquierda, los sitios que son susceptibles de cambiar su actividad por fosforilación. Mientras que la fosforilación de la treonina 160 en el llamado lazo T se requiere para la activación de la quinasa, la fosforilación de la treonina 14 y tirosina 15 la mantienen inactiva. El sitio catalítico se encuentra dentro de la hendidura catalítica. La secuencia PSTAIRE permite a la CDK ensamblarse con una ciclina para así transformarse en activa.

La secuencia PSTAIRE (prolina, serina, treonina, alanina, isoleucina, arginina y ácido glutámico) de la quinasa es la región a la que se ensambla una ciclina, para activarla. Las diferentes ciclinas proporcionan a la CDK especificidad de sustrato y, con ello, especificidad de las transiciones entre fases del ciclo celular que controlan.

Los genes para CDKs y ciclinas ejercen el control positivo sobre el ciclo celular, es decir, son responsables de la progresión unidireccional de la célula proliferante hacia etapas más avanzadas en la secuencia G1, S, G2 y mitosis. Por ello, en las células animales, dichos genes se consideran un subgrupo de los llamados (proto) oncogenes.

La importancia de la determinación de las bases moleculares de la proliferación celular en eucariotas ha sido reconocida con la con-

cesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2001 a Nurse, Hartwell y Hunt. Sus hallazgos demuestran la conservación del control de la proliferación por complejos CDK-ciclina durante 10⁹ años de evolución, el tiempo pasado desde que vivía la célula ancestral, ya dotada de esta herramienta molecular, de la que proceden las células de los eucariontes hoy presentes en la biosfera.

2. ACTIVACIÓN DE CDKS

2.1. Por acoplamiento a una ciclina

La asociación de la región PSTAIRE de la CDK tiene lugar con la llamada «caja» de la ciclina concreta que regula la transición entre fases a que se enfrenta la célula (Fig. 2).

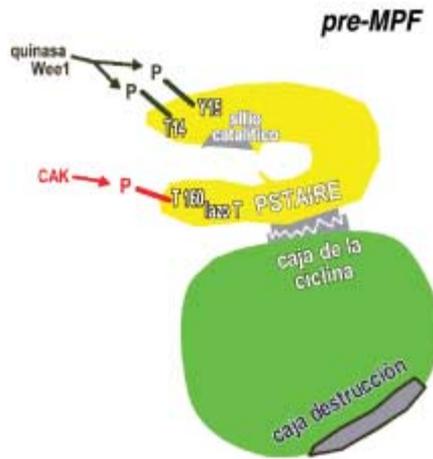


FIGURA 2. Esquema de los rasgos distintivos del pre-MPF o heterodímero CDK-ciclina mitótica, previo a su activación. La ciclina se ha asociado con la quinasa a través de la llamada caja de la ciclina. La ciclina también posee una zona, llamada caja de destrucción, que asegura su proteólisis, previa su marcado con una cola de poli-ubiquitina a cargo de la ligasa E3 conocida como ciclosoma. El heterodímero mostrado en esta figura ya está parcialmente activado por la fosforilación (a cargo de la CAK o quinasa que activa otras CDKs), que abre la hendidura catalítica de forma que el ATP puede ya penetrar en el bolso situado al final, próxima al sitio catalítico. La quinasa Wee1 mantiene fosforilados los residuos T14/Y15, cuya defosforilación activará de forma inmediata dicha quinasa, transformando a este dímero en MPF si la ciclina es una de las mitóticas.

Las ciclinas integran el control transcripcional en la progresión del ciclo. Ello se debe, por un lado, a que su síntesis tiene lugar en un momento concreto del ciclo proliferativo y, por otro, a su labilidad. Ésta viene asegurada por el marcado de una lisina en la «caja de destrucción» de la ciclina con una cola de poliubiquitina (un polipéptido de 76 aminoácidos presente en todas las células eucarióticas). Dicha cola sirve de llave para su entrada en el proteasoma, un complejo proteico en cuyo interior quedan expuestas a distintas proteasas. La degradación de las ciclinas es la responsable de la irreversibilidad de las transiciones entre fases que caracteriza al ciclo proliferativo.

La importancia del descubrimiento del proteasoma y su funcionamiento ha sido también objeto de reconocimiento con la concesión en 1988 del Premio Nobel de Química a Huber, Deisenhofer y Michet y, en 2004, el de Fisiología y Medicina a Ciechanover, Hershko y Rose. Estos últimos definieron los pasos intermedios, dependientes de la cadena enzimática de ubiquitín-ligasas E1, E2 y E3. Tanto la E3 conocida como SCF, que es constitutiva, y la llamada APC/ciclosoma (*Anaphase-Promoting Complex*) que es activa en la tardía mitosis, seleccionan proteínas degradables relacionadas con ciclo celular y con la reversión del estado mitótico, respectivamente.

2.2. CAKs, las quinasas activadoras de CDKs

La fosforilación de la treonina en la posición 160 o próxima en el lazo T de la quinasa activa la CDK unas 300 veces por encima de la actividad que presenta cuando este residuo permanece sin fosforilar. Dicho proceso corre a cargo de las llamadas CAKs (*CDK-Activating Kinases*), mientras que la fosfatasa PP2A la revierte. El complejo CDK-ciclina que tiene fosforilados dichos residuos, así como la treonina 14 y tirosina 15 en el lóbulo menor recibe el nombre de MPF cuando la ciclina es una de las mitóticas (Fig. 2).

Las CAKs triméricas están formadas por una CDK del llamado grupo D de las CDKs (homóloga a la CDK7 de mamíferos), la ciclina H y una proteína tipo RING (conocida como MAT1 en mamíferos) que se asocia a ácidos nucleicos y estabiliza interacciones proteína-proteína.

Dichas CAKs son capaces de fosforilar el dominio carboxi-terminal de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II, componente del factor de transcripción IIH, tanto en plantas como en animales. Por ello, también controlan el nivel de producción del mRNA total en la célula o, al menos, el de ciertos mensajeros específicos. La preferencia por fosforilar uno u otro sustrato varía en las distintas CAKs de plantas. Así, la CDKD;2, actúa preferentemente sobre la RNA polimerasa, mientras que la CDKD;3 lo hace sobre las CDKs. La primera CAK descrita en plantas, concretamente en arroz, fue conocida como R2 y es la más parecida a la ciclina D;2 de *Arabidopsis* (6).

2.3. Una CAK excepcional en plantas

Existe un segundo tipo de CAK en plantas que es activa como monómero. Se conoce como CDK tipo F. Su peculiaridad reside en que es ortóloga de la presente en levaduras (2). La presencia de esta CAK en plantas apoya la transferencia de genes de levaduras al linaje de las plantas en una endosimbiosis ocasional que se postula como uno de los motores de la evolución (4). La presencia en la célula vegetal de un grupo entero de ciclinas (las P) con homología también con las de levaduras (5) corrobora dicha transferencia.

Existe un único gen para esta CDKF en *Arabidopsis* y la quinasa codificada por ella sólo fosforila CDKs. Otro rasgo llamativo de esta CAK monomérica es su mayor eficacia cuando la CDK sustrato se halla también libre, como monómero. Comparte con las CAKs de levaduras su insensibilidad a un inhibidor general de quinasas (la 5'fluorosulfonilbenzoiladenosina) y su tolerancia a cambios en un residuo de lisina presente en la hendidura enzimática de las quinasas que resulta crítico para la correcta asociación del ATP a la quinasa (6).

3. INACTIVACIÓN DE COMPLEJOS CDK-CICLINAS

3.1. Por fosforilación

La fosforilación de la treonina 14 (T14) y la tirosina 15 (Y15) por la quinasa Wee1 mantiene a la CDK ya preparada, dentro ya del

núcleo de la célula pero aún inactiva, porque dicha fosforilación impide la entrada del ATP al bolso de la quinasa, situado al fondo de la hendidura catalítica de la CDK. La acción de la fosfatasa Cdc25 activa de forma instantánea el pre-MPF para dar lugar al MPF plenamente funcional (Fig. 3).

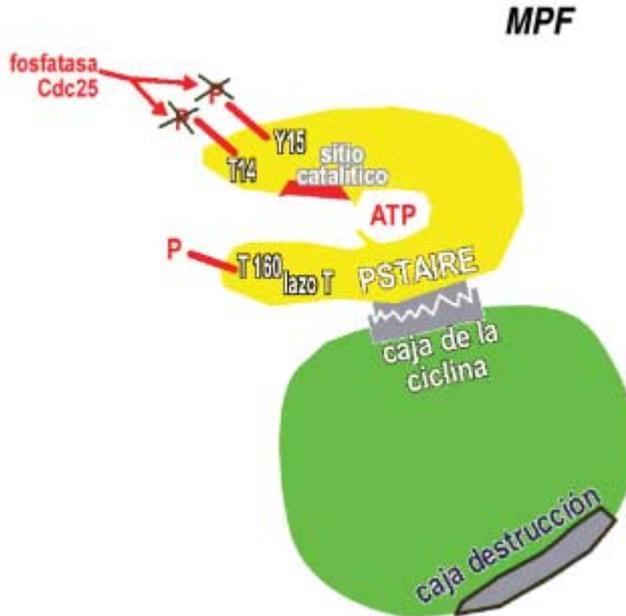


FIGURA 3. El MPF o inductor de condensación cromosómica mitótica. Si comparamos a este dímero con el de la Fig. anterior, vemos cómo se ha producido la defosforilación de los residuos T14/Y15 mediada por la fosfatasa Cdc25, lo que ha permitido el acople de la molécula de ATP en el bolso existente al final de la hendidura catalítica, permitiendo su plena activación como quinasa.

Aunque no existe un homólogo estructural de la fosfatasa Cdc25 en *Arabidopsis* (7, 8), sí existe en ellas una actividad fosfatásica semejante que la activa, por ejemplo, en respuesta a citoquinina (9). Puede ser que la secuencia primaria del homólogo funcional de la quinasa animal esté apenas conservada en plantas, aunque sí se conserven niveles de empaquetamiento o estereología de regiones críticas para su actividad.

3.2. Inactivación de CDKs por su asociación con inhibidores

Existen siete genes codificando por inhibidores de los complejos CDK-ciclina en *Arabidopsis thaliana* (10), todos ellos perteneciendo al grupo conocido como Cip/Kip de inhibidores de CDKs de mamíferos, por lo que se les ha denominado KRPs (*Kip-Related proteins*). No existen, en plantas, homólogos del inhibidor p21, el más universal de todos los CKIs en animales, cuya inducción corre a cargo del factor de transcripción p53. Ésta es una proteína de chequeo o supresora tumoral que controla la iniciación de la proliferación celular o transición G0/G1, aunque también participa en el control de la entrada en mitosis en mamíferos. No existen tampoco en plantas homólogos de la familia INK4 de inhibidores de CDKs que controlan la transición de dormancia a proliferación en animales.

Mientras que la activación del complejo CDK-ciclina producida por defosforilación de T14 e Y15 es rápida y su inhibición relativamente inestable, la inhibición de CDKs por inhibidores depende de la inducción de su previa transcripción. Por ello, esta respuesta es lenta aunque, en plantas, la represión de la actividad del complejo CDK-ciclina por KRPs puede ser más rápida que la que se produce por la ruta análoga en animales. Ello se debe a que en plantas existen KRPs inmovilizados que pueden ser rápidamente liberados cuando se requiera. El estado de quiescencia que se produce por esta vía es prácticamente permanente, a diferencia de los frenados que se producen por la vía de rutas de chequeo que veremos más adelante.

4. LAS CDKS DE PLANTAS

Existen más de 50 CDKs diferentes en plantas, agrupadas en seis grupos (Tabla 1). Su presencia en el ciclo viene señalada en la Fig. 4.

4.1. CDKs tipo A

En *Arabidopsis* existe un solo gen para la CDK tipo A. La quinasa contiene la secuencia canónica PSTAIRE y controla varias de las transiciones del ciclo celular, incluyendo la de iniciación de proliferación (G0 a G1) (11). En realidad, su presencia es un marcador selectivo de

proliferación, ya que esta quinasa no está presente en células durmientes. Existen variantes de la CDKA, con actividades diferenciales a lo largo del ciclo celular (12, 13) y, si bien la propia CDKA es constitutiva, su actividad en el ciclo celular se incrementa en G1 y G2.

Durante la activación de proliferación, CDKA se asocia a las ciclinas D1;1 y D1;3 y fosforila *in vitro* la proteína RB (retinoblastoma) que controla la transición G0 a G1. Aunque la ausencia de esta proteína produce un raro tumor de retina en niños, RB se encuentra también y tiene una función análoga en plantas (13). El heterodímero CDKA-ciclina D se une al factor de procesividad de la DNA polimerasa δ conocido como PCNA (14). Su liberación deja vía libre a la participación de PCNA en la replicación.

TABLA 1. CDKs de *Arabidopsis thaliana* (7, 8, 11)*

	<i>tipo</i>	<i>número</i>	<i>Características</i>
CDKs	A	1	a) constitutiva, pero actividad en G1 y G2 (11) b) PSTAIRE, ortóloga de CDK1 y 2 humanas c) G0/G1: fosforila y libera RB (13) y se disocia de PCNA (14)
	B	4	a) síntesis <u>bajo control transcripcional</u> en G2 (11, 12) b) dos subgrupos: B1 (PPTALRE) y B2 (PPTLRE)
	C	2	a) regula transcripción (15) b) PITAIRE ~ CDK9 humana (aunque esta PITALRE) c) actividad en G1/S
	D	3 (2-4)	a) CAKs triméricas (2, 3) b) ortóloga CDK7 humana c) fosforila CDKs y RNA pol II d) la D;2 regula replicación
	E	1	a) en alfalfa, no en <i>Arabidopsis</i> b) SPTAIRE
	F	1	a) CAK monomérica b) ortóloga de la de levaduras (6) c) sólo fosforila CDKs

(*) Los números entre paréntesis corresponden a referencias bibliográficas.

TABLA 2. *Ciclinas y otras subunidades de CDKs en plantas (8)**

	<i>tipo</i>	<i>número</i>	<i>características</i>	<i>subtipos</i>
Ciclinas	A	10	a) presentes en S y G2 (16) b) NLS alrededor de la «caja» c) no se degradan en anafase	A1 - A3
	B	9	a) Síntesis en G2 por elemento Myb en sus promotores (17) b) B1 en condensación cromosómica y ciclo microtubular (18) c) La degradación de B2 en la media profase coincide con inicio de la parte irreversible de mitosis (19)	B1 - B3
	D	10	a) ciclinas G1 (23), aunque la D3;1 también en G2 b) G0/G1: interacción con RB c) labilidad por secuencias PEST	D1-D7
	H	7	a) se ensambla con CAKs triméricas, es decir, con CDKs tipo D (2)	
	P	7	a) Ortólogas de la ciclina PHO80 de levaduras que controla G0/G1	
	T		a) Se asocian a CDKC para activar RNA pol II (15)	
Otras subunidades de CDKs	CKS	2	a) acoplan otras moléculas a CDKs, ampliando así sus sustratos b) esenciales para proliferación en plantas (24)	
	KRP	7	a) inhibidores de CDKs (10) b) ortólogos de p27Kip1 humana c) KRP1 y 2 en endorreduplicación	

(*) Los números entre paréntesis corresponden a referencias bibliográficas.

4.2. CDKs tipo B o mitóticas

Existen, además, dos grupos de CDK tipo B o mitóticas, específicas de plantas (Tabla 1 y la mitad superior de la Fig. 4). Las siete CDKBs presentes en *Arabidopsis thaliana* se agrupan en dos

subclases: CDK tipo B1 (cuyo motivo es PPTALRE) y CDK tipo B2 (PPTTLRE) (11), previamente descritas en alfalfa como D y F, respectivamente (12). Su presencia en el ciclo viene señalada en la Figura 4.

Es llamativo, por lo excepcional, que la síntesis de las CDKs tipo B esté restringida a G2 y a la temprana mitosis, porque ello significa que estas CDKs están reguladas a nivel de transcripción, un nivel al que, en levaduras y células animales, sólo están sujetas las ciclinas.

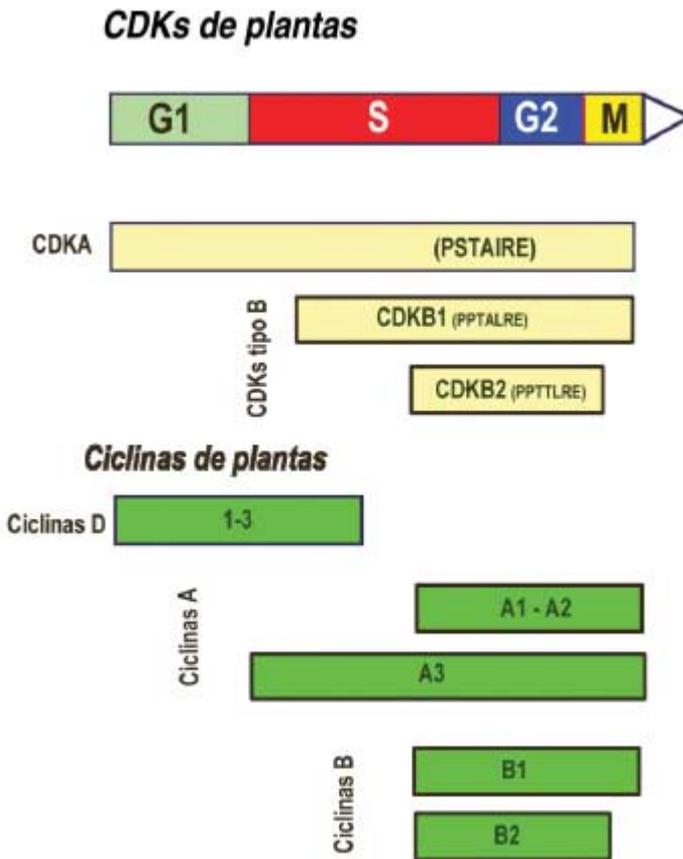


FIGURA 4. Presencia de las distintas CDKs y de los distintos subtipos de ciclinas responsables de la progresión del ciclo celular en plantas. En las CDKs, entre paréntesis, las secuencias responsables de su ensamblaje con ciclinas.

4.3. CDKs no específicas del ciclo proliferativo

En primer lugar están las que activan CDKs, es decir, las llamadas CAKs (Tabla 1), que han sido comentadas más arriba.

Aparte de las CAKS, existe en plantas una quinasa conocida como CDK tipo C que posee PITAIRE como motivo de interacción con ciclinas y está implicada en la regulación de transcripción (15). Se considera homóloga funcional de la CDK9 humana, aunque ésta posee una secuencia distinta (PITALRE).

5. LAS CICLINAS DE PLANTAS

En plantas existen más de 60 ciclinas pertenecientes a siete tipos diferentes. Muchas, pero no todas, son responsables de la culminación de las distintas transiciones entre distintas fases consecutivas del ciclo proliferativo (Tabla 2). Su presencia en el ciclo celular de plantas está recogida en la Figura 4, debajo de los datos referentes a las CDKs, con las que han de interaccionar para activarlas.

5.1. Ciclinas tipo A

Existen 10 ciclinas tipo A en *Arabidopsis*, agrupables en tres subtipos (A1-3). Dos pertenecen al subtipo A1, mientras que los subtipos 2 y 3 poseen cuatro ciclinas cada uno (16).

Las ciclinas A3 son las que poseen un dominio N-terminal más corto y las que se expresan más temprano en el ciclo celular, en la transición G1 a S. Mientras que en tabaco la ciclina A3,2 pudiera estar relacionada con la iniciación de la replicación, la ciclina A3,1 podría controlar la elongación de las cadenas nacientes (Fig. 4). Por otra parte, las ciclinas tipo A1 y A2 comienzan su actividad hacia la mitad del periodo S (8, 12), y aunque podrían controlar el encendido de orígenes tardíos de replicación, lo probado es que controlan G2 y la iniciación de la mitosis. Por último, estas dos últimas ciclinas sólo se asocian *in vitro* con la subunidad catalítica CDKA (16).

5.2. Las ciclinas tipo B o mitóticas

Este grupo de ciclinas consta de nueve miembros en *Arabidopsis*. Existen dos subtipos principales: B1 y B2, con cuatro miembros cada una y otra ciclina para la que se ha propuesto crear una nueva subclase, la B3, en base a sus diferencias en estructura primaria con las anteriores (7). Las ciclinas mitóticas hacen su aparición entre finales del S y G2 (Fig. 4). La activación de la transcripción de las ciclinas B de plantas está basada en el reconocimiento, por factores de transcripción que recuerdan a los Myb de animales, de un motivo consenso formado por 9 pares de bases, conocido como MSA (*Mitosis-Specific Activator*). Esta secuencia está también presente en alguna otra proteína mitótica como, por ejemplo, en las quinesinas (17). Ello puede explicar la coordinación de la transcripción de proteínas de las que depende la iniciación de la mitosis en la célula vegetal.

En cuanto a las ciclinas B1, existen cuatro diferentes. Al menos la expresión de la ciclina B1;2, aunque no la de la B1;1, es un potente inductor de la transición G2-mitosis en el ciclo celular. Así, la expresión ectópica de ciclina B1;2 permite que los tricomas foliares mantengan un ciclo proliferativo convencional, con sus células diploides, en lugar de llevar a cabo ciclos abreviados, sin mitosis, que les hace llegar a ser politénicas por el proceso conocido como endoreduplicación.

Las ciclinas B1 parecen tener un papel clave en el ciclo microtubular responsable de la división citoplásmica que es específica de plantas. Así, esta ciclina se localiza en la banda preprofásica microtubular además de encontrarse en la envoltura nuclear, antes de su rotura en prometáfase, y en los cromosomas mitóticos condensados (18). La expresión ectópica de la ciclina B1 adelanta la desaparición de la banda preprofásica de microtúbulos que marca el comienzo de la profase. Además, el bloqueo de la degradación de toda la ciclina B1 presente en la célula, como consecuencia de una mutación en su «caja de destrucción», impide la formación del fragmoplasto (18). Ello induce una alteración en la mitosis, conocida como endomitosis, en las que las cromátidas hermanas acaban de segregarse por sus centrómeros dando lugar a cromosomas hijos que se mantienen dentro de un mismo núcleo, duplicándose su número. El contenido en la ciclina B1 sigue incrementándose hasta metafase, y

las células acumuladas en metafase presentan su contenido alto de ciclina B1 (18).

En cuanto a las ciclinas que pertenecen al grupo B2, nuestro grupo, en colaboración con otros dos también europeos (el del profesor Heberle-Bors del Biozentrum de la Universidad de Viena y el del doctor Bögre del Royal Holloway, de la Universidad de Londres), ha estudiado la función de la ciclina B2; 2 en la transición G2-profase (19).

La expresión ectópica de ciclina B2;2 adelanta la entrada en mitosis, definida como iniciación de condensación cromosómica. De forma análoga a lo que ocurre con la ciclina B1, la carencia de ciclina B2 impide la transición de G2 a mitosis (65; 85). Los contenidos, pues, en ciclinas B1 y B2 actúan en la célula vegetal como factores limitantes para la entrada en mitosis, como corresponde a su papel como reguladores positivos de G2.

La ciclina B2;2 de la célula se comporta siempre como una proteína intranuclear. El seguimiento de una construcción ciclina B2;2-proteína verde fluorescente demostró que esta ciclina es estable a partir de un cierto momento en G1 y así se mantiene durante S y G2. Su degradación tiene lugar en profase, mientras que su expresión ectópica durante metafase interfiere con el alineamiento de los cromosomas en la placa ecuatorial (19). Su expresión ectópica también adelanta la entrada en mitosis en células en las que se ha activado la ruta de chequeo G2 por inhibición de la topoisomerasa II, impidiendo la resolución de catenaciones producidas durante la individualización cromosómica premitótica (20).

En la profase temprana de todas las células eucarióticas ocurre un fenómeno único en el ciclo celular: la condensación cromosómica que se observa en la media profase puede revertirse hasta el nivel observado en interfase tanto en mamíferos (21) como en plantas, en éstas concretamente cuando se inhibe la síntesis simultánea de proteínas (22). La presencia en la profase media de la ciclina B2 en la célula vegetal y de su homólogo funcional, la ciclina A, en animales puede ser responsable de dicha reversibilidad. Una vez que estas ciclinas desaparecen, las profases están comprometidas de forma irreversible, a continuar la profase y metafase.

5.3. Ciclinas tipo D

Las ciclinas tipo D son ortólogas de las tipo D de mamíferos y, como ellas, son intermediarios a través de los cuales se ejerce el control social de la proliferación en una célula en la transición entre dormancia y proliferación. Son ciclinas que están presentes en G1. Existen 10 ciclinas D, pertenecientes a siete subtipos (D1-D7) (7, 23). Una característica que las ciclinas D de plantas que tienen en común con las G1 de levaduras es la presencia de secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina) que las hace ser dianas de enzimas proteolíticas. La degradación de las ciclinas D ocurre en el proteasoma, previo su marcado con poli-ubiquitina, mediado por la ubiquitín ligasa E3 conocida como SCF, que es de presencia constitutiva en el ciclo celular.

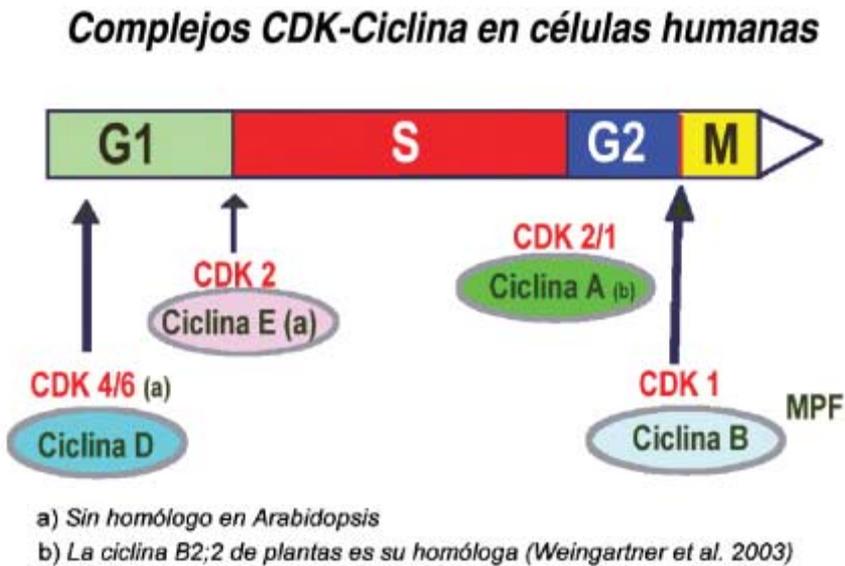


FIGURA 5. Heterodímeros CDK-ciclina en relación a las distintas transiciones del ciclo celular en células humanas. De alguna de las CDKs y ciclinas no existen homólogos en plantas.

Las ciclinas D activan específicamente la subunidad catalítica de la CDK tipo A, con la que se ensamblan.

Uno de los rasgos de las ciclinas D, que comparten con las humanas, es que casi todas (la D4;2 y 6 y, parcialmente, la D5;1 son excepciones) poseen en su región amino-terminal la secuencia LXCXE (donde X es cualquier aminoácido esencial; L, C y E corresponden a leucina, cisteína y ácido glutámico, respectivamente) que las permite asociarse al homólogo que poseen las plantas de la proteína RB (retinoblastoma) (13).

En las células animales se conocen los heterodímeros CDK-ciclina correspondiente a cada transición del ciclo celular. Ellas aparecen en la Figura 5.

Aunque no existe un conocimiento preciso de las subunidades que forman los heterodímeros correspondientes en plantas, la Figura 6 recoge lo que se conoce y lo que se puede deducir de la presencia de ambas subunidades de la CDK activa en las células vegetales.

Complejos CDK-Ciclina en células de plantas

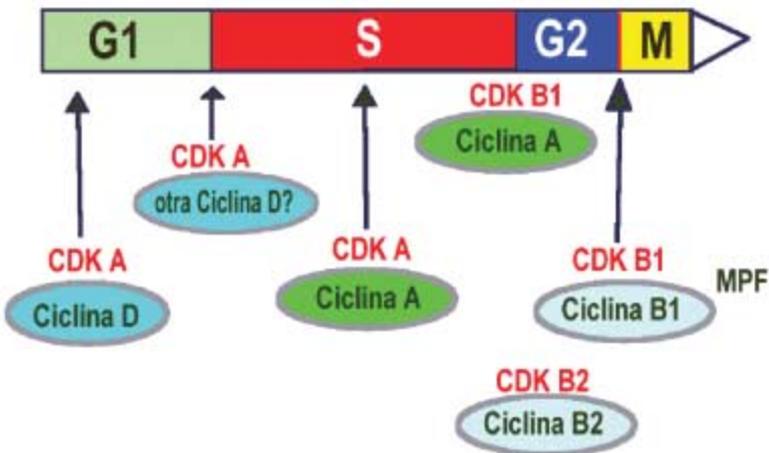


FIGURA 6. Presencia de las distintos heterodímeros CDK-ciclinas en el ciclo celular de células vegetales. Estas células carecen de un homólogo de la ciclina E humana que opera en la iniciación de proliferación (comienzo del periodo S). Se postula que la oscilación entre las distintas ciclinas D o el cambio de una a otra puede hacer ese papel en la célula de plantas. La especial complejidad del control de G2 y temprana mitosis en plantas queda de manifiesto por la existencia de tres heterodímeros distintos. La CDK2-ciclina B2 es el homólogo funcional del CCDK1/2-ciclina A humano. No se sabe bien si la asociación de CDKB1 a ciclina A o a ciclina B1 solapan en el tiempo u ocurren en secuencia.

5.4. Ciclinas de plantas no relacionadas directamente con el ciclo

Además de las ciclinas con función directa sobre la aceleración del ciclo celular en distintas regiones del ciclo celular en plantas, en ellas existe —como en animales— la ciclina H (Tabla 2) que interacciona con las CAK tipo D (2, 3) (Tabla 1).

En plantas, además, existen otras ciclinas como las T que se unen a la CDKC y actúan en el control de la transcripción (15) y las siete ciclinas tipo P, recientemente descritas en *Arabidopsis*, que interaccionan con la CDKA;1 pero que se expresan también en tejidos en diferenciación y maduros. Estas ciclinas comparten una región central de 100 aminoácidos de su «caja de ciclina» con la presente en ciclinas G1 de Tripanosomas y en la ciclina PHO80 de *S. cerevisiae* (5). De nuevo, estas ciclinas P refuerzan la teoría de la transferencia de paquetes de genes de levaduras al genoma de plantas, relacionada con una simbiosis ocasional, semejante a la descrita por incorporación del genoma de bacterias a otros genomas eucarióticos y que sería una vía de evolución para éstos últimos, según una propuesta muy a tener en cuenta (4).

6. OTRAS SUBUNIDADES DE LOS COMPLEJOS CDK-CICLINAS

Existe una subunidad de los complejos CDK-ciclina conocida como CKS (*Cdk Subunit*) que presenta tal afinidad por la CDK que se usa como cebo en las columnas que permiten el aislamiento de la subunidad catalítica de las CDKs. Se cree que sirve como adaptadora de sustratos potenciales de las quinasas dependientes de ciclina y de otras posibles proteínas reguladoras.

Se han descrito dos CKSs (1 y 2) en *Arabidopsis* (Tabla 2). Ambas carecen de los extremos amino y carboxi terminal que caracterizan a las CKSs de levaduras. Hoy se sabe que estas subunidades son esenciales para la proliferación celular en plantas (24).

Finalmente, la célula vegetal cuenta también con los inhibidores fisiológicos de CDKs conocidos como KRP (*Kip-Related Proteins*),

arriba comentados (10) cuya asociación con los dímeros CDK-ciclina, los inactiva.

La expresión del ortólogo p27, en células humanas, tiene la peculiaridad de ser activada por la señal antimitogénica producida por TGF- β (*Transcription Growth Factor* β), pero no por la proteína supresora tumoral p53, lo que es compatible con la eficacia de p27 (Kip1) en el entorno libre de p53 que caracteriza a las células de plantas (25).

Dos de los siete KRPs, concretamente el 1 y 2, se encuentran en tejidos en los que se produce endorreduplicación, como ocurre en los tricomas que se desarrollan en las hojas de *Arabidopsis*.

7. LAS RUTAS DE CHEQUEO, MECANISMOS QUE FRENAN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

El grupo de Hartwell, trabajando en *S. cerevisiae*, da un paso decisivo en la comprensión del ciclo celular al descubrir que la carencia de un gen, el llamado RAD9, en lugar de interrumpir la progresión de la célula hacia etapas más tardías del ciclo celular, permite la entrada anticipada en etapas posteriores del ciclo antes de que su ADN esté totalmente replicado y reparado o, lo que es lo mismo, antes que la célula se encuentra debidamente preparada para su entrada en mitosis (26).

El gen RAD9 es cabeza de serie de unos reguladores de ciclo que fueron bautizados como genes de chequeo y, también, genes de control por retroalimentación. En células humanas forman un subgrupo de los llamados supresores tumorales, que incluyen otros genes que activan un programa de suicidio celular o apoptosis. Todos ellos evitan la propagación de células con información genética deteriorada.

Los genes de chequeo que frenan la progresión del ciclo son reguladores negativos de la proliferación. Son genes recesivos. Su actividad sólo se interrumpe en las células somáticas diploides cuando faltan o son disfuncionales las dos copias situadas en el par de cromosomas homólogos.

Existen, al menos, seis regiones del ciclo donde operan los genes de chequeo comprobando la idoneidad de una célula para afrontar una transición irreversible a una fase posterior del ciclo, frenándola si la célula carece de algún requisito imprescindible (Fig. 7). Dos de estas regiones —la situada al principio del G1 y la situada en G2—, permiten la entrada y la salida del ciclo, respectivamente, cuando las condiciones valoradas por las correspondientes rutas de chequeo así lo aconsejan.

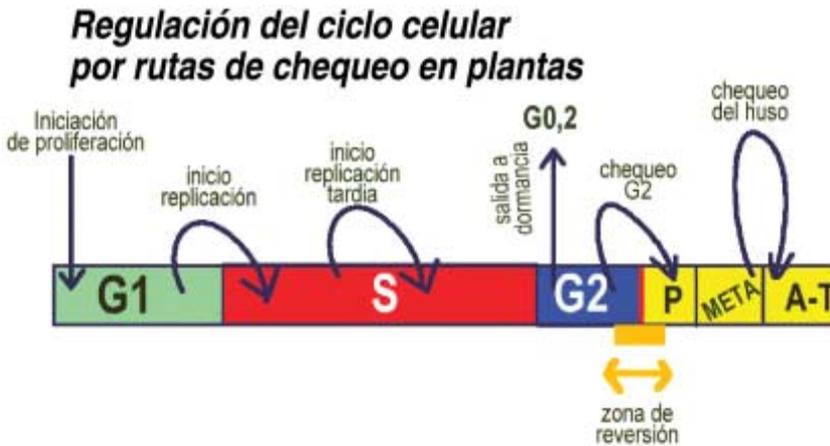


FIGURA 7. Distintas rutas de chequeo en el ciclo celular de plantas. Las flecha al principio de G1 y G2 señalan la iniciación de proliferación y la salida a dormancia guardadas por las correspondientes rutas de chequeo que responden tanto a señales intracelulares como a las extracelulares. Las señales de idoneidad intracelulares son por tanto específicas para una célula concreta frente una transición irreversible específica entre fases consecutivas del ciclo. También se señalan esta figura la zona de reversión situada entre el tardío G2 y la primera parte de la profase, en respuesta a condiciones ambientales o internas desfavorables para llevar a cabo meta- y anafase. La reversibilidad de la profase parece desaparecer con la degradación de la ciclina B2;2 en plantas y con la ciclina A en humanos.

Es una observación normal que idénticas rutas de chequeo posean distintos niveles de restricción en diferentes especies, dependiendo del entorno genómico de dichos genes de chequeo. Así, la región de chequeo G2 es la más estricta de todas en plantas y *S. pombe* mientras que, por el contrario, en mamíferos y *S. cerevisiae* el control más estricto es el responsable de la iniciación de proliferación.

8. FUNCIONES Y BASES MOLECULARES DE LAS RUTAS DE CHEQUEO

Las posibilidades de modulación de la CDK permiten hacerse una idea de cómo la célula puede conseguir frenar el reloj de la proliferación basado en CDK-ciclinas (27).

Los genes de chequeo permiten a la célula responder al control social o juego de señales de carácter mitogénico o antimitogénico producidas por otras células del mismo tejido o por otros tejidos sobre la conveniencia o no de iniciar —o en su caso continuar— el ciclo de división. Este tipo de chequeo se suele ejercer en la transición G0 a G1, a través de la llamada ruta del retinoblastoma (Fig. 8) aunque en plantas la entrada a ciclo se lleva a cabo también entre G0,2 y G2.

Los genes de chequeo que actúan dentro ya del ciclo celular lo hacen en respuesta a un sistema de retroalimentación que les permite conocer, a nivel de cada célula individual, su adecuación para llevar a cabo una transición entre fases. La región del ciclo en la que una célula interrumpe su progresión al fallar la función de un gen regulador positivo se llama punto de control. Por el contrario, la región en la que se frena la progresión hacia una fase posterior del ciclo celular se llama punto de chequeo.

Si la interrupción del ciclo celular se debe a la carencia de un regulador positivo la parada que se produce en el ciclo es permanente. Por el contrario, si dicha parada se debe a la actividad de un regulador negativo del ciclo proliferativo es sólo transitoria. La disfunción de una proteína represora, de chequeo, permite —después de un tiempo— la entrada de la célula a la fase siguiente del ciclo celular cuando aún no se encuentra preparada para culminar con éxito los procesos que habrá de llevar a cabo en la fase siguiente (26). Este proceso se conoce como «adaptación» a rutas de chequeo.

Adaptación a chequeo es un término aceptado, pero que resulta equívoco. Este mecanismo lo que realmente permite es realizar una transición irreversible a una fase posterior del ciclo sin que la célula esté preparada. Un paradigma de este proceso viene dado por la entrada en mitosis de células con ADN sólo parcialmente replicado o ya replicado pero con daño no reparado. La consecuencia de la adaptación a chequeo, en este caso, dará lugar a lo que se conoce

como mitosis prematura, en el sentido de que tiene lugar antes de que el ADN de la célula esté preparado. Siguiendo con este ejemplo concreto, la tensión anafásica de los cinetocoros migrando hacia polos opuestos del huso y la segregación de las cromátidas hermanas producirá la aparición de roturas en los brazos cromosómicos que originarán aneuploidías, por pérdida de fragmentos cromosómicos acéntricos.

Las rutas de chequeo son las responsables de mantener invariable la secuencia de las fases del ciclo proliferativo. Están formadas por cadenas enzimáticas de transmisión de señales. Constan, en primer lugar, de una proteína sensora que valora el estado de componentes internos de la célula o de señales extracelulares sobre lo adecuado de iniciar o continuar proliferación.

Para cada ruta de chequeo existen al menos dos dianas distintas. La primera activa el proceso que falta por completar a la célula para enfrentarse sin riesgo a un salto de fase. La segunda diana es el propio complejo CDK-ciclina que controla la transición específica de la célula a la etapa siguiente del ciclo, en este caso para frenar su activación (27) y con ello retrasar en el tiempo la transición de riesgo que debe evitarse. Éste es un mecanismo post-transcripcional, independiente de la iniciación de transcripción de nuevas proteínas en la célula.

Las cadenas de transducción de señales en humanos son dos. La primera se inicia con la quinasa temprana ATM, mutada en el síndrome conocido como Ataxia-telangiectasia en el hombre, uno de los síndromes que conllevan inestabilidad genómica y, como consecuencia, alto riesgo de desarrollo de tumores. Un ortólogo de este gen está también presente en *Arabidopsis* (28). Esta cadena acaba en la quinasa efectora Chk2 (*Checkpoint Kinase 2*). La otra ruta de transducción de señales comienza en la quinasa ATR (*ATM and Rad3-Related kinase*) y acaba en la quinasa Chk1. La quinasa de esta segunda ruta también está presente en *Arabidopsis* (29).

En plantas, la quinasa ATM fosforila proteínas responsables de la reparación del ADN dañado y también otras que controlan el ciclo celular, mientras que la quinasa ATR parece ser la responsable de las rutas de chequeo que dentro del periodo S son capaces de frenarlo cuando existe una depleción en nucleótidos producida por un fallo en

la ribonucleótido-reductasa, así como del chequeo en G2 que se activa una vez que ha ocurrido la adaptación a los chequeos intra-S (29).

La célula vegetal también posee un homólogo de la molécula adaptadora BRCA1 (*Breast Cancer 1*) que se halla mutada en una parte de los cánceres de mama hereditarios. Esta molécula, en el hombre, sirve como plataforma de ensamblaje para complejos en los que intervienen varias de las proteínas de chequeo y las responsables de reparación en animales (30). Se supone que tiene un papel análogo en la célula vegetal.

Las rutas de chequeo comparten con las redes neuronales propiedades tales como la de ampliar una señal intracelular de riesgo hasta llegar a un nivel eficaz para que dicha señal pueda inducir la interrupción del ciclo. Se considera que esto es debido a la existencia de rutas redundantes. El fenómeno de adaptación a rutas de chequeo (apartado 11) tiene también su correlato en las redes neuronales, en las que señales que se producen de forma continua se comportan como si, pasado algún tiempo, dejaran de «ser oídas» por la célula. Las rutas de chequeo son también capaces de computar señales de signo diferentes, como puede ser el contenido de ciclina B2;2 y la existencia de daño no reparado en G2 para producir un resultado final único, de signo positivo (mitogénico) o negativo que permita o frene la entrada en mitosis, respectivamente (31).

9. LA DISPENSABILIDAD DE LAS RUTAS DE CHEQUEO

Como se puede suponer, en el caso de que no exista ningún tipo de daño intracelular o riesgo, la presencia o no de rutas de chequeo en la célula es irrelevante. La carencia de rutas de chequeo en las primeras divisiones cigóticas se ha justificado por el hecho de que los genomas implicados en ellas acaban de pasar una prueba exhaustiva de corrección de errores en la meiosis inmediatamente anterior, durante recombinación entre los homólogos del bivalente.

Sin embargo, hemos hallado que la estimulación de proliferación en los primordios durmientes de la raíz presentes en el bulbo de cebolla no lleva a la inducción simultánea de las rutas de chequeo. No hay indicio alguno de la existencia de retraso en la aparición de las primeras mitosis producido en respuesta a radiación ionizante.

Esta carencia se confirma, además, por la mayor frecuencia de micronúcleos, testigos de la existencia de fragmentos acéntricos en mitosis previas (32). Se puede concluir que, ante condiciones fisiológicas adecuadas para iniciar proliferación en raíces durmientes, la activación rápida de rutas metabólicas básicas es prioritaria y más temprana que la implantación de las rutas de chequeo.

10. EL CHEQUEO DE LA INICIACIÓN DE PROLIFERACIÓN

A pesar del relativamente bajo nivel de restricción de la ruta de chequeo que controla la transición de G0 a G1 en relación a la que controla la transición de G2 a mitosis en plantas, la llamada ruta del retinoblastoma que controla esta importante decisión en las células animales, también opera en plantas.

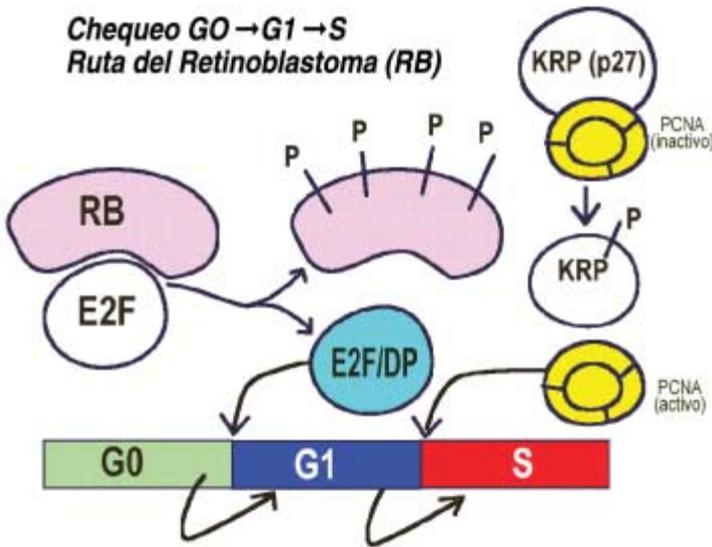


FIGURA 8. Chequeo de la entrada en proliferación o paso G0 a G1, así como de la iniciación de replicación (paso G1 a S). En G0 la proteína retinoblastoma (RB) mantiene secuestrado el factor de transcripción E2F. La fosforilación de RB libera al factor E2F que dimeriza y permite la transcripción de proteínas requeridas para iniciar replicación. Sin embargo, la entrada en S exige, además, la remoción de KRP, un inhibidor de las CDKs que mantiene secuestrado al PCNA o factor de procesividad de la DNA polimerasa δ .

El grupo del profesor Crisanto Gutiérrez, de la Universidad Autónoma de Madrid, ha jugado una parte muy importante en el descubrimiento del homólogo de la proteína retinoblastoma y de su papel en plantas (13), así como de la asociación «interesada» de geminivirus a ella, para así activar la proliferación de la célula para que les sirva de soporte.

La CDKA o subunidad catalítica de la quinasa constitutiva de plantas interviene en la iniciación de proliferación asociada al menos a la ciclina D2 (Fig. 8), aunque el ensamblaje de la CDKA con las ciclinas D1;1 y D1;3 también fosforila *in vitro* la proteína RB.

Como vemos en la misma Figura 8, la liberación del factor de transcripción E2F y su dimerización a cargo de DP (33) produce la activación de la transcripción de genes requeridos para la iniciación de replicación de ADN. Un segundo paso para permitir la replicación del ADN nuclear se produce al liberar al PCNA de su asociación a RB (14), así como la degradación de KRPs, el inhibidor de CDKs que es el homólogo en plantas del inhibidor de CDKs p27 (Kip1) humano (10). Con ello se pone en marcha la síntesis de proteínas responsables de la replicación en la célula vegetal y la propia replicación.

11. EL CHEQUEO DE LA ELONGACIÓN DEL DNA NACIENTE

Una vez iniciada la replicación del ADN, existen dos regiones de chequeo dentro del propio periodo S (Fig. 8), como ha mostrado nuestro grupo en *Allium cepa* al producir una falta de nucleótidos como consecuencia de la inhibición del enzima ribonucleótido-reductasa por hidroxiamina (34). Estas dos regiones de chequeo dentro del periodo S de las células vegetales coinciden con las etapas de elongación de las cadenas de ADN de nueva síntesis, producidas bien en orígenes tempranos o en los tardíos, respectivamente. Esencialmente, esto ocurre también de forma semejante a lo observado en las células de mamíferos (35).

12. EL CHEQUEO G2

Nuestro grupo ha centrado su interés en el chequeo que, durante el G2, frena la llegada a mitosis antes de que la célula vegetal se encuentre en condiciones adecuadas para dicha entrada. Se trata, pues, del control negativo de la entrada en mitosis (ver Fig. 6).

La ruta G2 integra el chequeo sobre un conjunto de circunstancias que se deben producir en la tardía interfase para que la entrada en mitosis sea segura. Dicha entrada es consecuencia de un balance final de carácter mitogénico después de la valoración de señales de distinto signo procedentes de las distintas subrutas que se integran en un mismo punto de chequeo.

12.1. Activación de la ruta de chequeo G2 por la presencia de DNA no replicado

La inducción de células multinucleadas en los meristemos es un sistema desarrollado por el grupo del profesor doctor Gonzalo Giménez Martín, miembro correspondiente de esta Real Academia, en su grupo de investigación en Madrid, al que debo mi formación y en el que he desarrollado la mayor parte de mi carrera investigadora. Las células multinucleadas ponen en evidencia que la entrada en mitosis depende de la terminación de la replicación en plantas. Así, aunque todos los núcleos de cada una de estas células inician su replicación simultáneamente, aquéllos con un mayor entorno citoplásmico terminan antes la replicación. Los primeros se pueden llamar núcleos rápidos en replicación, mientras que los últimos serían núcleos lentos (36). En estas células es posible, pues, inhibir selectivamente la replicación de los núcleos lentos una vez que los rápidos hayan completado la suya. Del estudio de la ruta de chequeo G2 en plantas se puede deducir que la presencia de núcleos lentos, aún en replicación, es capaz de frenar la entrada en mitosis de los núcleos que ya la han completado (37). Expresado de otra manera, esta condición activa la ruta de chequeo G2 y frena durante un cierto tiempo la transición a mitosis de los núcleos que comparten el mismo entorno citoplásmico y que ya habían completado su replicación. La adaptación a esta ruta de chequeo G2 se pone de manifiesto porque, des-

pués de un retraso, todos los núcleos de la célula acaban por entrar en mitosis, incluidos los lentos que, como aún no han completado su replicación, muestran roturas cromatídicas en sus cromosomas. Entre éstos últimos, mientras que algunos sufren la mera inducción de condensación cromosómica prematura, otros forman incluso su propio huso mitótico, aunque sólo los segmentos cromosómicos con cinetocoro se anclan a él y se segregan.

12.2. Activación de la ruta de chequeo G2 al inhibir la decatenación del DNA

La topoisomerasa II es una enzima que resuelve tanto las catenaciones que se producen entre las dos moléculas hermanas del DNA durante su replicación, como las no replicativas que se producen al azar entre moléculas próximas del DNA que se tocan de forma fortuita (20). El empleo de ICRF-193, un inhibidor que no produce de forma colateral roturas en las cadenas de ADN nos ha permitido determinar que el chequeo del estado de catenación se encuentra también integrado en la ruta G2. Dicha ruta de chequeo comprueba la individualización de los distintos cromosomas, consecuencia de la resolución de catenaciones no replicativas producidas durante la reestructuración de los dominios cromosómicos que tienen lugar en preparación para la mitosis.

12.3. La activación de la ruta de chequeo G2 por daño radioinducido en el DNA

La irradiación de meristemos, creciendo en equilibrio dinámico, con distintas dosis de rayos X ha permitido determinar que los alargamientos en la llegada a mitosis, inducidos por las rutas de chequeo de replicación y la de DNA en G2 son función lineal de la dosis de irradiación y, por tanto, del daño en su DNA. Sin embargo, incluso cuando la irradiación se produce a dosis que no afectan al crecimiento de la raíz, el tiempo que pasa hasta que se produce una nueva ola mitótica es siempre insuficiente para la reparación completa del daño presente en su ADN. Así, algunas mitosis de las que forman la ola tardía en relación al momento de irradiación presentan roturas cromatí-

dicas (38). Esta observación prueba que la entrada en mitosis se ha producido por adaptación a la ruta de chequeo G2.

13. EL CHEQUEO DEL HUSO

Existe al menos una transición dentro de la propia mitosis, la correspondiente a la iniciación de la anafase, que se encuentra bajo supervisión por la llamada ruta de chequeo del huso. Esta ruta, como se describió en células animales, condiciona el permiso a iniciar la segregación de centrómeros en anafase a que los centrómeros de todos los cromosomas se encuentran asociados mediante microtúbulos a ambos polos del huso (39).

Nuestro grupo ha demostrado que, en plantas, la ruta de chequeo del huso, aparte de valorar el anclaje de los centrómeros de todos y cada uno de los cromosomas a ambos polos del huso mitótico, también comprueba si todavía persiste alguna catenación replicativa residual entre las cromátidas hermanas, bien a nivel de los brazos cromosómicos o de sus centrómeros.

14. LA INESTABILIDAD GENÓMICA

La existencia de un paquete de células incapaces de completar su reparación, incluso a dosis de irradiación que no disminuyen la velocidad de crecimiento de la raíz (38) fue una sorpresa. Contradice la firme creencia de que las rutas de chequeo sirven para evitar la aparición de inestabilidad genómica cuando, en realidad, la célula que presenta en G2 daño remanente en su ADN, aunque éste no supere su capacidad reparativa, favorece la iniciación de un experimento en microevolución. La célula se comporta como si su objetivo no fuera agotar toda su capacidad de reparación antes de que ocurra la transición por adaptación a chequeo. En lugar de ello, la célula parece favorecer la posibilidad de ensayar re-estructuraciones de su genoma, a costa de la adquisición de inestabilidad genómica.

La introducción de una sola rotura bicatenaria de DNA en la célula post-mitótica, al principio de su nuevo ciclo, asegura la inestabilidad genómica en las células que clonalmente se van a derivar

de ella, ya que reestructuraciones genómicas inestables, seguidas de saltos indebidos por transiciones del ciclo, hacen evolucionar a la célula hacia un fenotipo mutador, en el que se llegan a acumular múltiples mutaciones.

La inducción de inestabilidad genómica por roturas bicatenarias no reparadas se basa en que la recombinación homóloga tiene lugar con una frecuencia unas 100 veces mayor con las secuencias intactas presentes en la cromátida hermana que con las presentes en el cromosoma homólogo, como consecuencia de su confinamiento en dominios no adyacentes del núcleo. De ello se deduce que la recombinación reparativa en G1 tiene lugar preferentemente por recombinación no homóloga, tolerada en la célula porque algo menos del 5 por 100 del genoma son genes que se expresan. Pero la reparación no homóloga suele dar lugar a cromosomas dicéntricos. Éstos, a su vez, dan lugar a puentes cromosómicos en la siguiente anafase, que sólo se resolverán con la producción de una nueva rotura al azar, algunas veces producida mecánicamente por la placa de citocinesis en formación, actuando como una cizalla sobre un puente cromosómico. Rotura bicatenaria en núcleo G1-reparación por recombinación no homóloga-producción de cromosoma dicéntrico-puente cromosómico en la anafase siguiente-rotura del puente cromosómico en telofase-entrada del núcleo en G1 con otras roturas bicatenarias ocurridas al azar, cierran un círculo que perpetúa la inestabilidad genómica en las células clonalmente derivadas de la primera.

15. LA CANCELACIÓN DE RUTAS DE CHEQUEO POR ANÁLOGOS DE PURINAS

La inhibición selectiva que cafeína y otros análogos de las purinas canónicas del ADN ejercen sobre las quinasas que inician las rutas de chequeo (ATM/ATR) explica, por un lado, la minimización o parcial cancelación de las paradas que estas rutas inducen en la duración del G2 en presencia de daño en el ADN (34). Por otra parte, y como consecuencia de lo anterior, los análogos de bases presentes en el ADN «potencian» las roturas cromosómicas observadas en mitosis cuando se usan en G2 en combinación o después del uso de un agente clastogénico.

Ahora bien, los análogos de purinas no sólo podían ser canceladores universales de rutas de chequeo sino que podían inducir un proceso más radical, saltando indebidamente a una etapa posterior no necesariamente la subsiguiente, como por ejemplo saltar de G1 o del periodo S a mitosis (40). Ese salto excesivo a una fase no adyacente se produce en una línea celular humana en la que la expresión de la ciclina mitótica (que normalmente empieza a expresarse en G2) se adelanta al periodo G1 o S (40).

Nuestro grupo utilizó meristemos de *Allium cepa* L., creciendo en condiciones de equilibrio dinámico, para determinar cómo era la respuesta de la célula vegetal a cafeína. En primer lugar se vio que las células previamente retenidas por rutas de chequeo de replicación, en S temprano y, después, en S medio y que habían saltado indebidamente ambos bloqueos, llegan a G2 con contenidos de DNA por debajo del contenido $2n4C$ que caracteriza a las células G2. Más aún, muchas de estas células alcanzan, después de un largo G2, la mitosis, pero con cromosomas fragmentados. Estos datos señalan que en los meristemos de plantas con las rutas de chequeo intactas, el salto indebido de un bloqueo por chequeo no libra a las células vegetales de ser nuevamente retenidas en el siguiente punto del ciclo, donde se produce un nuevo chequeo de idoneidad. Pero en cualquier caso, la cafeína no induce a las células retenidas por chequeo dentro del periodo S saltar de forma directa hasta mitosis.

Más tarde, usando plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* pudimos demostrar que era necesaria la inducción simultánea de la expresión ectópica de una de las ciclinas mitóticas, concretamente la B2;2, para que se produjera el salto de S a mitosis en presencia de cafeína en plantas (18). Así pues, la expresión de una ciclina concreta en una etapa del ciclo celular se comporta como un mecanismo de seguridad que evita saltos a etapas del ciclo posteriores, pero no adyacentes.

16. LA SALIDA DEL CICLO HACIA DORMANCIA O HACIA APOPTOSIS: INDUCCIÓN DE NUEVOS PATRONES DE EXPRESIÓN

Si una célula no es capaz de eliminar el daño remanente que activó la ruta de chequeo G2, cuenta todavía con otras dos opciones alternativas a la adaptación al chequeo. Pero ambas requieren la iniciación de un nuevo programa de transcripción que, una vez iniciado, es difícilmente reversible.

La primera de las opciones se trata de la salida de proliferación (G2) hacia dormancia (G0,2), lo que se consigue mediante la síntesis de inhibidores fisiológicos de los complejos CDK-ciclinas, es decir, de una KRP de plantas (10).

La segunda opción consiste en la iniciación de un programa de auto-destrucción o suicidio de la célula, conocido como apoptosis. Nuestro grupo ha constatado que las células vegetales activan este programa en respuesta a daño radioinducido en su genoma. La elección entre adaptación a la ruta de chequeo o apoptosis tiene lugar en G2. La apoptosis se ve favorecida al incrementar la dosis de irradiación y, por lo tanto, el daño en su ADN (38).

En resumen, a pesar de las diferencias comentadas, los hallazgos correspondientes a los controles positivos y los de chequeo del ciclo celular siguen líneas maestras semejantes en células vegetales y animales. La secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y de *Oryza sativa* y las herramientas moleculares hoy disponibles ponen a nuestro alcance la posibilidad de diseñar un diagrama de interacciones entre la maquinaria de chequeo de ciclo y la de reparación del ADN, por ejemplo, que era imposible hasta hace poco.

Los hallazgos sobre regulación negativa de la proliferación han desembocado en el modelo actual de ciclo, en el que se integra la existencia de un acelerador o mecanismo mitogénico, que favorece el avance de la célula en el ciclo y, superpuesto a él, rutas de chequeo que frenan transiciones irreversibles concretas en situaciones de riesgo. La caducidad de estas rutas suele llevar al desarrollo de inestabilidad genómica en una fracción de las células inicialmente frenadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a doña Margarita Carrascosa y a don José Luis Marcilla su valiosa ayuda y apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo. Agradezco también la financiación de la actividad del grupo que dirijo, en los últimos tres años, a la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto BMC2001-2195).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LOHKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*⁺. *Cell* 54: 433-439.
- (2) SHIMOTOHNO, A.; MATSUBAYASHI, S.; YAMAGUCHI, M.; UCHIMIYA, H.; UMEDA, M. (2003) Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 534: 69-74.
- (3) FABIAN-MARWEDEL, T.; UMEDA, M.; SAUTER, M. (2002) The rice cyclin-dependent kinase-activating kinase R2 regulates S-phase progression. *Plant Cell* 14: 197-210.
- (4) MARGULIS, L.; FESTER, R. (1991) Symbiosis as source of evolutionary innovation: Speciation and morphogenesis. *Symbiosis* 11: 93-111.
- (5) TORRES-ACOSTA, J. A.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; RAES, J.; MAGYAR, Z.; DE GROODT, R.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. (2004) Molecular characterization of Arabidopsis PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell. Mol. Life Sci.* 1: 1485-1497.
- (6) TSAKRAKLIDES, V.; SOLOMON, M. J. (2002) Comparison of Cak1p-like cyclin-dependent kinase-activating kinases. *J. Biol. Chem.* 277: 33482-33489.
- (7) VANDEPOELE, K.; REES, J.; DE VEYLDER, L.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S.; E INZÉ, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 903-916.
- (8) MENGES, M.; DE JAGGER, S. M.; GRUISSEM, W.; MURRAY, J. A. (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.
- (9) ZHANG, K.; LETHAM, D. S.; JOHN, P. C. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200: 2-12.
- (10) ORMENESE, S.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; DE GROODT, R.; DE VEYLDER, L.; INZÉ, D.; JACOMARD, A. (2004) Analysis of the spatial expression pattern of seven Kips related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 93: 575-580.

- (11) JOUBÈS, J.; CHEVALIER, C.; DUDITS, D.; HEBERLE-BORS, E.; INZÉ, D.; UMEDA, M.; RENAUDIN, J. P. (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 607-620.
- (12) MAGYAR, Z.; MÉSZÁROS, T.; MISKOLCZI, P.; DEÁK, M.; FEHÉR, A.; BROWN, S.; KONDOROSI, E.; ATHANASIADIS, A.; PONGOR, S.; BILGIN, M.; BAKÓ, L.; KONCZ, C.; DUDITS, D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9: 223-235.
- (13) XIE, Q.; SANZ-BURGOS, A. P.; HANNON, G. J.; GUTIÉRREZ, C. (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15: 4900-4908.
- (14) SÁNCHEZ, M. P.; TORRES, M. B.; GUTIÉRREZ, C.; VÁZQUEZ-RAMOS, J. M. (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50: 167-175.
- (15) BARROCO, R. M.; DE VEYLDER, L.; MAGYAR, Z.; ENGLER, G.; INZÉ, D.; MIRONOV, V. (2003) Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 401-412.
- (16) CHAUBET-GIGOT, N. (2000) Plant A-type cyclins. *Plant Mol. Biol.* 43: 659-675.
- (17) ITO, M. (2000) Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol.* 43: 677-690.
- (18) WEINGARTNER, M.; CRIQUI, M. C.; MÉSZÁROS, T.; BINAROVA, P.; SCHMIT, A. C.; HELFER, A.; DEREVIER, A.; ERHARDT, M.; BÖGRE, L.; GENSHIK, P. (2004) Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* 16: 643-657.
- (19) WEINGARTNER, M.; PELAYO, H. R.; BINAROVA, P.; ZWARGER, K.; MELIKANT, B.; DE LA TORRE, C.; HEBERLE-BORS, E.; BÖGRE, L. (2003) A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G₂-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J. Cell Sci.* 116: 487-498.
- (20) GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; WEINGARTNER, M.; BINAROVA, P.; CLARKE, D. J.; ANTHONY, R. G.; CALDERINI, O.; HEBERLE-BORS, E.; MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S.; BÖGRE, L.; DE LA TORRE, C. (2002). A topoisomerase II-dependent checkpoint in G₂-phase plant cells can be bypassed by ectopic expression of mitotic Cyclin B2. *Cell Cycle* 1: 187-192.
- (21) FURUNO, N.; DEN ELZEN, N.; PINES, J. (1999) Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J. Cell Biol.* 147: 295-306.
- (22) GARCÍA-HERDUGO, G.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E.; HIDALGO, J.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. (1974) Effects of protein synthesis inhibition during plant mitosis. *Exp. Cell Res.* 89: 336-342.
- (23) SONI, R.; CARMICHAEL, P.; SHAH, Z. H.; MURRAY, J. A. H. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.
- (24) DE VEYLDER, L.; SEGERS, G.; GLAB, N.; CASTEELS, P.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1997) The *Arabidopsis* CKs1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.* 412: 446-452.

- (25) PELAYO, H. R.; PINCHEIRA, J.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; CLARKE, D. J.; DE LA TORRE, C. (2003) p-53 Independent checkpoint control in a plant cell model. *Biol. Res.* 36: 381-388.
- (26) WEINERT, T.; HARTWELL, L. H. (1989) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322.
- (27) WALWORTH, N.; DAVEY, S.; BEACH, D. (1993) Fission yeast kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363: 368-371.
- (28) GARCÍA, V.; SALANOUBAT, M.; CHOISNEN, Y.; TISSIER, A. (2000) An ATM homologue from *Arabidopsis thaliana*: Complete genome organisation and expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 28: 1692-1699.
- (29) CULLIGAN, K.; TISSIER, A.; BRITT, A. (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1091-1104.
- (30) LAFARGÉ, S.; MONTANÉ, M. H. (2003) Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Res.* 31: 1148-1155.
- (31) GERHARD, J.; KIRSCHNER, M. (1979) Cells, embryos and evolution. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- (32) PÉREZ-TALAVERA, S.; CARBALLO, J. A.; DE LA TORRE, C. (2003) Lack of mitotic delays at the onset of proliferation in dormant root primordia challenged by ionizing radiation. *Biol. Plant. (Prague)* 46: 383-387.
- (33) RAMÍREZ-PARRA, E.; XIE, Q.; BONIOTTI, M. B.; GUTIÉRREZ, C. (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 27: 3527-3533.
- (34) PELAYO, H. R.; LASTRES, P.; DE LA TORRE, C. (2001) Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta* 212: 444-453.
- (35) SANTOCANALE, C.; DIFFLEY, J. F. X. (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395: 615-618.
- (36) GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DíEZ, J. L.; DE LA TORRE, C.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. (1971) Interphase development and beginning of mitosis in the different nuclei of polynucleate homokaryotic cells. *Chromosoma* 36: 100-111.
- (37) DEL CAMPO, A., GIMÉNEZ-MARTÍN, G., LÓPEZ-SÁEZ, J. F. y DE LA TORRE, C. (1997) Frailty of two checkpoint stages which prevent entry into mitosis and progression through early mitotic stages in higher plant cells. *Eur. J. Cell Biol* 74, 289-293.
- (38) CARBALLO J. A. (2003) Destinos alternativos de células proliferantes de plantas tratadas con radiación ionizante. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.
- (39) RIEDER, C. L.; COLE, R. W.; KHODJAKOV, A.; SLUDER, G. (1995) The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* 130: 941-948.
- (40) TAM, S. W.; BELINSKY, G. S.; SCHLEGEL, R. (1995) Premature expression of cyclin B sensitizes human HT1080 cells to caffeine-induced premature mitosis. *J. Cell Biochem.* 59: 339-349.