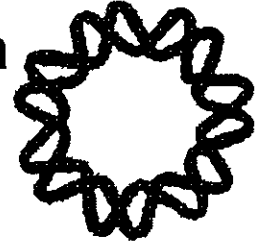




Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma
de México



00551

31

293045

**"Identificación y caracterización de proteínas
potencialmente relacionadas con la transducción de
señales, en el embrión de semillas maduras de
Phaseolus vulgaris"**

T E S I S

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Bioquímicas

presenta

Carolina San Román Roque

Cuernavaca, Mor., 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado, bajo la asesoría del Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez., del Departamento de Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la DGAPA IN-230399.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Marco A. Villanueva por darme la oportunidad de colaborar con su grupo de investigación, por su apoyo y dedicación en la realización de este proyecto, y por su gran contribución a mi formación académica.

Al comité tutorial:

Dr. Marco A. Villanueva Méndez.

Dra. Gladys I. Cassab López.

Dr. Lorenzo Segovia Forcella.

Al comité revisor:

Dr. Federico Sánchez Rodríguez.

Dr. Marco A. Villanueva Méndez.

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos.

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay.

Dr. Jorge Nieto Sotelo.

A todos los miembros del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En forma especial a los laboratorios de la Dra. Gladys Cassab, el Dr. Federico Sánchez y la Dra. Carmen Quinto por su apoyo con material, equipo y espacio para el desarrollo de este proyecto.

A la Unidad de Síntesis y Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología de la UNAM por su apoyo técnico.

A la Dra. Lourdes Blanco y la Dra. Helena Porta por facilitarme los bancos de cDNA y genómico de frijol.

A la Dra. E. Bearer por la donación de anticuerpos y material para la realización de este proyecto.

A CoNaCyT y DGEP, por el apoyo económico que me otorgaron durante la realización de la Maestría.

A todos los profesores del Instituto de Biotecnología, que cumplen la satisfactoria tarea de dedicarse a la docencia y la investigación.

A mis compañeros y amigos de laboratorio(s): Maru Campos, Claudia Díaz, Nacho Islas, Gloria Guerrero, Manuel Saucedo, Alejandro Vázquez, Tania Islas, Geo Ponce, Raúl Noguez, María Luisa Barroso, Dulce Pacheco, Miguel Villalobos, Edith García, Delpheena Eapen, Noreide Nava, Nelson Avonce, Josué Reyes, Yolo Sánchez, Gabriel Guillén, Rosy Figueroa, Rosario Luján y María del Rayo Sánchez.

A mis amigos incondicionales: Helios Herrera, Analilia Arroyo y Marielba Portillo.

A mi pequeña gran familia: mis abuelos Esthela y Alfredo, mi abuelo Adolfo, mis padres Julio A. y Luz Yolanda, mi hermano Julio, mi tía Espe, mis tíos Carmen y Mario, mi tía Lilia y mi primo Mario Alfredo. A todos gracias por la comprensión y cariño incondicional.

Especialmente gracias a Armando: por el apoyo moral, técnico y económico. Pero principalmente por el amor y la paciencia recibidos por casi cinco años.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
1 INTRODUCCION	2
1.1 Transducción de señales en plantas	2
1.1.1 Receptores	2
1.1.2 Segundos mensajeros	4
1.1.3. Cinasas de proteínas	5
1.2 Interacciones de las vías de señalización en plantas	6
1.2.1 Hormonas	8
1.2.2 Luz	9
1.2.3 Azúcares	9
1.2.4 Brasinoesteroides	10
1.2.5 Herida, defensa, estrés	10
1.2.6 Participación del citoesqueleto	11
2 ANTECEDENTES	13
2.1 Moléculas transductoras en animales	13
2.1.1 Dominios SH2	13
2.1.2 Dominios SH3	14
2.2 Grb2 en la transducción de señales	17
2.3 Señalización durante la embriogénesis y germinación de las semillas	19
2.4 Semilla madura de frijol como modelo de estudio	21
3 OBJETIVO	22
4 MATERIALES Y METODOS	23
4.1 Material biológico.....	23
4.2 Imbibición de ejes embrionarios de frijol	23
4.3 Extracción de proteínas solubles	23
4.4 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante	23
4.5 Electrotransferencia	24
4.6 Tinción con azul de coomassie	24
4.7 Concentración de proteínas	24
4.8 Cromatografía de intercambio aniónico	24
4.9 Cuantificación de proteína total	24
4.10 Precipitación de proteínas	25
4.11 Inmunodetección	25
4.12 Purificación de anticuerpos por inmunoabsorción	25
4.13 Ensayo de unión de las proteínas de 30 y 36 kDa a poli-L-prolina	26

4.13.1 Acoplamiento de poli-L-prolina a sefarosa activada con bromuro de cianógeno....	26
4.13.2 Ensayo de unión de las proteínas de 30 y 36 kDa a poli-L-prolina	27
4.14 Ensayo de unión a fosfotirosina de las proteínas de 30 y 36 kDa	27
4.15 Purificación de proteínas contenidas en geles de poliacrilamida	27
4.16 Extracción de DNA de plásmido	28
4.17 Amplificación del cDNA de Grb2	29
4.18 Amplificación de secuencias similares a Grb2 en distintas condiciones	29
4.19 Hibridación por northern blot	30
4.19.1 Obtención de RNA a partir de hojas de frijol	30
4.19.2 Transferencia del RNA del gel de agarosa a una membrana de nylon	31
4.19.3 Hibridación de sondas marcadas radioactivamente a ácidos nucleicos	31
4.20 Obtención de cDNA de hoja de frijol	32
4.21 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	32
4.22 Purificación de fragmentos de DNA contenidos en geles de agarosa	32
4.23 Marcaje radioactivo de una sonda de DNA	33
4.24 Obtención de DNA genómico de frijol	34
4.25 Hibridación por Southern blot	34
4.25.1 Separación de los fragmentos de DNA genómico	34
4.25.2 Transferencia del DNA del gel de agarosa a una membrana de nylon e hibridación con la sonda marcada	34
4.26 Titulación del banco genómico de frijol	35
4.27 Búsqueda en el banco genómico de frijol para aislar clonas con una secuencia similar a Grb2	35
4.28 Búsqueda en el banco de cDNA de hoja de frijol para aislar clonas con una secuencia similar a Grb2	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Identificación de una proteína de 30 kDa en ejes embrionarios de <i>G.max</i> y <i>P.</i> <i>vulgaris</i>	37
5.2 Amplificación de secuencias de DNA homólogas a Grb2 en <i>P. vulgaris</i>	37
5.3 Amplificación de secuencias de DNA homólogas a Grb2 en <i>G. max</i>	43
5.4 Detección de secuencias homólogas a Grb2 en <i>P. vulgaris</i> mediante análisis por northern	46
5.5 Detección de secuencias homólogas a Grb2 en <i>P. vulgaris</i> mediante análisis por Southern	46
5.6 Búsqueda de secuencias homólogas a Grb2 en los bancos de cDNA de hoja y genómico de <i>P. vulgaris</i>	46
5.7 Identificación de dos proteínas con anticuerpos anti-Grb2 en ejes embrionarios de semillas maduras	49

5.8 Inmunodetección cruzada con anticuerpos purificados contra Grb2 y la proteína de 36 kDa	49
5.9 Ensayo de unión a poli-L-prolina de las proteínas de 30 y 36 kDa	52
5.10 Ensayo de afinidad de las proteínas de 30 y 36 kDa a tirosinas fosforiladas.....	52
5.11 Enriquecimiento y separación parcial de la proteína de 36 kDa por cromatografía de intercambio aniónico	55
5.12 Secuencia parcial de aminoácidos de péptidos derivados de la proteína de 36 kDa	55
5.13 Inmunodetección de la proteína de 36 kDa en distintos tejidos de <i>P. vulgaris</i>	60
5.14 Inmunodetección de la proteína de 36 kDa en una cinética de imbibición de ejes embrionarios	60
5.15 Identificación y purificación de una proteína de 34 kDa con afinidad a fosfotirosinas	60
5.16 Secuencia parcial de aminoácidos de péptidos derivados de la proteína de 34 kDa	64
6 DISCUSION	65
6.1 Secuencias homólogas a Grb2 en <i>P. vulgaris</i>	65
6.2 Identificación de dos proteínas en embrión de frijol con distintos anticuerpos anti-Grb2	66
6.3 Ensayos de afinidad de las proteínas de 30 y 36 kDa a columnas de poli-L-prolina y fosfotirosinas	67
6.4 Purificación y secuencia parcial de aminoácidos de la proteína de 36 kDa	68
6.5 Análisis de la distribución de la proteína de 36 kDa en distintos tejidos y durante el inicio de la germinación en <i>P. vulgaris</i>	69
6.6 Purificación y secuencia parcial de aminoácidos de una proteína de 34 kDa con afinidad a fosfotirosinas	70
7 CONCLUSIONES	72
8 PERSPECTIVAS	73
9 REFERENCIAS	74

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
ABI 1	insensible a ABA 1
ABI 2	insensible a ABA 2
AMPc	adenosina 3': 5-monofosfato cíclico
ATP	adenosín-tri-fosfato
APS	persulfato de amonio
BCIP	5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato
BRI1	resistente a brasinoesteroides 1
BSA	albúmina de suero bovino
CDK	cinasa dependiente de ciclina
cDNA	ADN complementario
CDPK	cinasa de proteína con dominio similar a calmodulina
CK	cinasa de caseína
cpm	cuentas por minuto
CTR1	gen de respuesta triple constitutiva 1
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOC	deoxicolato
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ERK	cinasa regulada por una señal extracelular
ERS	sensor de respuesta a etileno
ETR	receptor de etileno
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
g	gramos
GAI	insensible a ácido giberélico I
Grb2	proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2
GTP	guanilil-tri-fosfato
h	hora(s)
IP ₃	inositol (1,4,5) trifosfato
kDa	kilo daltones
Kb	kilo bases
LEA	proteína abundante en la embriogénesis tardía
LRR	repeticiones ricas en leucina
M	Molar
mA	miliamperios
MAPKs	cinasas de proteína activada por mitógeno
MAPKK	cinasa de MAPK
MEKK	cinasa de MAPK y ERK
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitro(s)
NBT	Nitro azul de tetrazolio
pb	pares de bases
PB	2.8 mM NaH ₂ PO ₄ , 7.2 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
PBS	140 mM NaCl, 2.8 mM NaH ₂ PO ₄ , 7.2 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
PBS-T	0.05 % Triton X-100, 140 mM NaCl, 2.8 mM NaH ₂ PO ₄ , 7.2 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHA-E	fitohemaglutinina eritroaglutinante-E
PKABA1	cinasa de proteína de ABA
P.M.	peso molecular

p/v	peso sobre volumen
RGA	represor de la vía de ácido giberélico
RLK	cinasa similar a un receptor
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
SH2	dominio con homología a Src 2
SH3	dominio con homología a Src 3
Sos	intercambiador de nucleótidos de guanina
Src	oncogen del sarcoma de rous
TAE 1X	0.04 M Tris-acetato, 1.0 mM EDTA
TCA	ácido tricloroacético
ufp	unidades formadoras de placas
VASP	fosfoproteína estimulada por vasodilatación
Vol	volumen
WASP	proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
v/v	volumen sobre volumen
~	aproximadamente
μg	microgramos
μl	microlitros

RESUMEN

El tema de la transducción de señales en plantas ha sido recientemente objeto de gran interés en los grupos de investigación. Los componentes de las vías de señalización se han identificado principalmente en sistemas animales, sin embargo, en sistemas vegetales se han realizado grandes avances en la identificación de moléculas involucradas en la transducción de señales. En el presente trabajo se describe la identificación y caracterización de proteínas potencialmente relacionadas con la transducción de señales en frijol. Los análisis tipo northern y Southern, sobre RNA de hoja y DNA genómico de frijol respectivamente, mostraron secuencias homólogas a una proteína adaptadora de la transducción de señales llamada Grb2. Las inmunodetecciones con anticuerpos anti-Grb2 en embriones de frijol mostraron la presencia de dos proteínas de 30 y 36 kDa. Debido a que la proteína Grb2 de animales se caracteriza por su afinidad a regiones ricas en prolina y tirosinas fosforiladas, se realizaron ensayos de afinidad a Poli-L-Prolina y fosfotirosinas; estos ensayos mostraron que las proteínas de 30 y 36 kDa no presentan afinidad por estas moléculas en las condiciones analizadas. Este resultado sugirió que las proteínas inmunodetectadas en frijol no eran homólogas de Grb2, por lo que se realizó la purificación y secuencia parcial de aminoácidos de la proteína de 36 kDa, para analizar su posible función. El análisis comparativo de las secuencias obtenidas, con las reportadas en el banco de datos sugirió que por lo menos hay cuatro proteínas diferentes en la banda correspondiente a 36 kDa. Una de éstas secuencias indicó cierta similitud con una región de 6 aminoácidos de una proteína cinasa c-Src de humano, la cual posiblemente corresponda con la proteína inmunodetectada con los anticuerpos anti-Grb2. Posteriormente se realizó la purificación y secuencia parcial de aminoácidos de una proteína de 34 kDa con afinidad a fosfotirosinas en embriones de frijol y el resultado indicó una similitud con una posible proteína relacionada con la desecación en *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos sugieren que posiblemente ambas proteínas se encuentren involucradas en la transducción de señales en frijol. La importancia de estos experimentos radica en el establecimiento de la existencia de estas proteínas, y sienta las bases para definir cómo participan diversas proteínas involucradas en la transducción de señales y el posible papel de las proteínas de 34 y 36 kDa en estos eventos durante la germinación en *Phaseolus vulgaris*.

I

INTRODUCCION

Una de las características más relevantes de las células es su capacidad de reaccionar ante los cambios que ocurren en su entorno y responder a modificaciones en el medio ambiente o a circunstancias específicas que resultan en la inducción de funciones particulares; para ello las células cuentan con diversos mecanismos que les permiten percibir señales físicas (luz, temperatura, presión, electricidad, etc.) o químicas (hormonas, neurotransmisores, H₂O, etc.) y traducirlas a una respuesta fisiológica específica.

Hasta el momento se ha establecido que, tanto las células animales como las vegetales cuentan con estructuras especializadas para la percepción de señales (Alberts *et al.*, 1994; Darnell *et al.*, 1995). Dichas estructuras generalmente están constituidas por proteínas receptoras ubicadas en los diferentes compartimentos celulares (Alberts *et al.*, 1994). Después de la unión a sus ligandos, los receptores transducen las señales hacia el interior de la célula donde estas producen interacciones entre el receptor y otras moléculas que llevan a las etapas subsecuentes del proceso. Generalmente la internalización de la señal concluye en el núcleo donde se modifica la expresión de grupos *particulares* de genes (Kretsinger 1990); normalmente éstos procesos son rápidos, sensibles y específicos, donde los elementos que participan en la respuesta regulan la intensidad del estímulo al promover o restringir la transducción de la señal generada.

En sistemas animales muchos de estos mecanismos se han estudiado en detalle, y se han logrado conocer muchos de los elementos que conforman las vías de transducción de señales, así como su interconexión con otros procesos celulares (Cohen *et al.*, 1995). Los sistemas vegetales no han sido estudiados tan ampliamente como los animales, pero se conocen algunas vías que parecen tener componentes análogos. Sin embargo, el hecho de que las plantas sean sésiles las obliga a afrontar los cambios en el medio ambiente mediante un programa de desarrollo genéticamente flexible; en consecuencia, también deben tener variaciones en sus mecanismos de transducción respecto a los de los animales. Entre los elementos comunes en los mecanismos de transducción de señales empleados por plantas y animales se encuentran, los segundos mensajeros, la fosforilación y defosforilación de proteínas, presencia de receptores, proteínas G, etc. (Bowler y Chuá 1994).

1.1 TRANSDUCCION DE SEÑALES EN PLANTAS.

1.1.1 RECEPTORES.

Para un crecimiento y desarrollo óptimo las plantas deben tener la habilidad de coordinar procesos complejos del desarrollo y al mismo tiempo detectar y responder a factores fisiológicos,

endógenos y ambientales. Las respuestas pueden ser clasificadas en cuatro eventos principales: percepción del estímulo; generación y transmisión de la señal y cambios subsecuentes en los procesos bioquímicos (Møller y Chua 1999). Los cambios bioquímicos en las células vegetales, en ocasiones se traducen a procesos como la división y diferenciación celular que pueden llevar a la formación de nuevas estructuras.

Para que estos procesos puedan ser ejecutados es necesaria la participación de moléculas receptoras y efectoras que transmitan la señal al interior de la célula. Las moléculas receptoras pueden estar ubicadas en la superficie de la célula, núcleo, pared celular o en el citosol (Trewavas y Malhó 1997). En algunos casos, como con el receptor del fitocromo, la amplificación de la señal puede iniciarse cuando el ligando se une al receptor y éste se dimeriza (Furuya y Schafer 1996); en éste tipo de receptores, con un dominio citoplásmico similar a cinasa, la dimerización puede resultar en una fosforilación intermolecular y ésta a su vez provocar un cambio conformacional en el receptor que le permita interactuar con otros componentes de la vía de señalización.

La mayoría de los receptores similares a cinasas (RLK, de sus siglas en inglés: Receptor Like Kinase) que se han descrito poseen dominios de cinasa de serina-treonina (Ser/Thr); tal es el caso de los receptores, ERECTA y CLAVATA 1 identificados en *Arabidopsis thaliana* que participan en la señalización célula-célula y en la proliferación celular en el meristemo apical y floral (Torii *et al.*, 1996; Trotochaud *et al.*, 1999). Los receptores similares a cinasas se han dividido en 4 subclases que incluyen: el grupo con repeticiones ricas en leucina (LRR, de sus siglas en inglés Leucine-Rich Repeat), involucrados en mediar la interacción proteína-proteína; el grupo del dominio S, cuyos miembros tienen un dominio extracelular relacionado con la glucoproteína del locus-S en especies de *Brassica*; el grupo del dominio similar a lectina, cuyo dominio extracelular está relacionado con las lectinas de leguminosas y la proteína Lec 2 de *Arabidopsis thaliana*; y finalmente el grupo de receptores que poseen un dominio extracelular con secuencias repetidas relacionadas al factor de crecimiento epidérmico en mamíferos, aunque su función en plantas aún no está muy clara (Hardie 1999).

Algunos receptores pueden interactuar directamente con miembros de la familia de GTPasas como son las proteínas G (Lin *et al.*, 1996). La interacción de la GTPasa con el complejo ligando-receptor permite a la enzima unir GTP y activarse para posteriormente a su vez activar a otras moléculas o enzimas, ésta actividad en las GTPasas incrementa la flexibilidad en la vía de transducción de señales. En *Arabidopsis* hay evidencias que sugieren la presencia de una GTPasa tipo Rho en un complejo de señalización que incluye a las proteínas CLAVATA 1 y 3 en la formación del meristemo apical y floral (Trotochaud *et al.*, 1999).

Dentro de la familia de proteínas de unión a GTP reportadas en plantas se encuentran las proteínas G heterotriméricas, que se caracterizan por poseer tres sub-unidades (α , β , y γ). En su

forma inactiva las subunidades β y γ forman un dímero estable que en conjunto con la subunidad α permanecen asociadas al receptor. La unión de un ligando extracelular al receptor altera la conformación del receptor, el cual promueve su asociación con la proteína G heterotrimérica; el receptor cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , por lo que ésta queda en forma activa y se disocia del dímero G $\beta\gamma$. Tanto el dímero G $\beta\gamma$ como la subunidad α pueden interactuar por separado con moléculas efectoras que se encuentran debajo en la cascada de señalización. La inactivación del mecanismo ocurre por la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α , la cual en su forma inactiva se vuelve a unir al dímero y en consecuencia al receptor (Peskan y Oelmüller 2000).

1.1.2 SEGUNDOS MENSAJEROS.

Cuando las células vegetales reciben una señal, el compartimento citoplásmico recibe esta información a través de cambios en la concentración de segundos mensajeros, cuya producción es regulada por la activación de proteínas G, fosfolipasas, ciclasas y canales iónicos. Entre los segundos mensajeros que se han identificado se encuentran el ácido fosfatídico, IP₃ (inositol (1,4,5) trifosfato), Ca²⁺, glutatión, peróxido de H, diacilglicerol, y radicales libres (Divecha e Irvine 1995; Trewavas y Malhó 1997). Actualmente se acepta que varios fosfolípidos pueden ser hidrolizados por las fosfolipasas y así generar segundos mensajeros como el IP₃ y el diacilglicerol; de hecho hay evidencias que sugieren la existencia de un mecanismo de señalización en plantas a través de fosfoinosítidos (Chasan 1995). También se ha reportado que el IP₃ induce la liberación de calcio de la vacuola y posiblemente otros organelos (Coté y Crain 1993). Algunos de estos segundos mensajeros como el calcio y los lisofosfolípidos pueden activar a proteínas cinasas, mientras que algunos como el IP₃, movilizan el calcio a través de la apertura de canales. Por otro lado, el IP₃ y otros fosfolípidos pueden unirse directamente a componentes del citoesqueleto para cambiar su conformación y función en la célula (Irvine y Cullen 1996).

Uno de los compuestos más ampliamente utilizado como mediador intracelular es el Ca²⁺, el cual se mantiene a una concentración de ~ 100 nM en el citosol, mientras que en el retículo endoplásmico y otros compartimentos puede alcanzar hasta 100 mM (Trewavas y Malhó 1997). Hay organelos como la mitocondria y el cloroplasto que poseen su propio sistema de señalización por calcio, el cual regula la respiración oxidativa y el ciclo de Calvin (Bush 1995). Cuando una señal abre, en forma transitoria los canales de calcio en alguna de las membranas, el calcio fluye hacia el citosol e incrementa en forma dramática su concentración local, con lo cual se modifica el comportamiento de las proteínas que responden al Ca²⁺ como la calmodulina y cinasas de proteína dependientes de calcio (CDPK, de sus siglas en inglés: Calmodulin-Like Domain Protein Kinases)

(Bush 1995; Harmon 1997). En las plantas el calcio desencadena una amplia variedad de respuestas entre las cuales se incluyen la proliferación celular (Kretsinger 1990), la respuesta gravitrópica (Bush 1995; Harmon 1997) y el control del volumen de la célula guarda en el movimiento estomatal (Blatt 2000).

El AMPc (adenosina 3': 5-monofosfato cíclico) es un segundo mensajero clave en los organismos vivos y se encuentra presente desde las bacterias hasta los mamíferos. El AMPc actúa a través de la modificación de la actividad de un grupo de enzimas conocidas como cinasas dependientes de AMPc (Darnell *et al.*, 1995). En las plantas la presencia y función del AMPc aún no es claro, debido principalmente a que las metodologías utilizadas para evaluar su presencia carecen de la sensibilidad necesaria (Bolwell 1995). Aunque el AMPc se presenta en muy baja concentración en la célula vegetal (0.5-15 pmoles por g de peso fresco) (Spiteri *et al.*, 1989), en algunos casos se ha observado que la adición de AMPc a extractos de plantas estimula la fosforilación de proteínas específicas (Sudhir y Munshi 1998).

1.1.3 CINASAS DE PROTEINAS.

Este mecanismo de amplificación de las señales se realiza a través de una familia de proteínas con actividad enzimática denominadas cinasas, las cuales son capaces de transferir el **fosfato y del ATP** a las proteínas sustrato. Estas enzimas realizan la modificación post-traducciona l a través de fosforilaciones, mecanismo que afecta la estructura de las proteínas así como su función (Huber y Huber 1995). Las cascadas de fosforilación en plantas están mediadas por tres grupos principales de cinasas: las cinasas de serina-treonina, que fosforilan a las proteínas en residuos de serina y treonina; las cinasas de tirosina que fosforilan en residuos de tirosina y recientemente las cinasas de dos componentes, que transfieren el grupo fosfato a un residuo de histidina-ácido aspártico (Chang 1996). Estas fosforilaciones son reversibles y están reguladas por fosfatasas específicas (Naoyuki *et al.*, 1994; Sun y Tonks 1994). Entre las proteínas que presentan actividad de cinasa se encuentran los RLK, los cuales transducen la señal a través de la activación de un dominio de cinasa; la gran mayoría de los RLK caracterizados en plantas hasta el momento, se autofosforilan en residuos de serina-treonina (Braun y Walker 1996; Hong-Yan y Gray 1997).

Las cinasas de proteínas con un dominio similar a calmodulina (CDPK), en las plantas constituyen una familia de enzimas cuya actividad de cinasa está regulada por la unión de calcio a sus dominios similares a calmodulina (Harper *et al.*, 1991). Las proteínas CDPK se han visto involucradas en la apertura de estomas en las células guarda de *Vicia faba* (Pei *et al.*, 1996), así como en la fosforilación de una acuaporina en nódulos de leguminosas (Lee *et al.*, 1995).

Otro grupo de cinasas de proteínas que inicialmente fueron identificadas como cinasas de serina-treonina son las cinasas de proteínas activadas por mitógenos, conocidas comúnmente como

MAPKs (de sus siglas en inglés: Mitogen Activated Protein Kinases). Este grupo de proteínas desempeñan funciones clave en la integración de múltiples señales intracelulares transmitidas por varios segundos mensajeros y por señales extracelulares tales como bajas temperaturas (Mizoguchi *et al.*, 1997), estímulos mecánicos (Mizoguchi *et al.*, 1993), estrés salino (Mizoguchi *et al.*, 1996) e inductores derivados de la pared celular (Zhang y Klessing 1998).

Principalmente en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* se han aislado varios cDNAs que corresponden a homólogos de MAPK, MAPKK y MAPKKK (Mizoguchi *et al.*, 1997; Nishihama *et al.*, 1995). En total el número de proteínas con actividad de MAPK que han sido identificadas en plantas es mayor que la cantidad reportada en animales y levaduras. Este hecho sugiere que la cascada de MAPKs puede desempeñar una amplia variedad de funciones. En la **Fig. 1** se describe el mecanismo de regulación de ésta familia de proteínas.

Dentro de las proteínas con actividad de cinasa encontradas en plantas se encuentran las cinasas de caseína (CK, de sus siglas en inglés Casein Kinase) y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK, de sus siglas en inglés Cyclin Dependent Kinase). Las primeras son enzimas multifuncionales que fueron identificadas utilizando caseína como sustrato, se dividen en dos subfamilias (cinasa de caseína 1 y cinasa de caseína 2) y ambas fosforilan residuos de serina y treonina (Hardie 1999). Por otro lado, las cinasas dependientes de ciclinas participan en fases clave **del ciclo celular**, se caracterizan por estar inactivas, excepto cuando se unen a una ciclina a través de interacciones que incluyen al motivo conservado PSTAIRE, presente en las CDK (Jeffrey *et al.*, 1995). En *Arabidopsis* se han clonado algunos genes que codifican para CDKs y se han realizado experimentos que indican que las cinasas dependientes de ciclinas están involucradas en la regulación del ciclo celular en plantas (Hardie 1999).

1.2 INTERACCIONES DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION EN PLANTAS.

En el pasado, las vías de señalización en plantas se veían como una continuación lineal, desde la percepción de la señal, a la subsecuente activación de los genes. Sin embargo los avances de los últimos años han mostrado que en las vías de señalización hay numerosas interacciones e intersecciones, donde las plantas deben integrar toda esa información para poder ejecutar la respuesta apropiada. En la mayoría de los casos la percepción de la señal termina en la inducción de genes blanco, cuya expresión tiene como consecuencia una respuesta fisiológica o a nivel del desarrollo. La activación de éstos genes generalmente ocurre por vías que tienen componentes en común en el inicio de la vía de señalización, pero que difieren en los componentes que están al final.

La mayoría de las vías de señalización en plantas parecen estar reguladas a través de mecanismos de represión, los cuales son liberados por la percepción de una señal; ésto permite que haya velocidad y precisión en la respuesta. Un ejemplo de incremento en la respuesta (sinergismo)

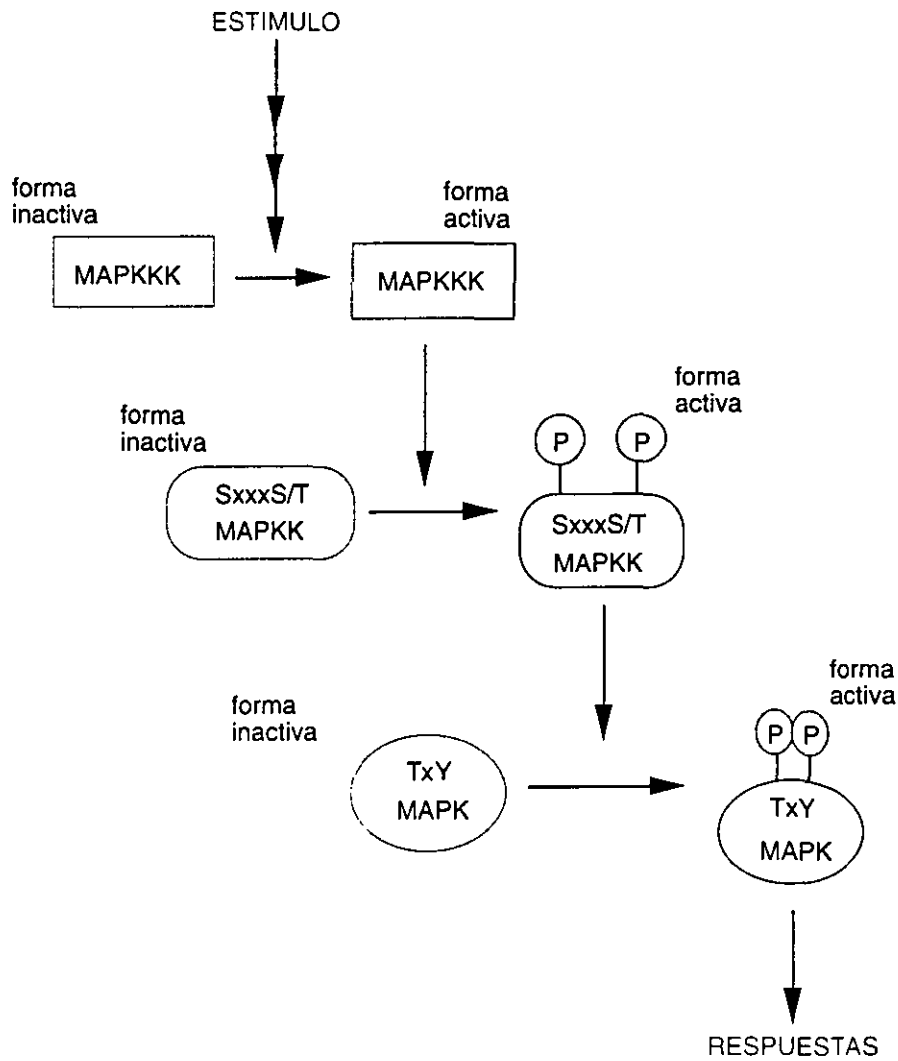


Fig. 1.- REGULACION POR FOSFORILACION DE LA CASCADA DE CINASAS DE PROTEINAS ACTIVADAS POR MITOGENOS (MAPK). Una MAPK defosforilada (inactiva) se activa por fosforilación de los residuos de treonina y tirosina en la secuencia TxY, la fosforilación es catalizada por una MAPK cinasa (MAPKK) localizada corriente arriba. Una MAPKK defosforilada (inactiva) se activa por fosforilación de los residuos de serina y treonina en la secuencia SxxxS/T; ésta fosforilación es catalizada por una MAPKK cinasa (MAPKKK) localizada corriente arriba. Tomado de Mizoguchi *et al.*, (1997).

entre dos vías es el efecto aditivo de la luz y citocininas sobre la inhibición de la elongación del hipocotilo en las semillas de *Arabidopsis* (Møller y Chua 1999). El efecto opuesto en la vía de señalización se presenta cuando hay una atenuación de la respuesta (antagonismo); un ejemplo es cuando ABA incrementa la expresión de la cinasa en serina-treonina PKABA1, la cual a su vez suprime la inducción de los genes de respuesta a ácido giberélico en células de la capa de la aleurona, en cebada (Gomez-Cadenas *et al.*, 1999).

A continuación se describen algunas evidencias de las interacciones en las vías de señalización, las cuales se han reportado en respuesta a diversos estímulos como: luz, azúcares, hormonas, desecación, etc. La mayoría de estos datos se han obtenido mediante el análisis de plantas transgénicas o mutantes (principalmente *Arabidopsis thaliana*), por lo que se han podido identificar algunos de los elementos que participan en la transducción de señales.

1.2.1 HORMONAS.

En *Arabidopsis* se clonaron dos genes (AXR1/TIR1), involucrados en la señalización por auxinas (Gray *et al.*, 1999), posteriormente se descubrió que estos genes también formaban parte de los componentes de la vía de ubiquitinación (Leyser *et al.*, 1993; Ruegger *et al.*, 1998); éste y otros experimentos sugirieron que posiblemente la vía de ubiquitinación se puede activar en respuesta a auxinas.

Acerca de las cascadas de señalización por ácido giberélico y citocininas se conoce relativamente poco, sin embargo se han identificado algunos de sus componentes. La similitud en la secuencia entre los genes que codifican para RGA (represor de la vía de ácido giberélico) y GAI (insensible a ácido giberélico) así como la presencia de repeticiones de leucina en éstas dos proteínas sugiere que pueden interactuar como un complejo regulatorio para reprimir la señalización por ácido giberélico en *Arabidopsis* (Møller y Chua 1999). También se ha observado que ésta hormona afecta diferentes categorías de MAPKs y CDPKs tanto a nivel transcripcional como traduccional (Sudhir y Munshi 1998).

Una de las vías de transducción de señales más estudiadas es aquella que se induce por etileno; en *Arabidopsis* se sabe que cuando el etileno se une a los receptores ETR y ERS, se rompe su interacción y se libera la cinasa CTR1 en su forma inactiva, esto permite la des-represión de moléculas (posiblemente MAPKs) que están abajo en la cascada de señalización y que pueden regular a elementos nucleares (EIN3 y EIL1-3), y éstos pueden entonces activar factores de transcripción (EREBP) que controlan la expresión de genes blanco (Møller y Chua 1999).

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal cuyos niveles son inducidos bajo diferentes condiciones de estrés abiótico como sequía, alta salinidad y bajas temperaturas. Se ha propuesto un modelo para la señalización de ABA, donde la unión de ésta hormona a un posible receptor inicia los eventos hacia abajo de la transducción de señales, lo cual permite la inactivación

de una fosfatasa que libera la represión de la vía de señalización. Se han identificado dos fosfatasas (ABI1 y ABI2) que inhiben la expresión de los genes en respuesta a ABA inducidos por Ca^{2+} (Møller y Chua 1999). Experimentos previos han propuesto que hay dos vías paralelas para la inducción genética en respuesta a estrés osmótico y ABA; una vía independiente de ABA y otra dependiente de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 1997). Sin embargo, hay evidencias de que ambas vías pueden interactuar para activar los genes que se inducen por estrés osmótico (Ishitani *et al.*, 1997).

1.2.2 LUZ

La luz provee a la planta, tanto de energía para la fotosíntesis, como de señales de información para optimizar el crecimiento y el desarrollo. Dentro de los fotoreceptores que perciben distintas longitudes de onda, los mejor caracterizados corresponden a los fitocromos como Phy A y Phy B. Aunque éstos fotoreceptores tienen distintas funciones durante el desarrollo de la planta, se sabe que hay interacción entre ambas vías. Experimentos de microinyección han mostrado que una posible proteína G heterotrimérica actúa como un componente arriba de Phy A en la transducción de señales (Bowler *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1993), y que por lo menos tres vías que involucran Ca^{2+} y/o GMPc, controlan la respuesta de Phy A después de interactuar con el complejo de proteína G (Møller y Chua 1999). La plasticidad en las respuestas durante la transducción de señales se debe en ocasiones a que una molécula puede estar involucrada en diferentes procesos un ejemplo de ello es la proteína HY5 que se ha relacionado con la señalización mediada por auxinas, como un regulador transcripcional en el proceso de desarrollo en el hipocotilo y raíz, y como un regulador positivo de la elongación celular en respuesta a la luz en *Arabidopsis thaliana* (Møller y Chua 1999). Esta proteína es un factor transcripcional que promueve la fotomorfogénesis a través de su unión a genes inducibles por luz y actúa dentro de un complejo de 150 kDa, posiblemente en conjunto con otros factores transcripcionales. Se ha sugerido que HY5 puede ser fosforilada por una cinasa de caseína II y de ésta forma ser regulada su actividad (Hardtke *et al.*, 2000).

1.2.3 AZUCARES

Recientemente se ha mostrado que los azúcares son moléculas importantes en la transducción de señales, principalmente por su interconexión con la vía de señalización por luz y hormonas. Se han identificado al menos 2 vías de señalización por azúcares: una de ellas regulada por la hexocinasa (Jang *et al.*, 1997), y la otra regulada por una proteína cinasa similar a SNF1 (Németh *et al.*, 1998). Los resultados que se han obtenido indican que la vía de señalización por etileno y la vía de señalización por azúcares funcionan de manera opuesta en la modulación de las etapas tempranas del desarrollo en plántulas de *Arabidopsis* (Møller y Chua 1999). Por otro lado,

en plántulas de la misma especie se ha observado que elevados niveles de azúcar, pueden suprimir la expresión de genes para la fotosíntesis (Sheen 1994).

1.2.4 BRASINOESTEROIDES.

Los brasinoesteroides son un tipo de hormonas que se encuentran en una amplia variedad de plantas y en diversos tejidos como: polen, hojas, flores, semillas y tallo, entre otras. La purificación química del brasinolido (componente activo de los brasinoesteroides con estructura esteroidea) ha permitido establecer la participación de ésta hormona en diversas respuestas fisiológicas como elongación de tejido vegetativo a muy bajas concentraciones, elongación reducida de la raíz, crecimiento del tubo polínico, termotolerancia e inducción de la biosíntesis de etileno (Stever y Mc Court 2001).

En algunas plantas, se ha visto que la inducción de la biosíntesis de etileno, puede inhibirse por luz. En la producción de etileno se ha reportado que los brasinoesteroides pueden actuar sinérgicamente con auxinas activas y Ca^{2+} . También se ha observado una acción sinérgica entre el ácido indolacético y los brasinoesteroides, debido a que ambos tienen un efecto similar. Por otro lado, se ha observado que los brasinoesteroides son poderosos inhibidores del crecimiento y desarrollo de la raíz (Davies 1995). Se han analizado un gran número de mutantes de *Arabidopsis*; inicialmente identificadas como mutantes en la señalización por luz y que posteriormente se observó que presentaban deficiencias en la biosíntesis de brasinoesteroides. Por lo tanto, se ha sugerido que hay una interacción entre la vía de respuesta a luz y la de brasinoesteroides (Ecker 1997). Con el objetivo de estudiar la vía de señalización mediada por brasinoesteroides, se han analizado mutantes insensibles a esta hormona. En estos experimentos se ha aislado el gen *bri1* y sus respectivos alelos. BRI1 codifica para una proteína similar a un receptor correspondiente a una familia de RLK del tipo de cinasas con repeticiones ricas en leucina. Este tipo de cinasas también se han encontrado en los genes ERECTA (Torii *et al.*, 1996) y CLAVATA 1 (Clark *et al.*, 1997) de *Arabidopsis*, por lo que se puede especular que BRI1 pudiera ser un receptor de brasinoesteroides en plantas (Møller y Chua 1999).

1.2.5 HERIDA, DEFENSA, ESTRES.

En las plantas el estrés por herida, estimula la síntesis del jasmonato, un derivado del ácido linolénico, el cual a su vez estimula la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas. En tabaco se ha reportado la presencia de proteínas de la familia de las MAPK (WIPK) que se activan por herida (Seo *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, la infección por patógenos genera dos vías de respuesta de defensa; una de las vías es mediada por ácido salicílico, mientras que la otra vía requiere la acción sinérgica de jasmonato y etileno. Cada una de las vías permite la activación de genes que confieren resistencia a patógenos específicos, y aunque actúan en forma independiente,

la vía dependiente de ácido salicílico es capaz de regular en forma negativa la vía de etileno y jasmonato. En respuesta al estrés por patógenos se han detectado genes que se activan específicamente por el producto de un gen de avirulencia (*avr*) presente en el patógeno fúngico *Cladosporium fulvum* (De Wit 1992). Los genes *avr* codifican para moléculas elicitoras que directa o indirectamente se unen a los receptores de la membrana plasmática vegetal. Se han detectado algunas moléculas que participan en éste proceso como las proteínas G, fosfatasa, H⁺-ATPasas (Vera -Estrella *et al.*, 1994a; Vera-Estrella *et al.*, 1994b), y cinasas en serina-treonina.

Hay numerosos casos en donde se incrementa la expresión génica o la actividad proteica en respuesta a algún tipo de estrés en forma específica. Por ejemplo, la aplicación de ABA exógeno resulta en la acumulación de una cinasa en serina-treonina (PKABA1) en hojas deshidratadas de plántulas de trigo (Holappa y Walkers-Simmons 1997).

Hong *et al.*, (1997) reportaron un receptor similar a cinasa con cuatro dominios diferentes que se induce por ABA, bajas temperaturas, estrés salino y deshidratación, lo cual sugiere que ésta cinasa probablemente tiene un papel en múltiples vías de señalización por estrés. También se sabe que la cascada de señalización por MAPK puede activarse por frío y desecación, vía factores de transcripción (Jonak *et al.*, 1996). La mayoría de estos procesos de señalización son regulados por fosforilaciones y defosforilaciones de proteínas específicas (Sudhir y Munshi 1998).

1.2.6 PARTICIPACION DEL CITOESQUELETO.

La dinámica del citoesqueleto está regulada por diferentes elementos que participan en la transducción de señales como el Ca²⁺, (McCurdy y Williamson 1991); las proteínas G (Takai *et al.*, 1995); lípidos (Grabski *et al.*, 1994); y algunas cinasas (Amano *et al.*, 1997). Recientemente se ha documentado la modificación de los componentes del citoesqueleto en respuesta a estímulos como el frío (Orvar *et al.*, 2000) y giberelinas (Wenzel *et al.*, 2000). Bogre *et al.*, (2000) reportó algunas evidencias de que las MAPK participan en la regulación del citoesqueleto y división celular, mientras que algunas proteínas de señalización dependientes de Ca²⁺ se unen de forma específica a regiones del citoesqueleto y pueden responder solo a cambios en la concentración de calcio que ocurren en la cercanía (Trewavas y Malhó 1997). El IP₃ y otros fosfolípidos pueden unirse directamente a componentes del citoesqueleto y cambiar su conformación y función (Irvine y Cullen 1996). La Fig. 2 muestra algunos de los elementos que están involucrados en la transducción de señales en plantas.

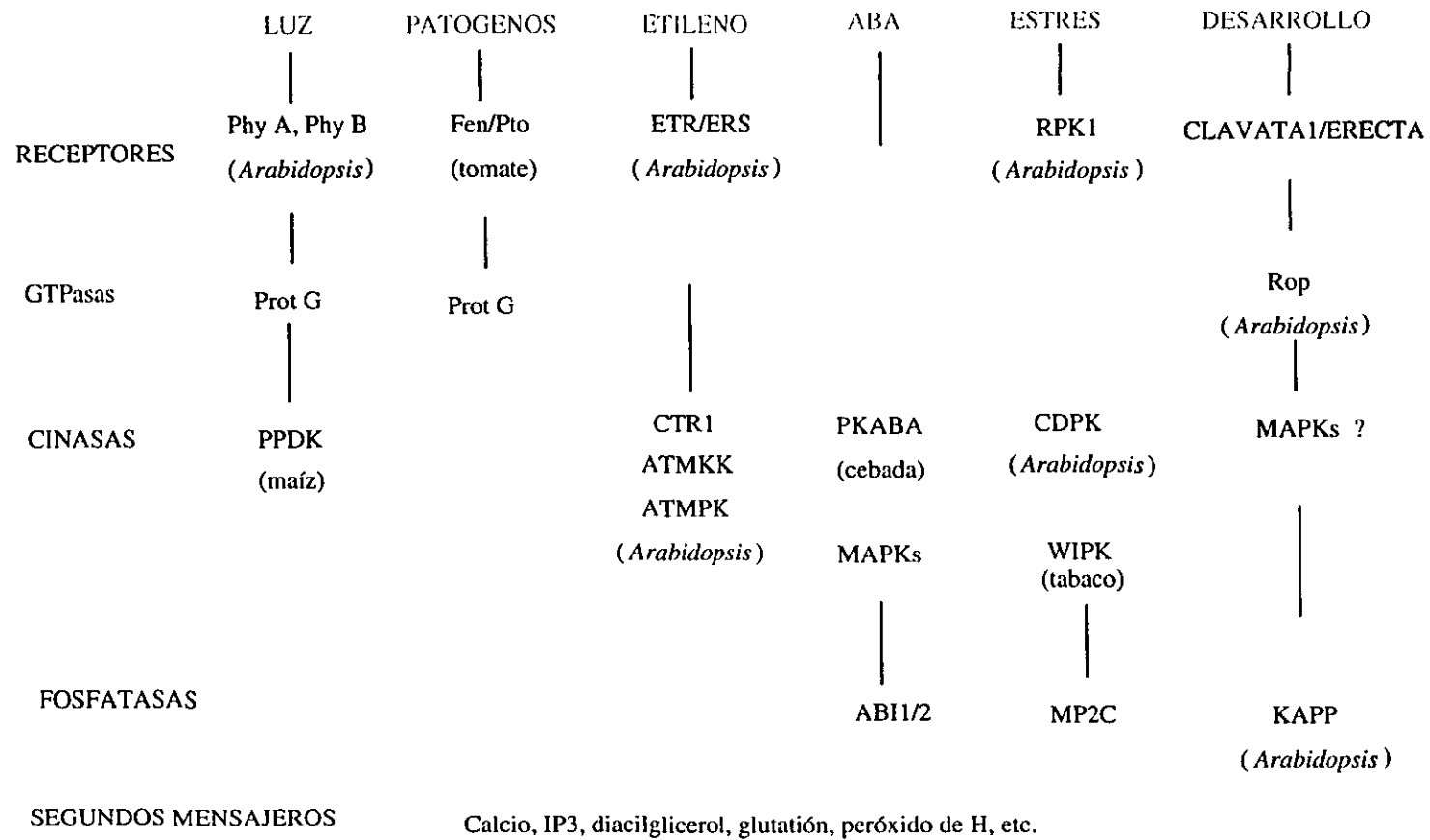


Fig. 2.- ELEMENTOS DE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES EN CELULAS VEGETALES. Este esquema muestra una parte de los componentes que se han descrito para algunas de las vías de señalización en plantas, entre los cuales se encuentran: receptores, GTPasas, cinasas, fosfatasas y la participación de segundos mensajeros.

II

ANTECEDENTES

2.1 MOLECULAS TRANSDUCTORAS EN ANIMALES.

Uno de los temas de interés del grupo de investigación donde se desarrolló este proyecto, ha sido la identificación de proteínas involucradas en la transducción de señales en la semilla madura y durante la germinación en *P. vulgaris*. El enfoque inicial del proyecto consistió en aislar el gen que codifica para una proteína adaptadora, homóloga a Grb2 en el embrión de frijol. En forma paralela, se inició la caracterización de dos proteínas presentes en el mismo tejido, con el objetivo de estudiar a los posibles elementos que participan en la transducción de señales en éste sistema.

A diferencia de los sistemas vegetales, en los sistemas animales se han caracterizado ampliamente muchos de los elementos que participan en la transducción de señales, y se han propuesto modelos que incluyen la participación de receptores, ligandos específicos, proteínas adaptadoras, fosfolipasas, proteínas G, cinasas, fosfatasas, factores transcripcionales, etc. (Schenk y Snaar-Jagalska 1999; Cary y Guan 1999). La unión de un ligando a un receptor de canal iónico permite que éste se abra y ocurra un cambio de potencial de membrana. Alternativamente, la unión de un ligando puede estimular una actividad enzimática intrínseca del receptor, o bien en la modulación de una proteína que transducirá la señal a través de cinasas de proteínas que, en interacción con segundos mensajeros, modularán la señal. Las modificaciones más comunes son a través de fosforilaciones y defosforilaciones, realizadas respectivamente por cinasas y fosfatasas específicas para residuos de serina, treonina y tirosina.

En muchos casos la transducción de señales está mediada por complejos específicos proteína-proteína. Comúnmente la formación de estos complejos está controlada por pequeños dominios modulares como aquellos que tienen homología a Src (SH2 y SH3), los cuales se encuentran en una gran variedad de proteínas animales (László 1999).

2.1.1 DOMINIOS SH2.

Los dominios SH2 son módulos proteicos de aproximadamente 100 aminoácidos, que están presentes en proteínas que participan y regulan vías de transducción de señales involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos (Pelicci *et al.*, 1992), fosforilación y defosforilación de tirosinas (Amrein *et al.*, 1993), activación de proteínas GTPasas tipo Ras, expresión genética, tráfico de proteínas y estructura del citoesqueleto (Pawson 1995). *In vitro* se ha demostrado que los dominios SH2 se unen a péptidos de 5 a 10 aminoácidos que contienen un residuo de tirosina fosforilado. La unión al fosfopéptido se lleva a cabo por dos regiones del dominio SH2. La

primera es una pequeña región de residuos básicos que contiene invariablemente una Arg, la cual forma un puente de hidrógeno con la tirosina fosforilada del sitio de unión. La segunda superficie de contacto tiene una secuencia más variable entre los dominios SH2, y reconoce los residuos que se encuentran inmediatamente hacia el carboxilo terminal de la tirosina fosforilada, por lo que se deduce que la secuencia que rodea a la tirosina fosforilada determina la especificidad de la unión del dominio SH2 y en consecuencia, a que vía (s) de transducción de señales corresponde(n).

2.1.2 DOMINIOS SH3.

Los dominios SH3 son módulos proteicos compuestos de aproximadamente 50 a 70 aminoácidos capaces de mediar interacciones proteína-proteína. Se encuentran en varias proteínas con actividades diversas, como algunas enzimas (fosfolipasa C y cinasas de tirosina), proteínas estructurales (del citoesqueleto), un conjunto de proteínas reguladoras (Proteínas G, GAP), y finalmente un grupo de proteínas adaptadoras (Crk, Grb2). Todas estas proteínas tienen en común su participación en procesos de la transducción de señales (Morton y Campbell 1994; Schlessinger 1994). Muchas de las proteínas que contienen dominios SH3 también poseen dominios SH2, PH y WW, lo que les permite un manejo más versátil de las conexiones específicas entre proteínas. Ensayos de unión demostraron que el sitio que reconoce el dominio SH3 es una región de 9 a 10 aminoácidos rica en prolinas; además con datos aportados por la estructura tridimensional de varios dominios SH3, se estableció que existían dos clases de sitios de unión para cada uno de los dominios SH3 de las proteínas p85 y Src (Chen *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1994). Estos dos tipos de sitios de unión permiten acoplar al ligando con el dominio SH3 en dos orientaciones diferentes, aunque los dominios SH3 tienden a seleccionar ligandos que unen en una sola orientación (Feng *et al.*, 1994).

Los dominios SH3 presentan diferentes afinidades por distintos sitios de unión y al parecer, la especificidad es conferida por las interacciones entre dos regiones del dominio SH3 que son de secuencia variable y se encuentran en los extremos de la región hidrofóbica principal que reconoce la región central del sitio de unión y los residuos del sitio de unión que no son prolinas. Hay muchos ejemplos de interacciones mediadas por dominios SH3 entre proteínas que participan en las vías de transducción de señales, algunas de ellas involucran las llamadas proteínas G pequeñas. Un ejemplo es la interacción del dominio SH3 amino terminal de la proteína Grb2, con el factor de intercambio de guanina Sos que modula la actividad de la proteína GTPasa Ras (Olivier *et al.*, 1993). La Fig. 3 muestra algunas de las proteínas reportadas en animales que presentan dominios SH2-SH3.

Aunque en las plantas no se han encontrado proteínas con dominios SH2-SH3; por medio del análisis de secuencias de aminoácidos en los bancos de datos, se pueden detectar algunas proteínas reportadas que presentan regiones similares a los dominios SH2-SH3 de sistemas

NOMBRE	ESTRUCTURA	TAMAÑO (kDa)	EXPRESION	MOLECULAS ASOCIADAS
Grb2		28	Ubicua	Cbl, LAT, Sos, HPK1, SLP-76, Shc, SHP2
Gads		40	macrófagos, plaquetas, células T y NK	LAT, SLP-76, Shc, HPK1
Nck		47	Ubicua	PAK, SLP-76, Sos, Cbl, WASP, IRS-1, NIK.
Familia Crk		28, 40, 42	Ubicua	Cbl, C3G, paxilina, Cas
BLNK		65	Células B y macrófagos	PLCγ-2, Btk, Nck, Vav, Grb2
Familia Cbl		120	Ubicua	Grb2, p85, Crk, SLAP, SykZap-70, BLNK
Grap		28	Linfocitos	LAT, Shc, Sos, Sam 68
Lnk		75	Linfocitos	Lck, CD3ζ
Shb		55, 66	Ubicua	LAT, p85, Src, CD3ζ, Grb2, PLCγ-1
Shc		46, 52, 66	Ubicua	SHIP, Grb2, RasGAP, Ig α/β, ZAP-70, CD3ζ
SLAP		34	Linfocitos	Zap-70, SLP-76, Cbl, Vav, CD3ζ

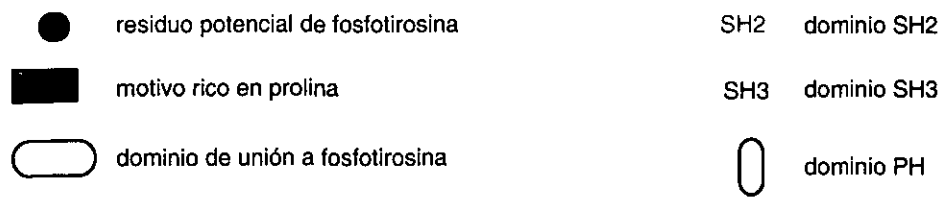


Fig. 3.- ESTRUCTURA SIMPLIFICADA DE ALGUNAS PROTEINAS ADAPTADORAS CON DOMINIOS SH2-SH3, INVOLUCRADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES EN SISTEMAS ANIMALES. Modificado de Tomlinson *et al.*, (2000).

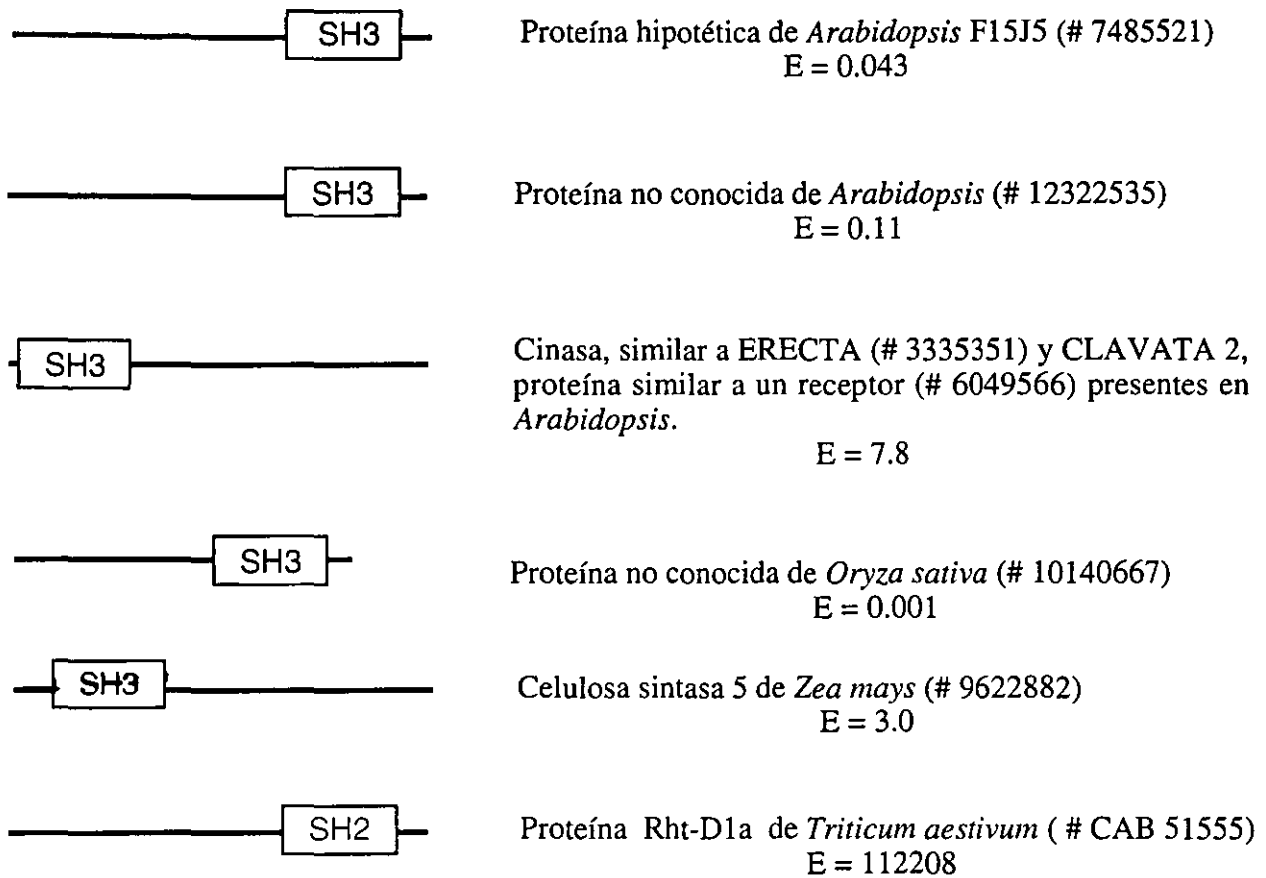


Fig. 4.- PROTEINAS REPORTADAS EN PLANTAS QUE PRESENTAN DOMINIOS SIMILARES A SH2-SH3. Datos obtenidos con el programa BLAST-P. Los porcentajes de identidad y similitud son, respecto a los dominios SH2-SH3 de Grb2. Los números de acceso para cada proteína están señalados entre paréntesis.

animales. En la Fig. 4 se presentan algunas proteínas vegetales que se reconocieron mediante análisis comparativos entre los dominios SH2 y SH3 de Grb2 y las secuencias reportadas en los bancos de datos de plantas.

2.2 GRB2 EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.

La proteína Grb2 tiene un peso molecular aproximado de 26 kDa y es uno de los miembros mejor caracterizados de la familia de las proteínas adaptadoras con dominios SH2-SH3. Hasta el momento, ésta proteína solo se ha identificado en sistemas animales, donde se aisló por primera vez utilizando el receptor del factor de crecimiento epidérmico como sonda sobre un banco de expresión de cerebro de humano; de ahí el nombre de Grb2 (de sus siglas en inglés: Growth Factor Receptor Bound 2) (Lowenstein *et al.*, 1992). El gen Grb2 de humanos tiene 5 exones y 4 intrones en 18 Kb, de los cuales solo 650 pb corresponden a la parte codificante. En sistemas animales se ha reportado el cDNA de Grb2 en distintos organismos (humano, *Xenopus*, ratón, y pollo), así como el gen completo en humano. Sin embargo, no hay reportes que señalen la presencia del gen o la proteína homóloga en plantas, aunque sí hay reportadas varias secuencias que codifican para proteínas que presentan dominios similares a SH2-SH3 en éstos organismos.

La estructura de Grb2 consiste de un dominio SH2 y dos dominios SH3 en los extremos. A través del dominio SH2, Grb2 puede interactuar con proteínas que poseen tirosinas fosforiladas, mientras que los dominios SH3 le permiten unirse a proteínas que poseen regiones ricas en prolina. Grb2 puede ser reclutada por los receptores que se localizan en la membrana plasmática, ya sea por mecanismos directos o indirectos. Los primeros ocurren por la interacción entre el dominio SH2 de Grb2 y la tirosina fosforilada de algunos receptores (ejem. EGF, receptor β adrenérgico); mientras que los mecanismos indirectos son por la unión del dominio SH2 de Grb2 y la tirosina fosforilada de una proteína (Shc y/o SHP) que a su vez se une al receptor (ejem. FGF, integrina β 4, PDGF) (László 1999). Mediante estos mecanismos, Grb2 participa como una proteína adaptadora que sirve de enlace entre las proteínas con actividad de tirosina cinasa y las moléculas blanco que se localizan debajo en la cascada de transducción de señales, incluso se ha propuesto un modelo donde se sugiere que la activación de la proteína Ras se debe a la interacción de la proteína Sos y Grb2 a través de los dominios SH3 de ésta última (Fig. 5). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que hay muchas otras proteínas como: dinamina, WASP, MEKK1, que pueden unirse a los sitios SH3 de Grb2 (László 1999). La participación de Grb2 se ha observado principalmente en procesos como la división celular, diferenciación, regulación del desarrollo embrionario, y de forma indirecta en los procesos de migración y proliferación celular (Cheng *et al.*, 1998; Cary y Guan 1999).

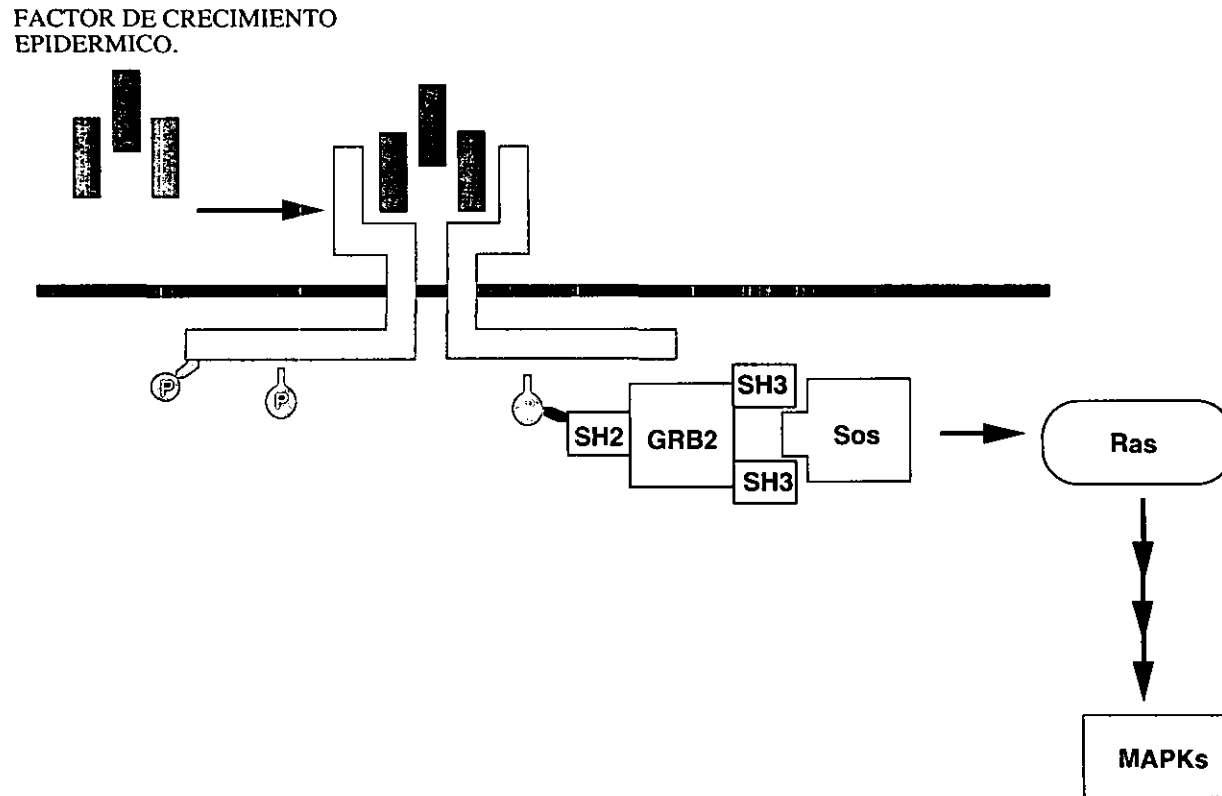


Fig. 5.- MODELO DE LA PARTICIPACION DE GRB2 EN LA VIA DE SEÑALIZACION MEDIADA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO, EN SISTEMAS ANIMALES. Se propone que cuando ocurre la interacción entre el factor de crecimiento epidérmico y el receptor específico, hay una autofosforilación del receptor. El dominio SH2 de Grb2 se une a la tirosina fosforilada, mientras que uno de los dominios SH3 interaccionan con la proteína Sos, y ésta a su vez favorece la activación de la proteína Ras mediante el intercambio del nucleótido GDP por GTP. Posteriormente la vía de transducción de señales continúa a través de la activación de cinasas (MAPK).

2.3 SEÑALIZACION DURANTE LA EMBRIOGENESIS Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS.

La embriogénesis en plantas superiores inicia con un evento de doble fertilización en el cual dos núcleos del esperma se fusionan con la célula huevo y el núcleo de la célula central respectivamente, para iniciar el desarrollo del embrión y el endospermo. En esta etapa, se expresa un gran número de genes, de una forma altamente coordinada, para asegurar que el cigoto se desarrolle en una estructura multicelular bien organizada, la cual podrá ser capaz de sobrevivir a la desecación, para posteriormente generar una plántula viable.

El proceso de embriogénesis puede dividirse en tres etapas: la etapa inicial o morfogenética, que se caracteriza por la división celular y el inicio de la diferenciación celular seguida de una etapa de maduración que involucra la acumulación de los principales productos de reserva. La tercera etapa comprende la preparación del embrión y la semilla para la desecación, dormancia y germinación (Meinke 1995). Un embrión maduro consiste de al menos cinco estructuras principales a lo largo de su eje apical-basal: el meristemo apical del brote, los cotiledones, el hipocotilo, la raíz y el meristemo apical de la raíz (Harada 1999) (Fig. 6).

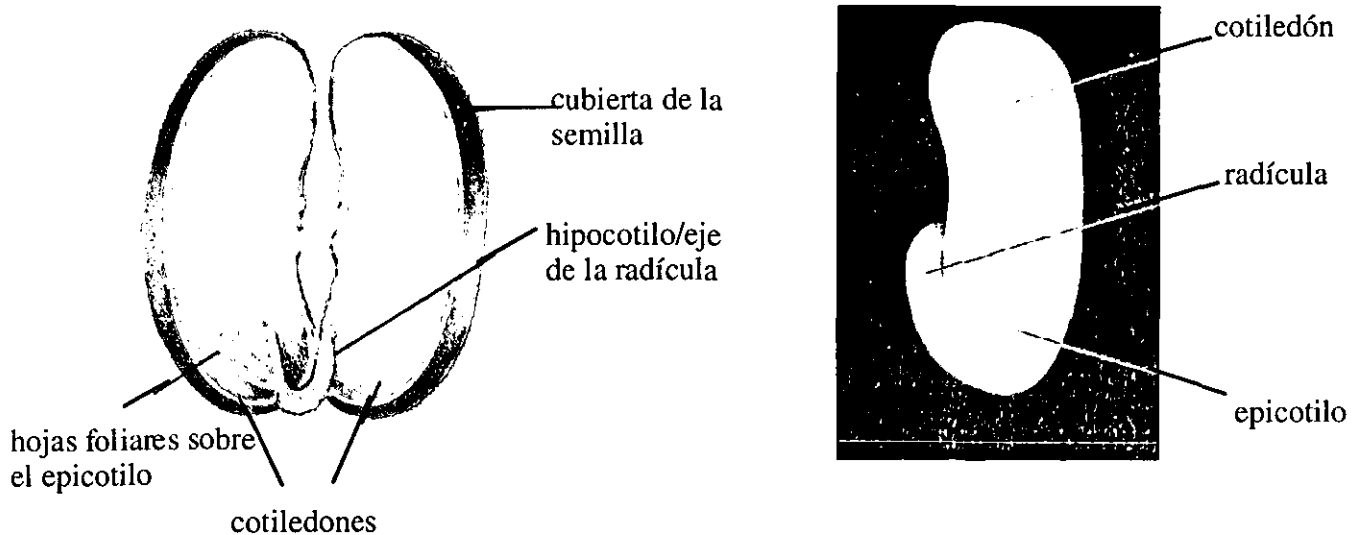


Fig. 6.- ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE *Phaseolus vulgaris* DESPUES DE HABER INICIADO LA GERMINACION. Adaptada de Moore *et al.*, (1998) y Mauseth (1998).

Por otro lado las células vegetales pueden iniciar el desarrollo del embrión sin fertilización, esto es, que pueden formarse directamente sobre la superficie de un tejido organizado, de segmentos de tallo, de protoplastos o bien a través de un paso intermedio de formación de callo o de cultivos en suspensión

Dentro de las evidencias que se han reportado en la transducción de señales, durante la embriogénesis se encuentran los estudios de el gen LEAFY COTYLEDON (*LECI*), cuyo producto es un regulador de la embriogénesis, debido a que mantiene el destino celular, la identidad del cotiledón, la iniciación y mantenimiento de la fase de madurez (Lotan *et al.*, 1998). Mutaciones en el gen PICKLE (*PKL*) de *Arabidopsis* revelaron que la señalización por ácido giberélico puede ser importante para controlar la embriogénesis. Estudios en trigo y *Brassica juncea* sugieren que las auxinas pueden estar involucradas en la formación del meristemo apical de la raíz y del brote (Harada 1999). Análisis recientes de genes necesarios para la formación del eje embrionario (MONOPTEROUS, HOBBIT) sugieren que la señalización entre distintas “regiones o dominios” embrionarios puede ser esencial para la formación de la raíz (Harada 1999), aunque se sabe que el destino celular generalmente está determinado por la posición (Szymkowiak y Sussex 1996).

La señalización en el ápice del brote parece ser importante en la especificación de la identidad del organo; mutaciones en *Arabidopsis* han mostrado que si se alteran ciertos genes que **participan** en la señalización durante la embriogénesis (*XTCI*, *AMPI*), se altera la identidad de las hojas de la plántula (Conway y Poething 1997).

Al término del proceso embriogénico, la semilla puede perder hasta el 95 % de agua, y en estas condiciones mantenerse en latencia (dormancia) hasta que inicie la germinación. La germinación es el período de desarrollo de la planta que abarca desde la captura de agua del suelo hasta la emergencia de la radícula. Las semillas contienen grandes cantidades de sustancias de reserva necesarias para soportar el crecimiento temprano de la plántula, estas sustancias son principalmente carbohidratos (almidón, hemicelulosas y amiloides); grasas y aceites (triacilglicerol, fosfolípidos, glicolípidos y esteroides), y proteínas (albúminas, globulinas, gluteolinas, prolaminas y zeatinas). Durante las primeras horas de haber iniciado la germinación, se desencadena la inducción del metabolismo y se activan procesos como la respiración, actividades enzimáticas, síntesis de RNA y proteínas, hidrólisis masiva de ácidos nucleicos, así como la activación del metabolismo en los organelos.

El inicio de la germinación se ha utilizado como modelo para identificar a los elementos que participan durante la señalización, debido principalmente a que éste es un proceso altamente dinámico que involucra procesos como la división celular, diferenciación y una alta actividad metabólica. Algunos de los elementos que se han identificado en éste proceso son los fosfoinosítidos y calcio, que probablemente tengan un papel importante en la expresión de α

amilasa inducida por giberelinas durante la germinación de arroz (Kashem *et al.*, 2000). También se identificó una fosfatasa ácida con actividad específica de fosfatasa de tirosina en la inducción de la germinación de lenteja (Sudeep y Veena 1998); la presencia de diferentes isoformas de fosfatasa ácida en semillas de soya se reportó recientemente por Ferreira *et al.*, (2000). Por otro lado, en las semillas maduras es característica la presencia de proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, de sus siglas en inglés: Late Embryogenesis Abundant), cuya expresión puede activarse en respuesta a ABA (Hsing *et al.*, 1995). Todos estos componentes reflejan claramente la intrincada red de eventos de transducción de señales, que ocurren durante la germinación.

2.4 SEMILLA MADURA DE FRIJOL COMO MODELO DE ESTUDIO.

El frijol se considera una planta de gran importancia económica en nuestro país, sus características nutricionales han favorecido su consumo, así como su comercialización debido a que es una planta de rápida germinación y las condiciones de cultivo permiten su fácil manejo. Es por ello que surge el interés de realizar investigaciones que contribuyan a un mejor conocimiento de los fenómenos biológicos y bioquímicos que se llevan a cabo durante la germinación de la semilla.

Este trabajo se ha enfocado en la semilla madura de frijol como un modelo que permite el estudio de dos proteínas involucradas en la transducción de señales; ésto se debe en primera instancia, a la baja actividad proteolítica encontrada en las semillas y por otro lado, a la relativa abundancia de ambas proteínas en el embrión. La semilla madura posee todos los elementos necesarios para iniciar los procesos de diferenciación y división celular durante la germinación; éstos componentes al estar presentes durante la maduración de la semilla permiten una correcta liberación hacia cada compartimento celular. La presencia de elementos de la transducción de señales en la semilla madura también ha sido descrito en *Arabidopsis* (Soderman *et al.*, 2000); cebada y arroz (Hayashi *et al.*, 2000).

De acuerdo a los antecedentes que se tienen en plantas y animales sobre los elementos que participan en la transducción de señales, en este trabajo se estudió la posible presencia de una proteína homóloga a Grb2, y de otras proteínas que pudieran estar participando en vías análogas de señalización durante la germinación en las semillas maduras de frijol.

III

OBJETIVO

Con base en los antecedentes ya mencionados acerca de la existencia de elementos de la transducción de señales en sistemas vegetales, nuestro objetivo es analizar la presencia y posible función de dos proteínas involucradas en la transducción de señales en la semilla madura de frijol.

*

IV

MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

En todos los experimentos se utilizaron embriones de semillas maduras de *Phaseolus vulgaris* L. variedad negro jamapa. Las semillas fueron desinfectadas con 10 % de cloro comercial, enjuagadas abundantemente con agua tridestilada y secadas a temperatura ambiente. La disección de los ejes embrionarios se realizó en forma manual para cada semilla y se utilizaron posteriormente para los análisis de imbibición y extracción de proteínas.

4.2 IMBIBICION DE EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL.

Se preparó una charola (esterilizada y con papel humedecido en agua estéril) donde se colocaron los ejes embrionarios. La charola se cubrió con papel aluminio y se incubó a 25°C en oscuridad. En los tiempos indicados en la cinética se colectaron aproximadamente 16 ejes embrionarios en imbibición, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C hasta completar 96 h.

4.3 EXTRACCION DE PROTEINAS SOLUBLES.

Se preparó una harina triturando los ejes embrionarios (secos o congelados), se incubó en agitación 10 minutos, en una solución: 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 (PB), en una relación de 16 mg de harina por cada ml de PB. La mezcla se centrifugó por 15 min a 20,000 x g para eliminar el material insoluble. Para la extracción de proteínas a partir de los cotiledones y los nódulos se siguió la misma relación de 0.2 g de tejido por cada ml de PB, mientras que para la extracción en las raíces, las hojas y las flores se utilizaron 0.3 g de tejido por cada ml de PB.

4.4 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE).

Las muestras de proteína se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (Ausubel *et al.*, 1989). Cada muestra de proteína se resuspendió en proporción 1:1 en una solución de 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4 % [p/v] dodecil sulfato de sodio (SDS), 20 % [v/v] glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol, 0.2 % [p/v] azul de bromofenol (Laemmli 2X) (Laemmli, 1970), e incubadas 5 min a 95°C. Las proteínas se separaron en un gel discontinuo de 12 % de acrilamida (11.676 % [p/v] acrilamida, 0.324 % [p/v] bis-acrilamida, 390 mM Tris pH 8.8, 0.1 % [p/v] SDS, 0.1 % [p/v] persulfato de amonio (APS), 0.04 % [v/v] TEMED). La parte

concentradora del gel consistió de 4.96 % [p/v] acrilamida, 0.14 % [p/v] bis-acrilamida, 130 mM Tris pH 6.8, 0.1 % [p/v] SDS, 0.1 % [p/v] APS, 0.1 % [v/v] TEMED (Laemmli, 1970).

La solución de corrida contiene 25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0.1% [p/v] SDS. Se cargaron en los pozos las muestras de proteínas y marcadores de peso molecular pre-teñidos (Bio Rad) y se corrieron a 20 mA durante 2 h.

4.5 ELECTROTRANSFERENCIA.

Después de que las proteínas se separaron, el gel se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C extra; Amersham), en el cartucho de una cámara de transferencia en semi-seco, con papel filtro debajo de la membrana y encima del gel. Posteriormente, se humedeció la cámara con solución de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris, 20 % [v/v] metanol) y se le aplicó una corriente inicial de 300 mA durante 1h (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1989). El proceso de electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección también es llamado western-blot.

4.6 TINCION CON AZUL DE COOMASSIE.

Una solución de azul de coomassie R-250 (0.1%) en agua:metanol:ácido acético glacial (5:5:2) se adicionó al gel y se incubó 1 h mínimo con agitación. Se destiñó 1 h con una solución de 50 % metanol, 10% ácido acético [v/v].

4.7 CONCENTRACION DE PROTEINAS.

En ocasiones fué necesario reducir el volumen en las muestras para facilitar su manipulación; para ésto se utilizó el método de concentrado por ultrafiltración y agitación en un sistema de presión (Amicon Inc., Beverly. MA). También se utilizaron concentradores con un sistema a base de centrifugación, segun las instrucciones del fabricante (Amicon, Millipore).

4.8 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO.

El sobrenadante obtenido de la extracción de proteínas solubles se pasó a través de una columna (5 ml) de DEAE-sefacel (Sigma). La columna se equilibró con 15 vol de PB y se adicionaron 3 ml del sobrenadante del extracto proteico diluído en 30 ml de PB. Después de lavar con 40 vol del mismo buffer, finalmente se eluyó con 50 ml de un gradiente lineal de 0 a 0.4 M NaCl en PB. Se colectaron \approx 30 fracciones de 1 ml que fueron concentradas por precipitación (descrito en 4.10) y analizadas por SDS-PAGE, e inmunodetección con anti-Grb2 para localizar el pico de elución de las proteínas de interés.

4.9 CUANTIFICACION DE PROTEINA TOTAL.

La concentración de proteína en cada extracto fué determinado de acuerdo al método de

Bradford (1976), que consiste en un ensayo colorimétrico para medir la concentración total de proteína. Cada muestra analizada se aforó a un volumen de 800 µl con agua y se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford, se agitó durante unos segundos, y después de 15 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras en una microcelda.

4.10 PRECIPITACION DE PROTEINAS.

En algunos casos se utilizó el método de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) que desnaturaliza las proteínas y deoxicolato (DOC), como acarreador para visualizar el precipitado. El TCA se adicionó a una concentración final de 7.6 % y DOC a 0.15 %; las muestras se incubaron a 4° C durante 1 h, y se centrifugaron a 14, 000 x g durante 15 min. Los precipitados se resuspendieron en buffer de Laemmli 2X.

4.11 INMUNODETECCION.

A los filtros de nitrocelulosa donde se transfirieron las proteínas se les adicionó la solución de bloqueo que consiste en 5 % [p/v] leche descremada en polvo disuelta en 0.05 % Triton X-100, 140 mM NaCl, 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 (PBS-T) y se incubaron 1 h a 50°C. Posteriormente, se les adicionó un anticuerpo policlonal anti-p30 (donado por la Dra. E. Bearer: Brown University, Providence, RI. USA) ó anti-Grb2 (Sta Cruz Biotechnology) diluído 1:2000 en PBS-T y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 15 min cada uno con PBS-T. Después se les adicionó un anticuerpo contra inmunoglobulina de conejo asociado a fosfatasa alcalina, diluído 1:5000 en PBS-T y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS-T y se revelaron en un buffer de 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 9.5 con 0.6 mM Nitro azul de tetrazolio (NBT) y 0.07 mM 5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato (BCIP), los cuales son los sustratos de la fosfatasa alcalina. La reacción enzimática produce una señal dada por la reacción química de la enzima y sus sustratos (Bio-Rad 1994). Para la inmunodetección con anticuerpos anti-profilina (amablemente proporcionados por el Dr. F. Sánchez, Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México) se utilizó una dilución del anticuerpo 1:5000. En el caso de la inmunodetección con anticuerpos anti-fosfotirosina (Zymed) se siguió básicamente la misma metodología, con una dilución del anticuerpo primario 1:300.

4.12 PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR INMUNOABSORCION.

Se corrieron extractos de plaquetas en un gel de 12 % de acrilamida con marcadores de peso molecular en los extremos. Después de la electroforesis éstos extractos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó una inmunodetección con anticuerpos anti-Grb2 (descrito

en 4.11). Esto se hizo solo con los carriles de los extremos, para utilizarlos como referencia para el resto de la membrana y poder cortar los segmentos de interés (proteína Grb2 de 26 kDa). Los fragmentos de membrana se bloquearon con 3% BSA en PBS, durante 1 h a 50°C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-Grb2 (1/10) en PBST durante toda la noche a 4°C. Se hicieron 5 lavados con PBST, y 3 lavados con PBS, durante 15 min cada uno. La solución fué drenada completamente y los anticuerpos se despegaron de la membrana, incubando los fragmentos con 200 µl de 50 mM HCl, pH 3 durante 5 min. Inmediatamente después, se adicionó 10 µl de 1M Tris pH 11.5, para neutralizar la solución. De los 210 µl obtenidos con el anticuerpo purificado, se utilizaron 100 µl para realizar una inmunodetección.

También se realizó la inmunopurificación de anticuerpos anti-Grb2, contra la proteína de 36 kDa presente en el embrión de la semilla. La metodología utilizada para su purificación fué la misma que se describió anteriormente, excepto que en el gel de acrilamida se corrió extracto de embrión de frijol.

4.13 ENSAYO DE UNION DE LAS PROTEINAS DE 30 y 36 KDa A POLI-L-PROLINA.

4.13.1 *Acoplamiento de poli-L-prolina a sefarosa activada con bromuro de cianógeno.*

La metodología utilizada fué, con base en una modificación del método de Lindberg *et al.*, (1988). Se utilizaron 2.5 g de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma, No. de catálogo C-9142), la cual se resuspendió en 30 ml de 10 mM HCl y se lavó en vacío con 75 ml de la misma solución. Posteriormente con el mismo sistema se lavó la resina con una solución de acoplamiento (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.0). Se centrifugó a 20,000 x g durante 30 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante sin dejar secar la resina. Posteriormente se disolvieron 60 mg de poli-L-prolina (P.M.(vis) 13,800) (Sigma, No. de catálogo P-2129), en 20 ml de PBS; ésta se adicionó a la resina y se incubó toda la noche a 4°C, en agitación. Se tomó una alícuota del sobrenadante antes y después de esta incubación para medir el porcentaje de acoplamiento de la poli-L-prolina a la resina, el cual se midió con base en la absorbancia de las muestras a 230 nm. El porcentaje de acoplamiento obtenido fué de 50 %. A partir de éste paso, todo el proceso se realizó a 4°C. Posteriormente, la resina se lavó por sedimentación (para eliminar los restos de poli-L-prolina que no se unió) con la solución de acoplamiento. El proceso se repitió 3 veces. Después se lavó 3 veces con una solución de bloqueo (0.7 M Tris, 0.8 M glicina, pH 8.0) para neutralizar los grupos activos remanentes en la sefarosa, y se incubó 3 h en ésta solución después del último lavado. Después, se realizaron 5 ciclos de lavado intercalando la solución de acoplamiento y 0.1 M CH₃CO₂Na, pH 4. Posteriormente se lavó con la solución A (60 mM PIPES, 2 mM MgCl₂ en PBS, pH 7.4), seguido de un lavado con 6M urea en 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Finalmente la

resina (1ml) se montó en una columna y se equilibró con 20 vol de la solución A.

4.13.2 Ensayo de unión de las proteínas de 30 y 36 kDa a poli-L-prolina.

Se realizó la extracción de proteína a partir de harina de embrión, en una relación de 16 mg de harina por cada ml de solución A (descrito en 4.3). Del sobrenadante obtenido, se tomaron 3 ml y se pasaron por la columna previamente equilibrada. Posteriormente se lavó la columna con 40 vol de la solución A y después se realizaron las eluciones, reportadas como selectivas para Grb2, profilina y VASP (Bearer *et al.*, 2000) con 3 ml de cada una de las siguientes soluciones: 5 mM Mg-ATP en solución A, seguido de una solución 0.3 M MgCl₂, 1mM EGTA, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (para liberar filamentos de actina). Enseguida se realizó una elución con 3 M urea en Tris-HCl, pH 7.4, y finalmente con 6 M urea en la misma solución. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por geles de 12 % de acrilamida teñidos con azul de coomassie y por inmunodetección con anticuerpos anti-Grb2.

4.14 ENSAYO DE UNION A FOSFOTIROSINA DE LAS PROTEINAS DE 30 y 36 KDa.

Se disolvieron y lavaron 250 mg de O-Fosfo_L-tirosina acoplada a agarosa (Sigma) en H₂O tridestilada, para eliminar la lactosa utilizada como estabilizador; posteriormente, éste material se montó en una columna (800 µl de resina) y se equilibró con 15 vol de una solución B (20 mM HEPES, 1 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1 mM ortovanadato de sodio, 0.1 mM pirofosfato de sodio (inhibidores de fosfatasas), pH 7.0). De las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico (fracc. 7-14), se concentró su vol (descrito en 4.7) hasta 1 ml y se mezcló con 1ml de la solución B. Esta muestra se pasó por la columna previamente equilibrada, y posteriormente se lavó con 40 vol de la solución B. La elución de las proteínas con afinidad a fosfotirosina se realizó con 3 ml de 1M KCl en solución B. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por geles de 12 % de acrilamida teñidos con azul de coomassie y por inmunodetección con anticuerpos anti-Grb2.

4.15 PURIFICACION DE PROTEINAS CONTENIDAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Las proteínas de 34 y 36 kDa, obtenidas de la columna de unión a fosfotirosina y de la columna de intercambio aniónico respectivamente, fueron analizadas por electroforesis en un gel de poli-acrilamida para una posterior purificación de la banda de interés. Para ésta purificación, se concentró el vol de las fracciones 1-2, de tres purificaciones independientes de la columna de fosfotirosina. Por otra parte se concentró el vol de las fracciones 1-6, de seis purificaciones independientes de la columna de intercambio aniónico. Ambas muestras fueron analizadas por separado en geles de 10 % acrilamida junto con marcadores de peso molecular. La electroforesis se

realizó de acuerdo a la técnica descrita en el punto 4.4, excepto que las soluciones fueron preparadas con H₂O grado HPLC (filtrada a través de una membrana de 0.22 µM), filtradas nuevamente y utilizadas a menos de tres días de su preparación. Todo el material fué lavado exhaustivamente y se incrementaron las condiciones de limpieza para evitar la contaminación por queratinas.

Al final de la electroforesis cada gel se tiñó con azul de coomassie (solo el tiempo necesario para visualizar las bandas) y desteñido con una solución de 50 % metanol, 10 % ácido acético. Las bandas correspondientes al peso molecular de las proteínas de 34 kDa (aprox. 7 µg) y 36 kDa (aprox. 5 µg) fueron cortadas del gel con una navaja nueva y se colocaron en un tubo eppendorf, posteriormente los fragmentos se lavaron 2 veces con 50 % acetonitrilo durante 3 min en agitación. Después de eliminar el exceso de líquido, la muestra se almacenó a -20°C. En forma paralela se cortaron fragmentos del mismo gel en donde se analizaron las muestras, a éstas se les aplicó el mismo tratamiento y se utilizaron como un control del "fondo" presente en el gel. Las muestras fueron enviadas a la Universidad de Harvard para obtener la secuencia parcial de aminoácidos de péptidos derivados de cada proteína.

4.16 EXTRACCION DE DNA DE PLASMIDO.

Para la obtención del DNA plasmídico donde se encuentra clonado el cDNA de Grb2, se inocularon 5 ml de medio LB (para 1 litro de medio: 10 g bacto-triptona, 5 g bacto-extracto de levadura, 10 g NaCl) conteniendo el antibiótico adecuado, con una colonia aislada y se incubaron a 37°C toda la noche con agitación vigorosa. Se tomaron 1.5 ml del cultivo, se pasaron a un tubo eppendorf y el cultivo se centrifugó por 1 min a 14, 000 x g. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µl de la solución I fría (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0). Después de incubar el tubo durante 5 min a 4°C, se adicionaron 200 µl de la solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 150 µl de la solución III fría (5 M KOAc), se mezcló suavemente por inversión y se colocó 5 min en hielo. Después de éste tiempo el tubo se centrifugó 15 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionó un vol igual de fenol-cloroformo, y se mezcló con ayuda de un agitador tipo vortex. Se centrifugó 1 min a 14, 000 x g y la fase superior se transfirió a un tubo nuevo. Se le añadieron un décimo de volumen de 3 M NaOAc y tres volúmenes de etanol, se mezcló con un vortex y se dejó el tubo a -20°C durante 20 min. Posteriormente se centrifugó 15 min a 14, 000 x g y se eliminó el sobrenadante. Una vez drenado el líquido se adicionó 1 ml de 70 % etanol para eliminar el exceso de sales y se volvió a centrifugar. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó con vacío. Finalmente la pastilla de

DNA se resuspendió en 50 µl de H₂O tridestilada estéril con 1 µl de RNasa H (1.6 U/µl, Boehringer) y se almacenó a -20°C.

4.17 AMPLIFICACION DEL cDNA DE Grb2.

Con base en el alineamiento de secuencias de cDNA reportadas para Grb2 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos complementarios a dos regiones del extremo terminal amino (Grb2-U, Grb2-I) y una del terminal carboxilo (Grb2-L).

Grb2 -U: 5' GCT-GAG-CTT-CAA-AAG-GGG-G 3' T_m 60°C.

Grb2 -I: 5' CAT-CCG-TGG-TTT-TTT-GGC-AAA 3' T_m 60°C.

Grb2 -L: 5' AAT-TGC-GGG-GAA-ACA-TGC-C 3' T_m 58°C

Las T_m se calcularon con el método: 2 (A+T)+ 4 (C +G).

Estos oligonucleótidos fueron seleccionados mediante el programa "OLIGO 4.0" como secuencias compatibles para ser utilizados como iniciadores en una reacción de PCR. La reacción de amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones:

*Platinum PCR mix	45 µl	(del paquete de PCR, Gibco-BRL)
oligo Grb2-U (5 mM)	1 µl	
oligo Grb2-L (5 mM)	1 µl	
DNA (50 ng/µl)	1 µl	(obtenido según la técnica descrita en 4.16)
aceite mineral	30 µl	

Las temperaturas empleadas fueron: desnaturalización: 5 min 95°C; alineamiento: 1 min 55°C; extensión 1.5 min 72°C.

4.18 AMPLIFICACION DE SECUENCIAS SIMILARES A Grb2 EN DISTINTAS CONDICIONES.

Amplificación a partir de cDNA de hoja de frijol.

*Platinum PCR mix	45 µl	(del paquete de PCR, Gibco-BRL)
oligo Grb2-U (5 mM)	1 µl	
oligo dT ₁₂ (100 ng/µl)	1 µl	
cDNA	1 µl	(obtenido según la técnica descrita en 4.20)
aceite mineral	30 µl	

Las temperaturas empleadas fueron: desnaturalización: 5 min 95°C; alineamiento: 1 min 50°C; extensión 1.5 min 72°C.

Amplificación a partir de un banco de cDNA de plántula de soya .

*Platinum PCR mix	45 µl (del paquete de PCR, Gibco-BRL)
oligo Grb2-I (5 mM)	1 µl
oligo Grb2-L (5 mM)	1 µl
DNA (40 ng /µl)	1 µl
aceite mineral	30 µl

Las temperaturas empleadas fueron: desnaturalización: 5 min 95°C; alineamiento: 1 min 48°C; extensión 1.5 min 72°C.

* 22 U/ml del complejo *Taq* DNA polimerasa-anticuerpo *Platinum Taq*, 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP y estabilizadores.

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM.

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de 1% de agarosa teñidos con bromuro de etidio (descrito en 4.21), posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar una hibridación tipo Southern (descrito en 4.25), e identificar a los productos de PCR que fueron complementarios al cDNA de Grb2 y así continuar con su aislamiento y purificación.

4.19 HIBRIDACION POR NORTHERN BLOT.

4.19.1 *Obtención de RNA a partir de hojas de frijol.*

Se pulverizó 1 g de tejido en nitrógeno líquido en un mortero; el tejido congelado se colocó en un tubo corex y se adicionaron 1- 1.5 vol de una solución de 20 mM MES, 20 mM EDTA, 8 M guanidina-HCl, 50 mM β-mercaptoetanol (después de esterilizar la solución); posteriormente se mezcló en un agitador tipo vortex y se adicionó 1 vol de fenol/cloroformo, nuevamente se agitó en vortex durante 1 min y se colocó en hielo. El tubo con la muestra se centrifugó a 7,000 x g durante 45 min a 4°C. Al final se tomó la fase superior y se colocó en otro tubo donde se le adicionó 1 vol de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a 4°C durante 1 h. Nuevamente se volvió a

centrifugar en las mismas condiciones durante 30 min, se lavó la pastilla con 70 % etanol y se centrifugó en las mismas condiciones pero solo por 5 min. Se decantó el sobrendante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de H₂O tridestilada estéril. Posteriormente se adicionaron 500 µl de 6 M LiCl, se mezcló por inversión y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó 15 min a 7,000 x g, la pastilla se lavó con 70 % etanol y se centrifugó nuevamente durante 7 min. Finalmente se resuspendió en 50-100 µl de H₂O tridestilada estéril y se tomó 1 µl para cuantificarlo en un espectrofotómetro. Se analizaron 3 µl en un gel de 1.2 % de agarosa teñido con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989) para comprobar la estabilidad del RNA.

4.19.2 *Transferencia del RNA del gel de agarosa a una membrana nylon (transferencia capilar).*

El gel se colocó encima de un soporte de vidrio cubierto con papel filtro (ADVANTEC, MFS 3MM), que se mantuvo en un depósito en contacto con una solución de SSC 10X. Encima del gel se colocó la membrana de nylon (del mismo tamaño del gel), evitando la formación de burbujas. Encima se colocaron tres capas de papel filtro (ADVANTEC, MFS 3MM) y varias capas de toallas de papel absorbente. Finalmente se colocó un objeto con un peso aproximado de 0.8-1 Kg, lo cual fomenta la transferencia por capilaridad.

Después de aproximadamente 12 h de transferencia, el RNA se fijó a la membrana con una solución de 0.05 M NaOH durante 5 min y finalmente se lavó con SSC 2X para quitar el exceso de NaOH.

4.19.3 *Hibridación de sondas marcadas radioactivamente a ácidos nucleicos inmovilizados*

La membrana de nylon con el RNA transferido se colocó en una solución de SSC 2X, y después se colocó en un tubo de acrílico donde se sumergió en una solución de:

20% SDS	3.5 ml
2M NaH ₂ PO ₄ (pH 7.2)	1.5 ml
0.5 M EDTA (pH 8)	20 µl
H ₂ O tridestilada	5 ml

El tubo se mantuvo en un horno de hibridación a 65°C con agitación durante 1 h (pre-hibridación). Posteriormente, se agregó la sonda marcada radioactivamente a la solución con el filtro, y se incubó durante 12 h a 55°C. Al término de éste tiempo se desechó o guardó la solución y el filtro se sumergió en una solución de SSC 2X, 0.1 % SDS a 55°C y se mantuvo en agitación durante 15 min. Posteriormente, se analizó la señal de radioactividad con un contador Geiger en la zona de hibridación, con respecto al resto de la membrana (para deducir si el "fondo" radioactivo interfiere con la señal). Si esto es así, se vuelve a lavar la membrana con una solución de SSC 1X,

0.1 % SDS a 55°C por 15 min. Cuando la señal de "fondo" persiste, se disminuye la concentración de SSC hasta 0.1X y se continúa con el proceso. Finalmente se lavó la membrana varias veces con una solución de SSC 2X y se cubrió con una película de plástico. La membrana se expuso en una película X OMAT, a -70°C durante 24 h aproximadamente.

4.20 OBTENCION DE cDNA DE HOJA DE FRIJOL.

Se tomaron 15 µl del RNA obtenido de acuerdo al método descrito en el punto 4.19.1, se adicionó 1 µl de DNAsa libre de RNAsa (1 U, Boehringer) y se incubó durante 15 min a 37°C. El tubo se colocó 15 min a 75°C e inmediatamente en hielo. Se midió nuevamente la concentración por espectrofotómetro. En un tubo nuevo se colocaron 5 µg de RNA, se adicionaron 2 pmoles de oligo dT y se aforó a 12 µl con H₂O tridestilada estéril. Se incubó a 70°C durante 10 min e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente, se adicionaron los siguientes reactivos del paquete M-MLV *reverse transcriptase* de Gibco-BRL:

4 µl 5X buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

2 µl 0.1 M DTT

1 µl 10 mM mezcla de dNTP's

1 µl inhibidor de RNAsa (40 U, Boehringer)

Se mezcló con cuidado y se incubó durante 10 min a 37°C. Después se adicionó 1 µl (200 U) de la enzima transcriptasa reversa M-MLV, se mezcló suavemente y se incubó 50 min a 37°C. La reacción se inactivó a 75°C durante 15 min, se adicionó 1 µl de RNasa H (1.6 U/µl) y se incubó durante 20 min a 37°C, finalmente se volvió a inactivar la enzima a 75°C durante 15 min y el cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

4.21 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.

Para este trabajo se utilizaron geles de 1 % de agarosa en buffer 0.04 M Tris-acetato, 1.0 mM EDTA (TAE 1X). La concentración utilizada de bromuro de etidio fué 0.5 µg/ml. Los geles se corrieron a 80 volts en cámaras de electroforesis horizontales con buffer TAE 1X.

4.22 PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA CONTENIDOS EN GELES DE AGAROSA.

Se cortó la banda de interés del gel de agarosa con una navaja nueva y se colocó dentro de

un tubo eppendorf. Posteriormente se procedió a separar el DNA del resto de los componentes del gel. Para ello se utilizó el paquete de *GENECLEAN* BIO-101 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El sobrenadante obtenido se llevó a un volumen de 100 μ l con H₂O tridestilada estéril y se continuó con la purificación, utilizando el paquete de *purificación de fragmentos de PCR* de Boehringer, hasta obtener el DNA en aproximadamente 50 μ l de H₂O tridestilada estéril.

4.23 MARCAJE RADIOACTIVO DE UNA SONDA DE DNA.

Para el marcaje radioactivo de sondas de DNA se utilizó el paquete de marcaje random primer (Amersham), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El fragmento de DNA utilizado fué el producto de la amplificación del cDNA de Grb2, el cual se purificó según la técnica descrita en el punto 4.22. Se tomaron aproximadamente 25 ng de DNA (templado), se aforó a 10 μ l con H₂O tridestilada estéril y se incubó durante 5 min a 95°C, inmediatamente después se colocó en hielo, donde se le adicionaron los siguientes reactivos:

cebador o primero	5 μ l
buffer 10X	5 μ l
H ₂ O	15 μ l
dATP	4 μ l
dGTP	4 μ l
dTTP	4 μ l
dCTP- ³² P (10 μ Ci)	2 μ l
enzima klenow	2 μ l

La reacción se incubó durante 3 h a 25°C y al término se midieron las cpm (cuentas por minuto); posteriormente, para eliminar la marca radioactiva no incorporada la reacción se aforó a un volumen de 100 μ l con H₂O tridestilada estéril, se adicionó un décimo de vol de 3 M NaOAc y 3 vol de etanol. Esta mezcla se incubó durante 30 min a -20°C y después se centrifugó 10 min a 14,000 x g. El sobrenadante radioactivo se eliminó de manera adecuada y la pastilla de DNA se lavó con 70 % etanol; después de drenar el líquido, se resuspendió en 50 μ l de 0.1 N NaOH. Nuevamente se midieron las cpm para cuantificar el porcentaje de incorporación de la marca radioactiva en el DNA.

4.24 OBTENCION DE DNA GENOMICO DE FRIJOL.

Se pulverizaron en un mortero, con nitrógeno líquido, 5 g de hojas de frijol. El tejido congelado se colocó en un tubo de polipropileno, el cual previamente se mantuvo a 65°C con 10 ml de buffer de extracción (1% sarcosil, 0.8 M NaCl, 0.022 M EDTA (pH8.0), 0.22 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.8 % CTAB, 0.14 M manitol), y se adicionaron 14 µl de β-mercaptoetanol e inmediatamente después 1 vol de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se volvió a incubar a 65°C durante 10 min con inversión ocasional. Durante este tiempo, el tubo se destapó periódicamente para evitar acumulación de presión debido al gas generado. Al término de éste tiempo se centrifugó a 11,000 x g durante 5 min a 4°C, se tomó la fase superior y se colocó en un tubo nuevo donde se adicionó 1 vol de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó en las mismas condiciones durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 ml de H₂O tridestilada estéril, posteriormente el volumen fué distribuido en tubos eppendorf, donde se adicionó 1 vol de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó 5 min a 14,000 x g. La fase superior se colocó en un tubo nuevo, éste paso se repitió varias veces. El DNA se precipitó durante 1 h a -20°C, con 1 décimo de vol de 3 M NaOAc y tres vol de etanol. Al final del tiempo se centrifugó 15 min a 14,000 x g, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de H₂O tridestilada estéril. Se le adicionó 1 µl de RNasa H (1.6 U/µl, Boehringer) y se almacenó a -20°C.

4.25 HIBRIDACION POR SOUTHERN BLOT.

4.25.1 Separación de los fragmentos de DNA genómico.

Se digirió una cantidad apropiada de DNA genómico de frijol con las enzimas de restricción *Eco* RI, *Hind* II y *Hind* III (aprox. 10 µg de DNA para cada digestión). Posteriormente fueron analizadas en un gel de 1 % de agarosa teñido con bromuro de etidio. Al terminar la electroforesis, se tomó una fotografía del gel en el transiluminador de luz ultravioleta junto con una regla como marca para ver la disposición de las bandas.

4.25.2 Transferencia del DNA del gel de agarosa a una membrana de nylon e hibridación con la sonda marcada.

El protocolo de transferencia y las condiciones de hibridación fueron las mismas que se utilizaron para el northern blot, excepto que la transferencia se realizó con una solución de 0.4 N NaOH y al final la membrana se lavó con una solución de SSC 2X. Después del proceso de hibridación y lavado, la membrana se expuso en una película X OMAT a -70°C durante 3 días en la hibridación con DNA genómico, y 30 min para las hibridaciones con los productos de PCR.

4.26 TITULACION DEL BANCO GENOMICO DE FRIJOL.

El banco genómico (amablemente proporcionado por la Dra. Helena Porta del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México), fué construído en el vector λ DASH II. El título obtenido en la primera amplificación del banco fué 3.2×10^9 ufp /ml.

En todos los experimentos de titulación, tamizado, y amplificación del banco, se utilizó la cepa *E.coli* MRA. La preparación de las células consistió en inocular 5 ml de medio LB, suplementado con 0.2 % maltosa y 10 mM $MgSO_4$ con una sola colonia de la cepa MRA, que se crecieron toda la noche a 30°C. Posteriormente, se ajustó la concentración celular a una D.O. de 0.5 y se centrifugaron durante 5 min a 3,000 x g, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 10 mM $MgSO_4$ para obtener 600 μ l de células con una D.O. de 0.5 por cada caja de 150 mm. Finalmente, el concentrado celular se guardó a 4°C, por un período menor a tres días. Se realizaron las diluciones del banco, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ; en medio SM (para 50 ml de medio: 0.01 % gelatina, 0.58 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 ml 1M Tris-HCl, pH 7.5). La infección de las células con los fagos se realizó en tubos eppendorf, adicionando 200 μ l del concentrado de las células en cada tubo, y un volumen estándar (menor de 100 μ l) de cada dilución del banco a cada tubo. Los tubos se mezclaron suavemente por unos segundos y se incubaron a 37°C durante 15 min sin agitación. Las células ya infectadas fueron mezcladas con agar suave (0.7 % de agarosa en medio LB) a una temperatura de 42°C, contenidos en tubos de ensayo. Posteriormente el agar suave se vació sobre cajas de Petri con medio de cultivo sólido (1.5 % agar en medio LB), cuidando de extender perfectamente el agar sobre toda la superficie del medio de cultivo. Las cajas se secaron e incubaron a 37°C durante 12 h.

4.27 BUSQUEDA EN EL BANCO GENOMICO DE FRIJOL PARA AISLAR CLONAS CON UNA SECUENCIA SIMILAR A Grb2.

Para la detección de clonas genómicas con secuencias similares a Grb2, se utilizó como sonda el producto de la amplificación del cDNA de Grb2, el cual se purificó y marcó en forma radioactiva (descrito en 4.22, 4.23). Inicialmente se plaquearon 3×10^5 ufp del banco genómico, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, de acuerdo a la siguiente metodología.

Con los datos de titulación del banco, se hicieron diluciones para plaquear 6 cajas de Petri de 150 mm con 5×10^4 ufp por cada caja. La dilución, infección y plaqueo se realizó como se describe en el protocolo de titulación de los fagos. Después de plaquear las células infectadas las cajas se incubaron 12 h a 37°C y después 2 h a 4°C. Por otro lado se cortaron membranas de

nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham) del mismo tamaño que la caja de Petri (8 membranas, 2 para cada caja). Posteriormente, se colocó una membrana en cada caja y se transfirió durante 2 min, y durante 4 min para el duplicado de la membrana. Durante éste tiempo se hicieron tres marcas en la membrana y medio de cultivo con una aguja estéril, de tal manera que las membranas quedaron perfectamente orientadas sobre el medio. Posteriormente, cada membrana se incubó en una solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) durante 2 min, luego se eliminó el exceso de solución en papel filtro y se colocó en una solución de neutralización (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0), después se sumergió 30 seg en 0.2 M Tris-HCl pH7.5 y finalmente en SSC 2X. Para fijar el DNA a las membranas se les dió un pulso de luz ultravioleta y se guardaron a temperatura ambiente.

Posteriormente, el DNA fijado a las membranas se hibridó con la sonda de DNA marcada radioactivamente, en las mismas condiciones utilizadas para la hibridación tipo Southern (descrita en 4.25). La exposición de las membranas en la película se realizó durante 3 días a -70°C . Este proceso de búsqueda se realizó en dos ocasiones.

4.28 BUSQUEDA EN EL BANCO DE cDNA DE HOJA DE FRIJOL PARA AISLAR CLONAS CON UNA SECUENCIA SIMILAR A Grb2.

Para la detección de clonas de cDNA con secuencias similares a Grb2, se utilizó la misma metodología descrita anteriormente para el banco genómico, con algunas modificaciones. El banco de cDNA de hoja (amablemente proporcionado por la Dra. Lourdes Blanco del CIFN de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México), se construyó en el vector λ Zap II. El título obtenido del banco sin amplificar fué de 6×10^9 . En todos los experimentos de titulación y tamizado del banco, se utilizó la cepa *E.coli* MRF'. De acuerdo al título del banco se hicieron diluciones para plaquear 4 cajas de Petri de 150 mm con 5×10^4 ufp por cada caja. Este proceso de búsqueda se realizó en dos ocasiones.

V

RESULTADOS

5.1 Identificación de una proteína de 30 kDa en ejes embrionarios de *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris*.

El interés inicial de nuestro grupo de trabajo fué la búsqueda de proteínas involucradas en la transducción de señales. En un principio nos enfocamos en la búsqueda de proteínas de unión a profilina en semillas maduras de *P. vulgaris*. Para ello utilizamos anticuerpos contra una proteína de 30 kDa (donados por la Dra. E. Bearer, Brown University), inicialmente identificada como una proteína de unión a profilina en plaquetas de humano (Bearer *et al.*, 1996). Posteriormente, la proteína de 30 kDa encontrada en plaquetas fué identificada como Grb2, una proteína adaptadora de la transducción de señales, y experimentos posteriores sugieren que no presenta una interacción directa con la profilina de plaquetas (Bearer *et al.*, 2000).

Los anticuerpos anti-p30 reconocieron en forma específica una proteína de 30 kDa en el eje embrionario de semillas maduras de frijol (**Fig. 7**, carril 4), aunque en un extracto total de semillas no se observó ninguna señal (**Fig. 7**, carril 3); lo cual demostró la presencia mayoritaria de ésta proteína en el eje embrionario. Posteriormente se realizó una inmunodetección con los **mismos anticuerpos** en extractos de eje embrionario de soya, donde también se detectó la presencia de una proteína de 30 kDa (**Fig. 8**, carril 2).

Con los resultados obtenidos en las inmunodetecciones con los anticuerpos anti-p30 en semillas de frijol y la información reportada por Bearer *et al.*, (2000), decidimos enfocar nuestro proyecto en la caracterización de una posible proteína homóloga de Grb2 en *Phaseolus vulgaris*. Para ello iniciamos la búsqueda de secuencias que pudieran codificar para esta proteína.

5.2 Amplificación de secuencias de DNA homólogas a Grb2 en *P. vulgaris*.

Inicialmente se generaron oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias homólogas a Grb2 en *P. vulgaris* por PCR. El diseño de éstos oligonucleótidos se realizó con base en las secuencias conservadas que hasta el momento se han reportado para el cDNA de Grb2 (Bochmann *et al.*, 1999; Suen *et al.*, 1993; Wasenius *et al.*, 1993; Lu y Mayer 1997); la **Fig. 9** muestra el alineamiento de éstas secuencias, así como la localización de las secuencias que codifican para los dominios característicos de Grb2 dentro del cDNA. Los oligonucleótidos Grb2-U, Grb2-L se diseñaron para amplificar una región de 577 pb (pares de bases) dentro del cDNA, mientras que los oligonucleótidos Grb2-I, Grb2-L fueron diseñados para amplificar una región de 453 pb (**Fig. 9**). Con los oligonucleótidos Grb2-U y Grb2-L se realizó la reacción para amplificar el DNA complementario (cDNA) de Grb2 como se especifica en Materiales y Métodos. Al analizar

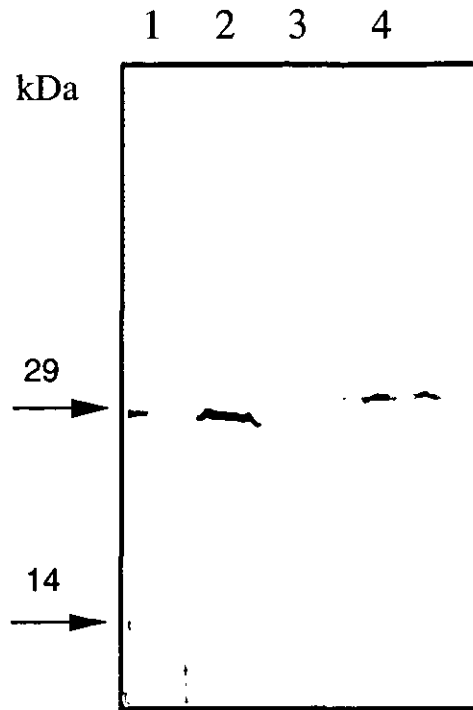


Fig. 7.- INMUNODETECCION DE UNA PROTEINA DE 30 kDa EN EL EJE EMBRIONARIO DE SEMILLAS MADURAS DE FRIJOL. Inmunodetección con anticuerpos anti-p30 obtenidos contra una proteína de plaquetas de humano (Bearer *et al.*, 1996). Los carriles corresponden a: marcadores de peso molecular (1); extracto de plaquetas como control positivo (2); extracto total de semillas maduras (3) y extracto de eje embrionario de frijol (4), donde p30 es claramente observable.

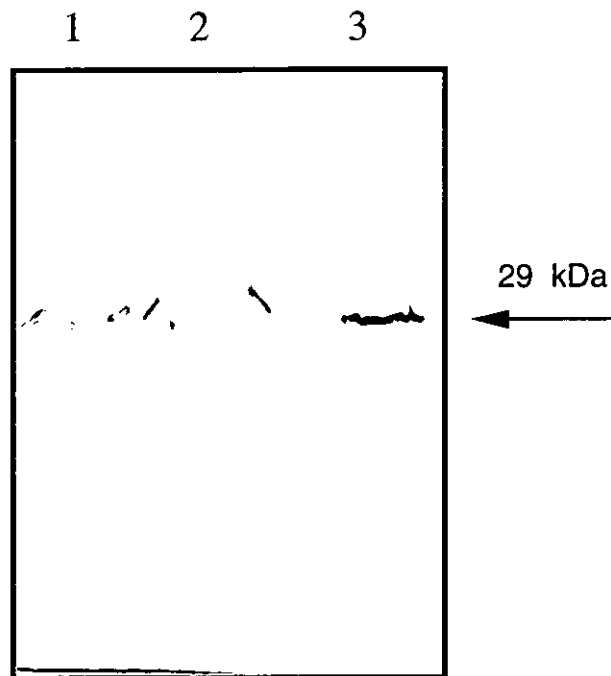


Fig. 8.- INMUNODETECCION DE UNA PROTEINA DE 30 kDa EN EJES EMBRIONARIOS DE *Phaseolus vulgaris* Y *Glycine max*. Inmunodetección con anticuerpos anti-p30, en extractos de ejes embrionarios de frijol (carril 1), ejes embrionarios de soya (carril 2) y extracto de plaquetas como control positivo (carril 3).

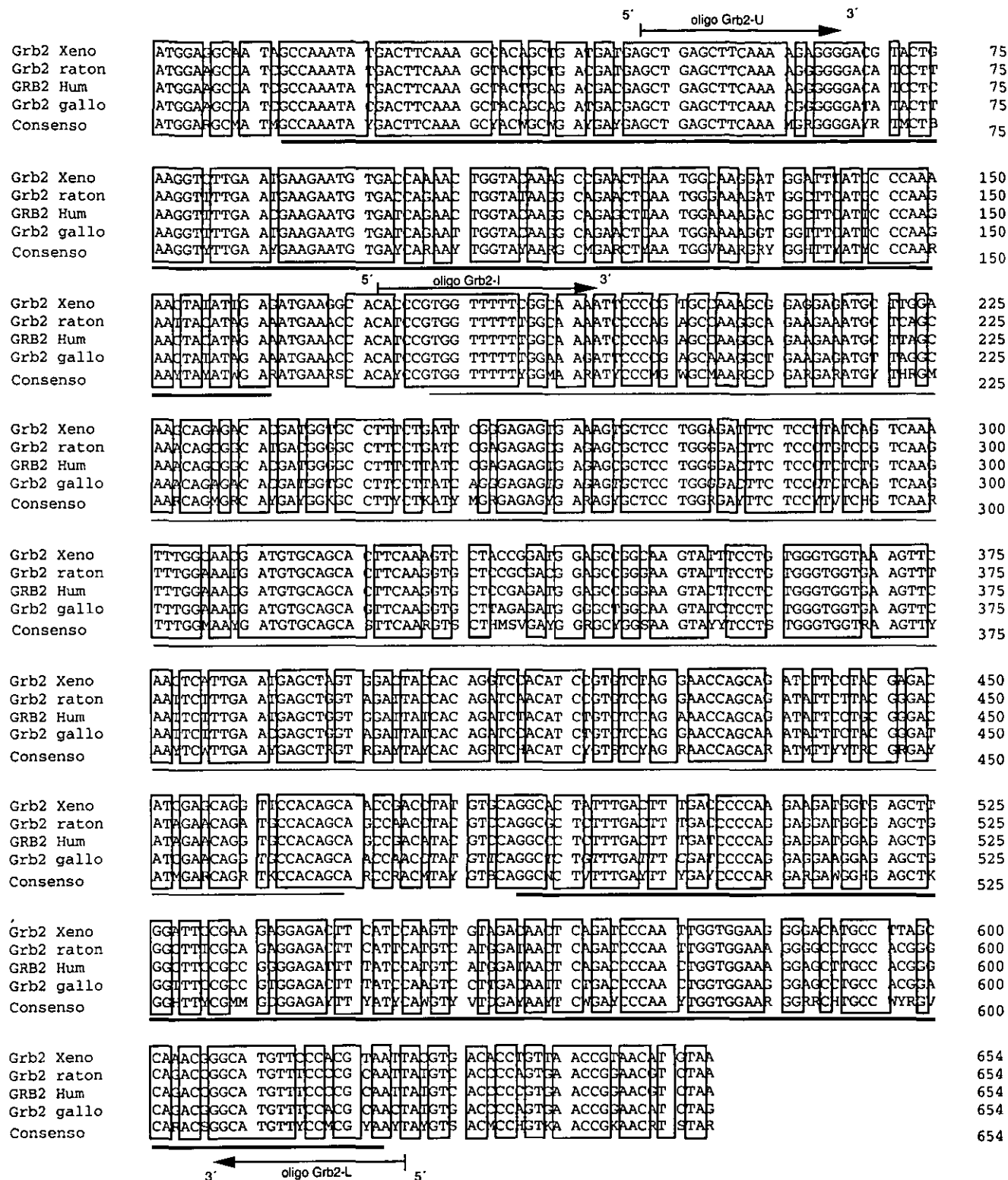


Fig. 9.- ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE cDNA QUE CODIFICAN PARA LA PROTEINA GRB2 EN DISTINTOS ORGANISMOS. Alineamiento de secuencias de cDNA que codifican para Grb2 en *Xenopus laevis* (Lu y Mayer 1997), *Mus musculus* (Suen et al., 1993), *Homo sapiens* (Bochmann et al., 1999) y *Gallus gallus* (Wasenius et al., 1993). Las líneas señalan las secuencias que codifican para los dominios SH3-1 (nucleótido 13-161); SH2 (nucleótido 177-469) y SH3-2 (nucleótido 486-622); los cuales son característicos de esta proteína. Las flechas indican las regiones complementarias a los oligonucleótidos sintéticos Grb2-U, Grb2-L y Grb2-I utilizados en la reacción de PCR.

el producto de PCR en un gel de agarosa, se identificó un fragmento del tamaño esperado de 577 pb (Fig. 10 A, carril 3). Este fragmento se purificó y marcó radioactivamente para, posteriormente utilizarse como sonda y control positivo en las hibridaciones tipo Southern (Fig. 10 B, carril 3).

Para lograr amplificar secuencias homólogas a Grb2 en *P. vulgaris*, se sintetizó cDNA a partir de RNA total de hoja de frijol en una primera reacción con la enzima transcriptasa reversa. El cDNA, se utilizó en una reacción por PCR para amplificar la secuencia comprendida entre el oligonucleótido Grb2-I y el oligo dT₁₂. La Fig. 10 A (carril 2) muestra el análisis del producto de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa. El resultado mostró un fragmento de aproximadamente 400 pb el cual corresponde con el peso molecular de la señal que se detectó en la hibridación con la sonda de Grb2 (Fig. 10 B, carril 2). Como control positivo de la reacción de RT-PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar una secuencia de acuaporina, presente en el cDNA de frijol (Fig. 10 A, 1). Posteriormente, éste fragmento se cortó y purificó para la obtención y análisis de su secuencia nucleotídica (Materiales y Métodos) (Fig. 11).

5'

```

1  ACAATTATTGGA GGAGGAGATTCT GTTGCAGCTGTG GAGAAAGTTGGA
   I T I I G G G D S V A A V E K V G
   GTTGCCAATGTC ATGAGTCACATA TCTACTGGTGGT GGTGCCAGTTTG
   V A N V M S H I S T G G G A S L
   GAGTTATTGGAA GGGAAAGAGCTT CCTGGAGTCGTT GCTCTTGATGAA
   E L L E G K E L P G V V A L D E
   GCCACACCAGTC CCTGTGTAAGAT AAGTGTCATCAT GGAAATTTTTCC
   A T P V P V Z D K C H H G N F S
   CATCCCAGTTGT CAGTGTGTCAA TCCTGTGAAAGA GCATATGTTGTA
   H P S C Q C C Q S C E R A Y V V
   GGACCATTCCGA GTCTGTTAGGTA AATTTAATCATG CTTGATTATTGG
   G P F R V C Z V N L I M L D Y W
   CTTCACTCATAA ATTGCGTGTAAC TGAAACACTGG CTGAAGCCATAA
   L H S Z I A C N C K H W L K P Z
   ATTCAAATAAAA TCCTTGAGTTAC TGG 333 3'
   I Q N K S L S Y W 121

```

Fig. 11.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del producto de RT-PCR generado con los iniciadores Grb2-I, oligo dT₁₂ en *P. vulgaris*. El análisis de la secuencia muestra un marco de lectura abierto de 333 nucleótidos que codifican para 121 aminoácidos.

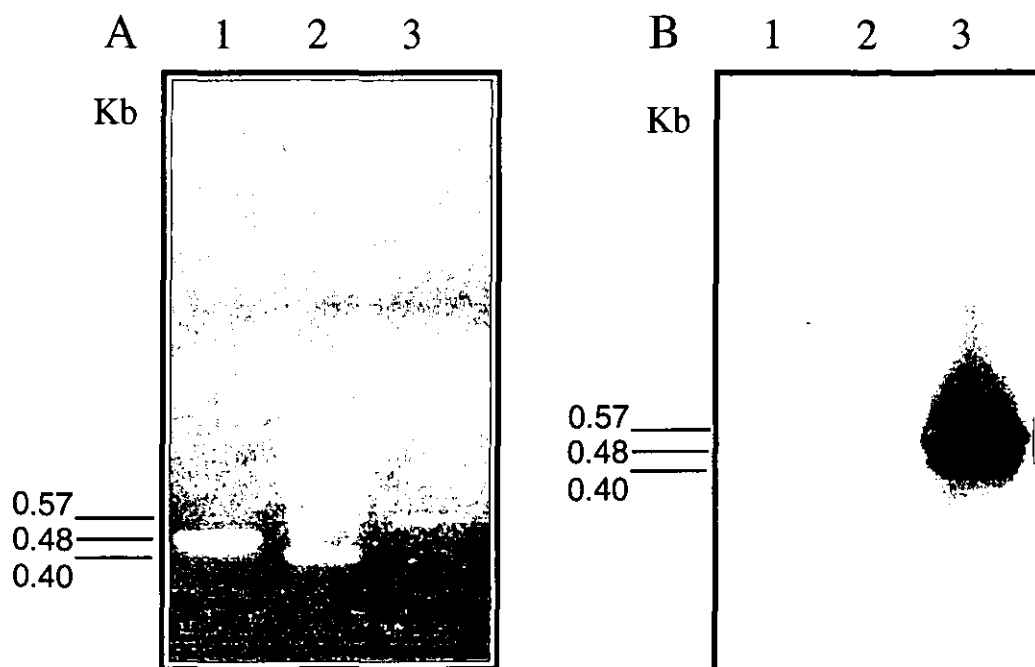


Fig. 10.- AMPLIFICACION DE SECUENCIAS HOMOLOGAS A GRB2 EN *P. vulgaris*. Electroforesis en gel de 1 % agarosa teñido con bromuro de etidio (A) e hibridación Southern equivalente (B), de los productos de la amplificación por PCR y RT-PCR. Un fragmento de aproximadamente 0.4 Kb, fué amplificado a partir de cDNA de hoja de frijol con los iniciadores Grb2-U, oligo dT₁₂ (carril A, 2). El fragmento de 0.57 Kb fué amplificado a partir del cDNA de Grb2, con los oligonucleótidos Grb2-U, Grb2-L. Este se utilizó como un control positivo de la reacción de PCR y de la hibridación Southern (carril 3). El producto de 0.48 Kb se amplificó como un control positivo de la reacción de RT-PCR, con oligonucleótidos específicos para una secuencia de acuaporina, presente en el cDNA de frijol (carril A, 1). En la hibridación tipo Southern se utilizó como sonda el producto de la amplificación del cDNA de Grb2, las condiciones de severidad utilizadas en los lavados fueron: SSC 2X, 0.1 % SDS; SSC 1X, 0.1 % SDS y SSC 0.5 X, 0.1 % SDS a 55 °C.

Al comparar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos codificados en este fragmento con las secuencias reportadas en el banco de datos, no se encontró similitud con Grb2 o con dominios SH2-SH3 reportados en la literatura. Sin embargo se encontró similitud con una región de la proteína fosfoglicerato cinasa 1 del mamífero *Macropus eugenii* (Fig. 12). Esta enzima participa en la vía glucolítica, gluconeogénica y fotosintética, aunque su función depende del organismo o tejido en que se encuentre. Dentro de los estudios realizados con la fosfoglicerato cinasa se ha reportado la acumulación de su transcrito, en condiciones de hipoxia en ratón (Firth *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996), mientras que en plantas, la acumulación de este RNAm se ha detectado en presencia de luz, en células de tabaco (Bringloe *et al.*, 1996). Debido a que este fragmento no tuvo ninguna similitud a Grb2, se siguió otro enfoque con la misma metodología.

```

1 TIIGGDSVAAVEKVGVANVM SHISTGGGASLELLEGGKELPGVVALD 47
   TIIGGGD+      K      ++SH+STGGGASLELLEGGK LPGV L+
369 TIIGGGDTATCCAkwntedKVSHVSTGGGASLELLEGGKVLPGVSTLN 403

```

Fig. 12.- Alineamiento entre la secuencia deducida de aminoácidos del producto de RT-PCR de *P. vulgaris* (arriba) y la proteína fosfoglicerato cinasa del mamífero *M. eugenii* (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia. El alineamiento indica 61 % de identidad y 71 % de similitud entre ambas secuencias. Datos obtenidos con el programa BLASTP, E = 0.026.

5.3 Amplificación de secuencias de DNA homólogas a Grb2 en *Glycine max*.

Con base en los experimentos realizados anteriormente donde se detectó la presencia de una proteína homóloga a Grb2 en ejes embrionarios de *G. max* (Fig. 8 carril 2), se decidió probar los oligonucleótidos diseñados para amplificar secuencias de DNA homólogas a Grb2. La amplificación por PCR se realizó a partir de un banco de cDNA de plántula de soya dentro de la secuencia comprendida entre el oligonucleótido Grb2-I y el oligonucleótido Grb2-L. En el análisis por electroforesis en gel de agarosa se detectó la amplificación de 4 bandas mayoritarias (Fig. 13 A, carril 2), de las cuales solo el fragmento de 450 pb mostró una señal significativa en la hibridación con la sonda de Grb2 (Fig. 13 B, carril 2). Esta banda se cortó y purificó para obtener y analizar su secuencia nucleotídica (Materiales y Métodos) (Fig. 14).

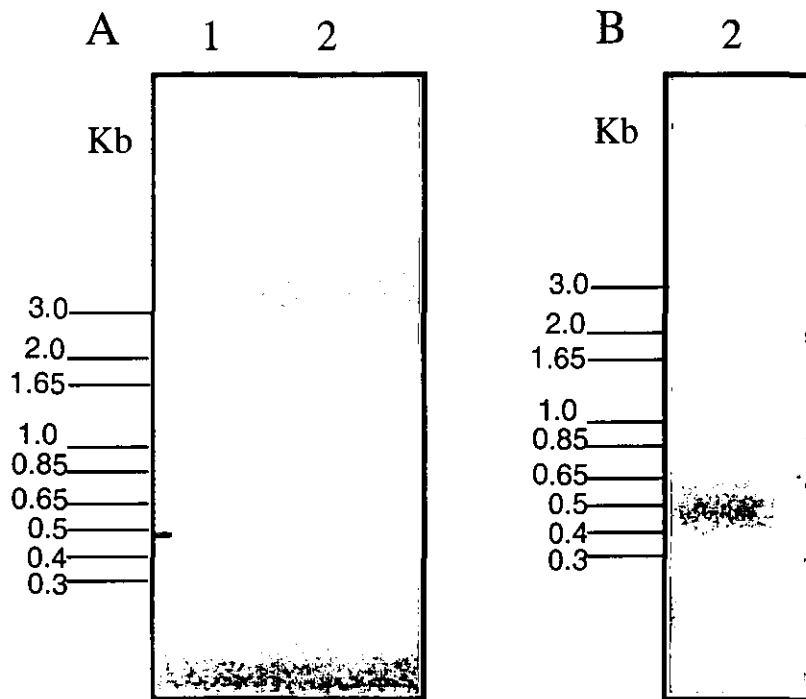


Fig. 13.- AMPLIFICACION DE SECUENCIAS HOMOLOGAS A GRB2 EN *G. max*. Electroforesis en gel de 1 % agarosa teñido con bromuro de etidio (**A**) e hibridación Southern equivalente (**B**), de los productos de la amplificación por PCR. Se amplificaron fragmentos de diversos tamaños, a partir de un banco de cDNA de plántula de soya, con los iniciadores Grb2-I, Grb2-L (carril A, 2). El carril A, 1 corresponde a los marcadores de peso molecular. En la hibridación tipo Southern se utilizó como sonda el producto de la amplificación del cDNA de Grb2, las condiciones de severidad utilizadas en los lavados fueron: SSC 2X, 0.1 % SDS; SSC 1X, 0.1 % SDS y SSC 0.5 X, 0.1 % SDS a 55 °C. Este resultado mostró una señal intensa en el fragmento correspondiente a 0.45 Kb (carril B, 2).

```

5' 1 GGTGCAGGAAGC AATGCTTATATT TTGGGTGGCCAA GACAAAGCACAG
    I G A G S N A Y I L G G Q D K A Q
    AACTGGCATGTC TACTCTGCTTCT GCAGATTCTGTA ACTCAATGTGAC
    N W H V Y S A S A D S V T Q C D
    AATGTTTACACT CTTGAGATGTGC ATGACTGGCCTG GATAGAGAGAAA
    N V Y T L E M C M T G L D R E K
    GCACAGGTTTTTC TACAAAGAACAT CTGCTTCAGCTG CATGACGACTGT
    A Q V F Y K E H L L Q L H D D C

    TAATTCGGCATT TCG 190 3'
    Z F G I S 69

```

Fig. 14.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del producto de PCR generado con los iniciadores Grb2-I, Grb2-L en *G. max*. El análisis de la secuencia muestra un marco de lectura abierto de 190 nucleótidos que codifican para 69 aminoácidos.

Al comparar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos codificados con las secuencias reportadas en el banco de datos, tampoco se encontró similitud con Grb2 o con dominios SH2 - SH3 reportados en la literatura (Fig. 15). Sin embargo se encontró similitud con una región de la proteína S-adenosil-metionina descarboxilasa de la leguminosa *Vicia faba*. Esta enzima se reporta como clave para la biosíntesis de poliaminas, moléculas necesarias para el desarrollo y crecimiento de los organismos. En los estudios realizados con ésta enzima se ha reportado que un incremento en la actividad de la S-adenosil-metionina descarboxilasa provoca un aumento en el número de tubérculos y un cambio en la distribución de los mismos en papa (Pedros *et al.*, 1999). Debido a que este fragmento no tuvo ninguna similitud a Grb2, se siguió otro enfoque experimental.

```

3 GAGSNAYILGGQDKAQNWHVYSASADSVTQCDNVYTLEMCMTGLDREKAQVFYKE 57
  G+GS AYI+GG D+AQNWHVY ASADSV+ D+VYTLEMCMTGLDREKA VF+ K+
144 GSGSKAYIMGGSDEAQNWHVYCASADSVSPADSVYTLEMCMTGLDREKASVFFKQ 198

```

Fig. 15.- Alineamiento entre la secuencia deducida de aminoácidos del producto de PCR de *G. max* (arriba) y la proteína S-adenosil metionina descarboxilasa de *Vicia faba* (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia. El alineamiento indica 76 % de identidad y 88 % de similitud entre ambas secuencias. Datos obtenidos con el programa BLASTP, E = 2e-23.

5.4 Detección de secuencias homólogas a Grb2 en *P. vulgaris* mediante análisis tipo northern.

Con el objetivo de detectar la presencia de secuencias homólogas a Grb2 en el RNA total de hojas de frijol, se realizó una hibridación tipo northern. En éste caso el RNA obtenido se analizó por electroforesis en gel de 1.2 % agarosa; como control positivo de la hibridación se analizó, en el mismo gel, RNA total de hígado de ratón (donado por el Lab. del Dr. Luis Covarrubias, Instituto de Biotecnología, UNAM). Posteriormente el RNA se transfirió a una membrana y ésta se sometió a una hibridación con el producto de PCR de Grb2 marcado radioactivamente (Materiales y Métodos). Después de una exposición de 24 h en película, se observó claramente una banda mayoritaria con un peso molecular aproximado de 1.2 Kb (Fig. 16 B, carril 2), indicando la existencia de secuencias de RNA homólogas en la hoja de frijol. En la señal detectada en el control positivo se observaron dos bandas con un peso molecular de 3.5 y 1.5 Kb respectivamente (Fig. 16 B, carril 1); como ha sido previamente reportado en sistemas animales (Lowenstein *et al.*, 1992).

5.5 Detección de secuencias homólogas a Grb2 en *P. vulgaris* mediante análisis tipo Southern.

Con el objetivo de detectar el número de secuencias homólogas a Grb2 en frijol, se realizó un análisis a través de una hibridación tipo Southern. En éste caso el DNA genómico de frijol se digirió por separado con las enzimas de restricción *Eco* RI, *Hind* II y *Hind* III. Las reacciones se analizaron por electroforesis en gel de 1 % agarosa; como control positivo de la hibridación se analizó en el mismo gel un producto de la amplificación del cDNA de Grb2. Posteriormente, el DNA se transfirió a una membrana y ésta se sometió a una hibridación con el producto de PCR de Grb2, marcado radioactivamente (Materiales y Métodos).

La Fig. 17 muestra el resultado obtenido después de una exposición de tres días en película, donde se observan claramente cuatro bandas de hibridación con el siguiente peso molecular: dos bandas de aprox. 0.75 y 4 Kb con la restricción *Eco* R I; una banda de aprox. 3 Kb con *Hind* II y una banda de aprox. 1.2 Kb con la restricción *Hind* III. La señal en el control positivo se obtuvo después de 24 h de exposición. El patrón de restricción indicó la existencia probable de uno o dos genes homólogos a Grb2.

Mediante estos experimentos de hibridación por northern y Southern blot se detectaron en *P. vulgaris* secuencias de DNA homólogas al cDNA de Grb2. Estos resultados permitieron determinar las condiciones de hibridación y lavado para realizar las búsquedas en los bancos de cDNA y genómico de frijol.

5.6 Búsqueda de secuencias homólogas a Grb2 en los bancos de cDNA de hoja y genómico de *P. vulgaris*.

Con el antecedente de los resultados obtenidos en las hibridaciones por northern (Fig. 16)

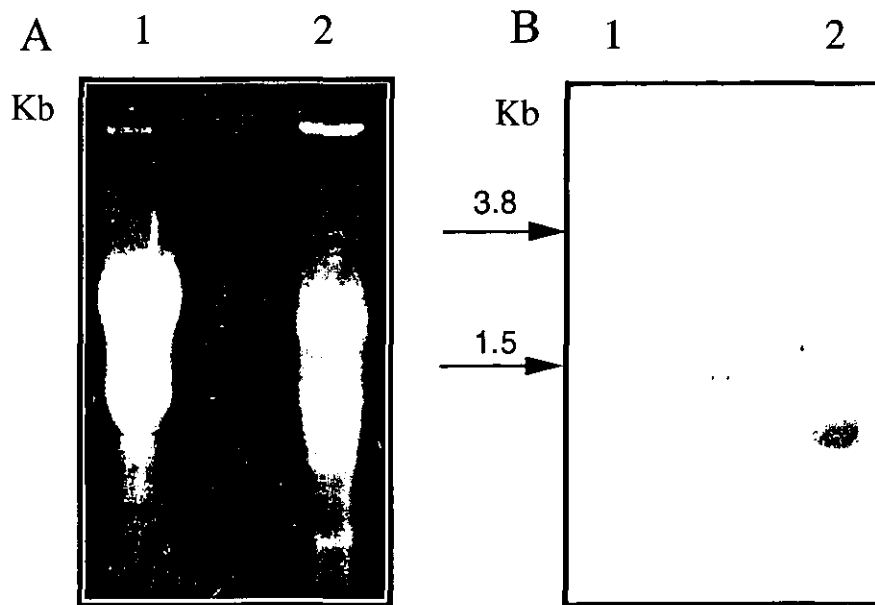


Fig. 16.- DETECCION DE SECUENCIAS HOMOLOGAS A GRB2 EN EL RNA DE HOJA DE *P. vulgaris*. Hibridación tipo northern blot sobre RNA total de hoja de frijol (carril 2) y RNA total de hígado de ratón como control positivo (carril 1), se analizaron aproximadamente 20 μ g de RNA en cada carril. Se utilizó como sonda un producto de la amplificación del cDNA de Grb2, las condiciones de severidad utilizadas en los lavados fueron: SSC 2X, 0.1 % SDS y SSC 1X, 0.1 % SDS a 55 °C. En el panel B, carril 2 se detectó la hibridación con una banda mayoritaria de RNA de hoja de frijol, de aproximadamente 1.2 Kb. En el carril 1 se detectaron las bandas correspondientes al control positivo.

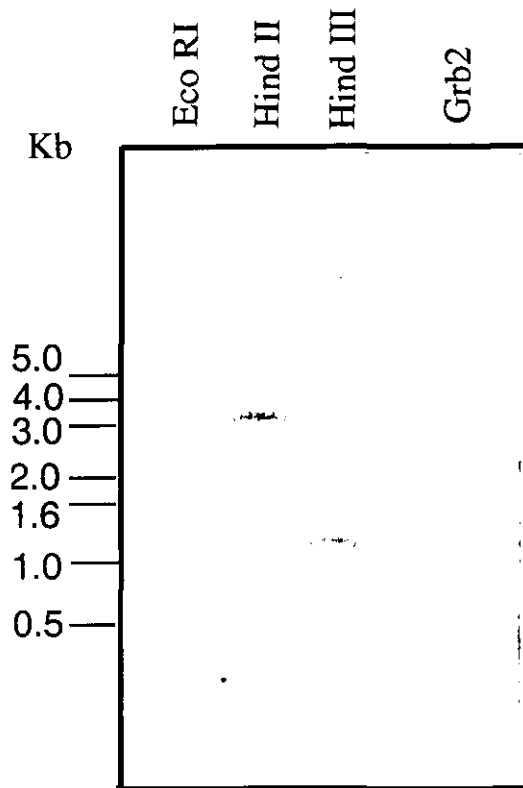


Fig. 17.-DETECCION DE SECUENCIAS HOMOLOGAS A GRB2 EN *P.vulgaris*. Hibridación tipo Southern blot sobre DNA genómico de frijol (10 μ g por carril) digerido con diferentes enzimas de restricción. Se utilizó como sonda un producto de la amplificación del cDNA de Grb2, las condiciones de severidad utilizadas en los lavados fueron: SSC 2X, 0.1 % SDS y SSC 1X, 0.1 % SDS a 55 °C. Como control positivo se utilizó el producto de la amplificación del cDNA de Grb2. Se observaron diversas bandas que hibridan con la sonda marcada en cada una de las digestiones analizadas.

y Southern blot (**Fig. 17**), se realizaron varios intentos (4 en total) por detectar clonas positivas en los bancos de cDNA de hoja y genómico de frijol; para lograrlo se utilizó la misma sonda empleada en la hibridación Southern. Para la búsqueda en el banco genómico se plaquearon aprox. 3×10^5 placas líticas; mientras que para la búsqueda en el banco de cDNA se plaquearon aprox. 2×10^5 placas (Materiales y Métodos); en ambas búsquedas se utilizaron membranas por duplicado. En el primer tamizado de cada banco se aislaron entre 20 y 35 clonas positivas, sin embargo en el segundo tamizado demostraron ser positivas falsas. Los resultados de positivas falsas también se repitieron en los tamizados posteriores, por lo que se abandonó esta estrategia.

5.7 Identificación de dos proteínas con anticuerpos anti-Grb2 en ejes embrionarios de semillas maduras.

En forma paralela a los experimentos anteriores, se siguió un enfoque experimental diferente con el objetivo de caracterizar a la(s) proteína(s) reconocida(s) por anticuerpos anti-Grb2.

En base a los resultados mostrados en las **Figs. 7 y 8**, y a los datos proporcionados por la Dra. E. Bearer (Bearer *et al.*, 2000), donde la proteína de 30 kDa inmunodetectada en plaquetas se identificó como Grb2. Se utilizaron anticuerpos comerciales anti-Grb2 para realizar inmunodetecciones en extractos de ejes embrionarios de frijol. La **Fig. 18** muestra el reconocimiento de una proteína de 30 kDa (detectada previamente con anticuerpos anti-p30) y de forma más abundante una proteína de 36 kDa (**Fig. 18 B**, carril 2). La proteína Grb2 presente en el extracto de plaquetas tiene un peso molecular aproximado de 29 kDa (**Fig. 18 B**, carril 3), el cual está muy cercano al de la proteína de 30 kDa detectada en el eje embrionario. Este resultado apoya la idea que ésta sea una proteína homóloga a Grb2. En este experimento y análisis posteriores se utilizaron extractos de plaquetas como control positivo de la inmunodetección, debido a que en éstos tejidos se ha reportado la presencia de Grb2 (Lowenstein *et al.*, 1992).

5.8 Inmunodetección cruzada con anticuerpos purificados contra Grb2 y la proteína de 36 kDa.

Para eliminar la posibilidad de que el reconocimiento de las proteínas por los anticuerpos contra Grb2, se debiera a interacciones inespecíficas durante la inmunodetección, se realizó una purificación por inmunoabsorción, de éstos anticuerpos, contra la proteína Grb2 de plaquetas y la proteína de 36 kDa presente en el eje embrionario; cada purificación se realizó por separado de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. La eficiencia de reconocimiento se analizó por ensayos de inmunodetección, donde el resultado mostró que los anticuerpos purificados contra la proteína Grb2 de plaquetas, reconocen a la proteína de 36 kDa presente en el eje embrionario (**Fig. 19 A**, carril 2); aunque no se observó señal de la proteína de 30 kDa con estos mismos anticuerpos. Por otro lado, los anticuerpos purificados contra la proteína de 36 kDa reconocieron a la proteína Grb2 de plaquetas (**Fig. 19 B**, carril 1). Como un control positivo de las

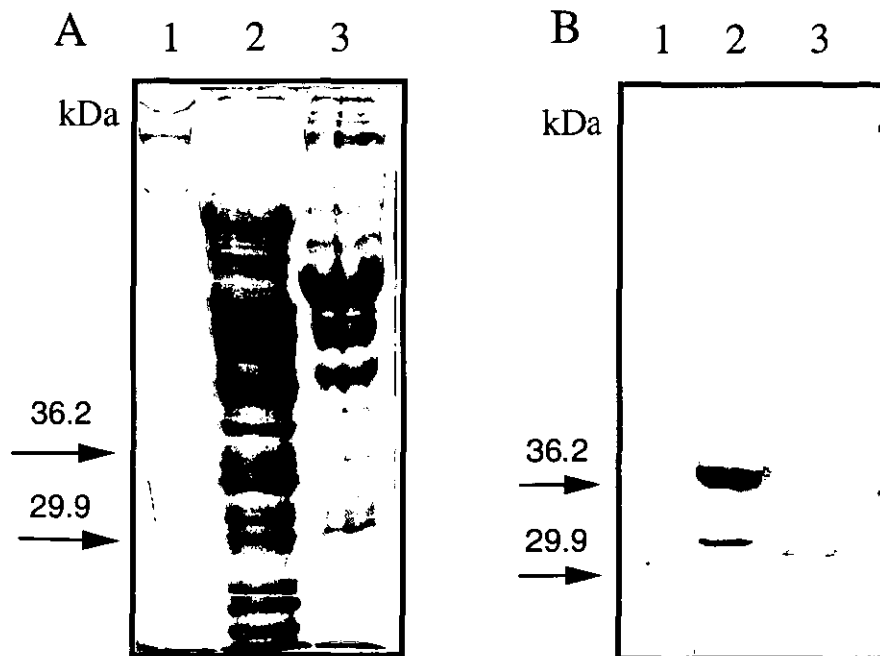


Fig. 18.- IDENTIFICACION DE DOS PROTEINAS CON ANTICUERPOS ANTI-GRB2 EN EJES EMBRIONARIOS DE SEMILLAS MADURAS DE FRIJOL. Análisis electroforético en un gel de 12 % de acrilamida desnaturalizante teñido con azul de coomassie (A) e inmunodetección correspondiente (B) de un extracto de ejes embrionarios de frijol. Los carriles corresponden a: marcadores de peso molecular (1), extracto de ejes embrionarios (2) y extracto total de plaquetas de humano como control positivo (3). Anticuerpos contra Grb2 detectaron dos proteínas de 36 y 30 kDa en los ejes embrionarios de frijol (B, carril 2) y una proteína de 29 kDa en plaquetas como control positivo (B, carril 3).

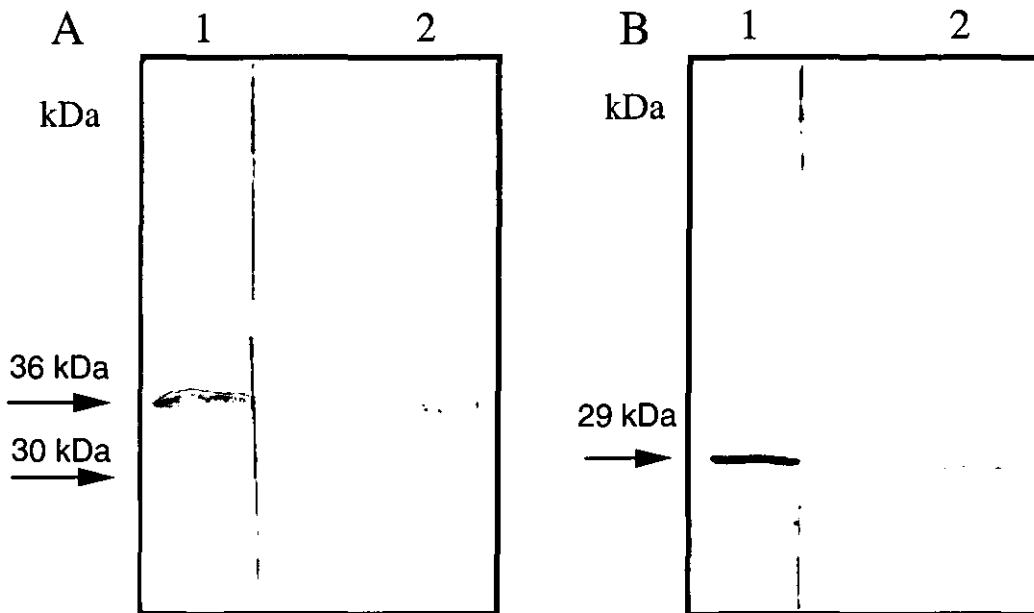


Fig. 19.- INMUNODETECCION CRUZADA CON ANTICUERPOS PURIFICADOS CONTRA GRB2 DE PLAQUETAS Y LA PROTEINA DE 36 KDa DE EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL. Inmunodetección en extracto total de plaquetas de humano, con anticuerpos purificados contra la proteína de 36 kDa de ejes embrionarios (B, carril 1); como control positivo se realizó una inmunodetección con los mismos anticuerpos en extractos de ejes embrionarios de frijol (A, carril 1). En forma paralela se realizó una inmunodetección con anticuerpos purificados contra Grb2 de plaquetas de humano, en extractos de ejes embrionarios de frijol (A, carril 2) y en extractos de plaquetas como control positivo (B, carril 2).

inmunodetecciones, los anticuerpos purificados contra Grb2, se probaron en extractos de plaquetas (**Fig. 19 B**, carril 2) y los anticuerpos purificados contra la proteína de 36 kDa se probaron en extractos de eje embrionario, respectivamente (**Fig. 19 A**, carril 1). Estos resultados mostraron que el reconocimiento de los anticuerpos anti-Grb2 es específico para la proteína de 36 presente en el eje embrionario y por lo tanto es muy probable que esta proteína posea epítopes comunes que representen secuencias o regiones con similitud a Grb2.

5.9 Ensayo de unión a poli-L-prolina de las proteínas de 30 y 36 kDa.

Una de las características que presenta Grb2 es su afinidad a regiones ricas en prolina a través de sus dominios SH3 (Simon y Schreiber 1995; Feng *et al.*, 1994); con este motivo se realizó un ensayo de unión a una columna de poli-L-prolina a partir de un extracto de embrión de frijol. El protocolo utilizado (Materiales y Métodos) permite realizar eluciones que se han reportado como selectivas para Grb2, profilina y VASP (Bearer *et al.*, 2000). Las fracciones obtenidas del volumen que no se unió a la columna; del volumen de lavado y de las diferentes eluciones, se analizaron mediante inmunodetecciones con anticuerpos anti-Grb2. Como un control positivo del experimento se analizaron las mismas fracciones con anticuerpos anti-profilina debido a que se sabe que la profilina es una proteína que se une fuertemente a poli-L-prolina (Kaiser *et al.*, 1989; Vidali *et al.*, 1995). El resultado mostró la elución de profilina con 3 y 6 M urea en 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (**Fig. 20 B**, carriles 9-13). Sin embargo, no hubo detección de las proteínas de 30 y 36 kDa en ninguna de las fracciones correspondientes a la elución de la columna (**Fig. 20 A**, carriles 2-14). Por otro lado, las proteínas de 30 y 36 kDa se detectaron en las fracciones correspondientes al volumen de lo que no se unió a la columna, lo cual demostró que las proteínas de 30 y 36 kDa presentes en el eje embrionario de frijol no poseen la característica de afinidad por poli-L-prolina bajo éstas condiciones.

5.10 Ensayo de afinidad de las proteínas de 36 y 30 kDa a tirosinas fosforiladas.

Otra de las características que presenta la proteína Grb2 reportada en animales es su afinidad a regiones que presentan tirosinas fosforiladas (Anderson *et al.*, 1990; Songyang *et al.*, 1993), por lo que el siguiente ensayo consistió en pasar una muestra con las proteínas de 30 y 36 kDa enriquecidas por intercambio aniónico, a través de una columna de tirosinas fosforiladas acopladas a agarosa. Después del ensayo, se tomó una alícuota de la resina utilizada y se analizó por inmunodetección con anticuerpos anti-fosfotirosina (Materiales y Métodos), para comprobar la funcionalidad de la columna. Las fracciones obtenidas del volumen que no se unió a la columna; del volumen de lavado y de las diferentes eluciones, se analizaron mediante inmunodetecciones con anticuerpos anti-Grb2. La **Fig. 21 A** (carriles 4-6), muestra el análisis electroforético de las fracciones obtenidas de esta columna después de una elución con 1M KCl. La inmunodetección

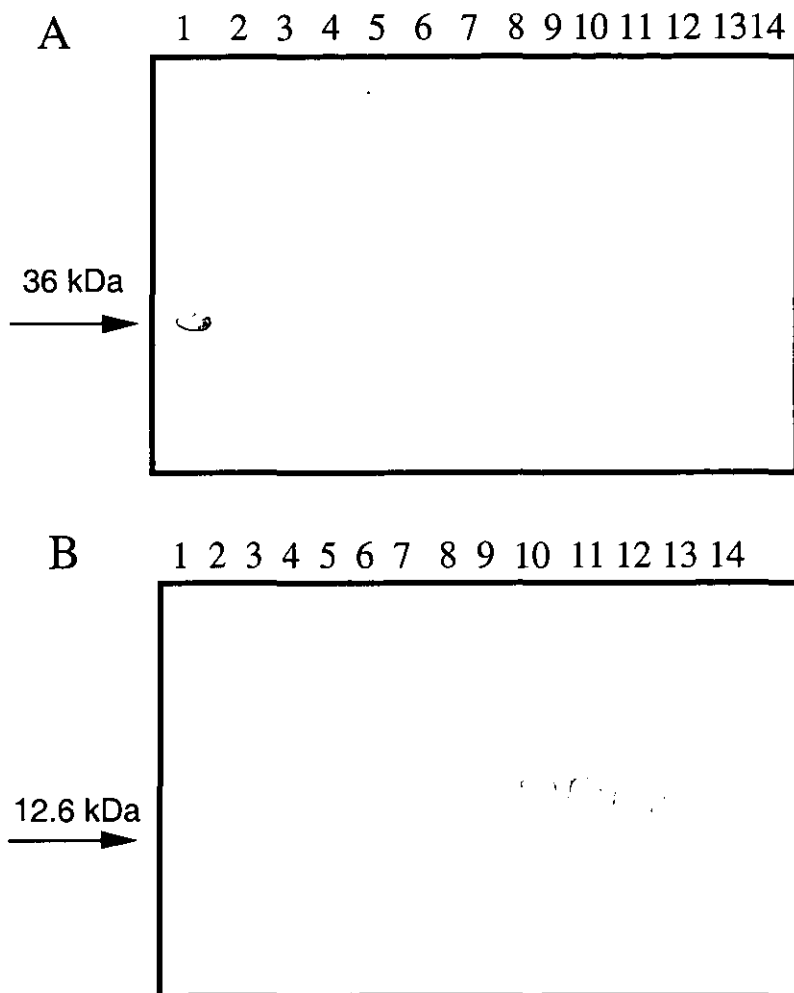


Fig. 20.- ENSAYO DE UNION A POLI-L-PROLINA DE LAS PROTEINAS DE 30 Y 36 kDa PRESENTES EN EL EJE EMBRIONARIO DE LAS SEMILLAS DE FRIJOL. Inmunodetección con anticuerpos anti-Grb2 (A) y anti-profilina(B) de las fracciones obtenidas de la elución de una columna de poli-L-prolina. A una muestra de extracto de eje embrionario de frijol se le adicionó 1 vol de solución A (PBS 1X, 60 mM PIPES, 2 mM MgCl₂ pH 7.4). Del sobrenadante obtenido se tomaron 3 ml y se pasaron por la columna de poli-L-prolina previamente equilibrada con solución A. La elución de proteínas se realizó con 3 ml de cada una de las siguientes soluciones: 5 mM MgATP, PBS 1X, 60 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, pH 7.4 (carriles 2-4); 0.3 M MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (carriles 5-7); 3 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (carriles 8-10); 6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (carriles 11-14). El carril 1 en A y B, corresponde a extracto de plaquetas y citocromo C, utilizados como control positivo y marcador de peso molecular respectivamente. No se detectó la presencia de las proteínas de 30 y 36 kDa en las fracciones correspondientes a la elución de la columna.

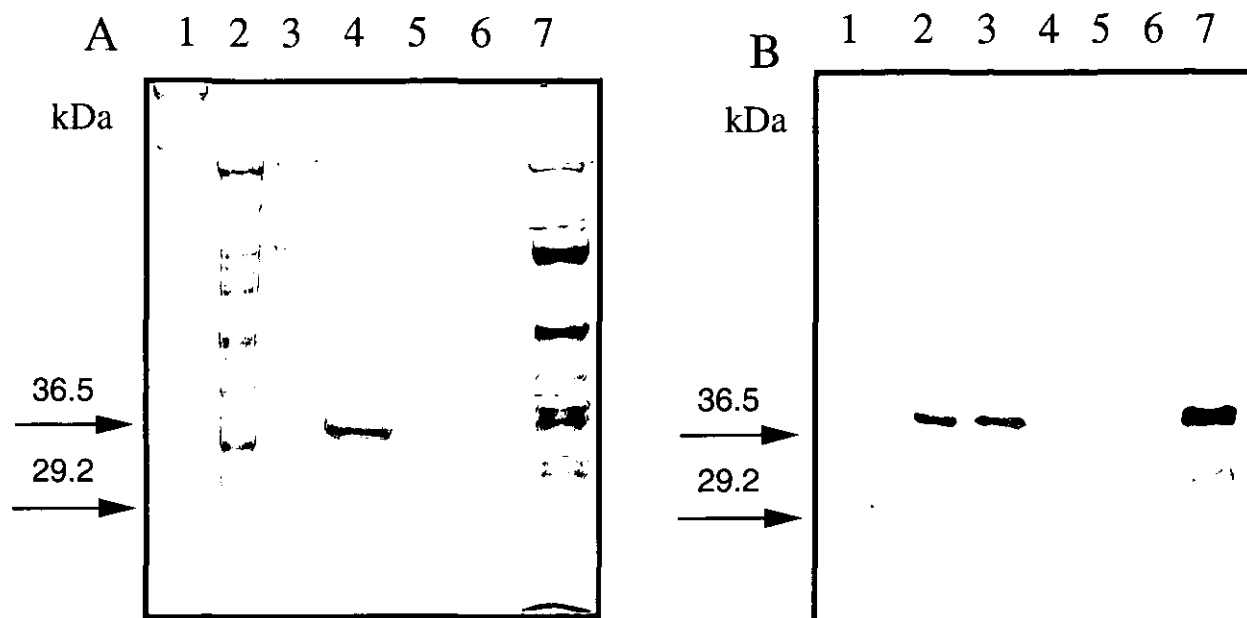


Fig. 21.- ENSAYO DE UNION A FOSFOTIROSINAS DE LAS PROTEINAS DE 30 Y 36 kDa PRESENTES EN EL EJE EMBRIONARIO DE FRIJOL. Análisis electroforético en un gel de 12 % de acrilamida desnaturalizante teñido con azul de coomassie (**A**) e inmunodetección equivalente (**B**) de las fracciones obtenidas de la elución de una columna de fosfotirosina. El volumen de las fracciones (7-14), obtenidas de la elución de la columna de intercambio aniónico, se concentró y pasó por una columna de fosfotirosina acoplada a agarosa, previamente equilibrada con solución B (20 mM HEPES, 1 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1 mM ortovanadato de sodio, 0.1 mM pirofosfato de sodio, pH 7). Las fracciones eluyeron con 3 ml de 1M KCl y la inmunodetección se realizó con anticuerpos anti-Grb2. Los carriles corresponden a: marcadores de peso molecular (1), extracto de ejes embrionarios de frijol (2), muestra previa a la cromatografía (3), fracciones 1-3 de la elución con 1M KCl (4-6), y una fracción concentrada del volumen que no se unió a la columna (7). No se detectó la presencia de las proteínas de 30 y 36 kDa en las fracciones correspondientes a la elución de la columna.

equivalente con anticuerpos contra Grb2 reconoció a la proteína de 36 kDa presente en un extracto de ejes embrionarios, en la muestra previa a la cromatografía y en el volumen de lo que no se unió a la columna (**Fig. 21 B**, carriles 2, 3 y 7), sin embargo no hubo reconocimiento de proteínas en las fracciones correspondientes a la elución de la columna (**Fig. 21 B**, carriles 4-6). Este resultado demostró que las proteínas de 30 y 36 kDa presentes en el eje embrionario de frijol no poseen la característica de afinidad a tirosinas fosforiladas bajo éstas condiciones. Se observó una proteína de 34 kDa que se unió a la columna y fué despegada bajo las mismas condiciones (**Fig. 21 A**, carril 4).

Los resultados obtenidos en los ensayos de afinidad a poli-L-prolina y fosfotirosinas sugirieron fuertemente que las proteínas de 30 y 36 kDa no tienen similitud con Grb2. Debido a esto, aunado al interés por conocer el porqué del reconocimiento de estas proteínas por los anticuerpos anti-Grb2 y a la relativa abundancia de la proteína de 36 kDa en el eje embrionario, se siguió un proceso de purificación de ésta proteína, para posteriormente determinar su secuencia parcial de aminoácidos, y así sugerir su posible función en la semilla de frijol.

5.11 *Enriquecimiento y separación parcial de la proteína de 36 kDa por cromatografía de intercambio aniónico.*

Con el objetivo de enriquecer y purificar a la proteína de 36 kDa presente en el eje embrionario, se aplicó un gradiente de elución de 0.0-0.4 M NaCl a una columna de DEAE-sefacel, por la que previamente se pasó un extracto de eje embrionario de frijol. El resultado de la inmunodetección de las fracciones obtenidas, mostró una separación parcial de las proteínas de 36 kDa (**Fig. 22 B**, carriles 2-15) y 30 kDa (**Fig. 22 B**, carriles 9-14). Debido a que el análisis electroforético mostró un enriquecimiento y purificación parcial de la proteína de 36 kDa (**Fig. 22 A**, carriles 2-6), se decidió incrementar la concentración de proteína en el gel. Para ello se realizaron seis purificaciones independientes con éste procedimiento y se concentró el volumen de las fracciones correspondientes (Materiales y Métodos). En la **Fig. 23** (carril 1) se corrió la muestra de proteína concentrada, a partir de la cual se cortó la banda correspondiente a 36 kDa, para la obtención posterior de su secuencia parcial de aminoácidos.

5.12 *Secuencia parcial de aminoácidos de péptidos derivados de la proteína de 36 kDa.*

Después de haber realizado la purificación de la proteína de 36 kDa de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos, la muestra se envió a la Universidad de Harvard donde se obtuvo su secuencia parcial de aminoácidos. Inicialmente el análisis de la secuencia se realizó por el método de espectrometría de masas, el cual dió como resultado siete secuencias de péptidos derivados de la proteína; cuatro de estos péptidos alinearon con una proteína similar a la subunidad

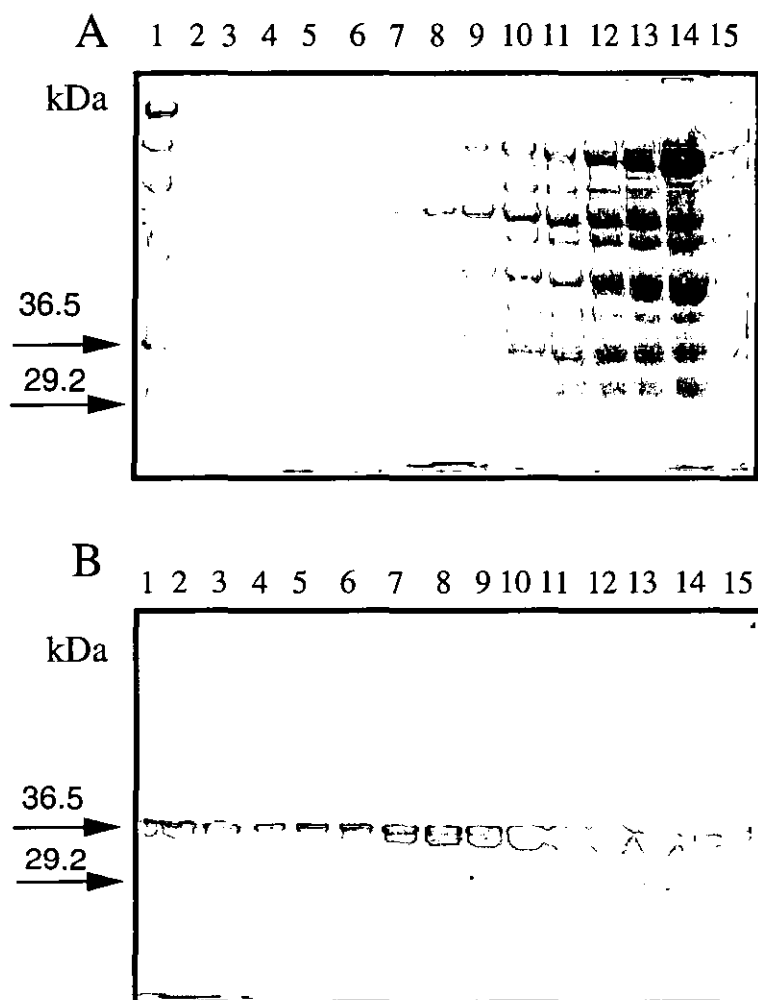


Fig. 22.- ENRIQUECIMIENTO Y SEPARACION PARCIAL DE LA PROTEINA DE 36 kDa. Análisis electroforético en un gel de 12 % de acrilamida desnaturalizante teñido con azul de coomassie (**A**) e inmunodetección equivalente (**B**) de las fracciones obtenidas de una columna de DEAE-sefacel. Un extracto de ejes embrionarios de semillas maduras de frijol se pasó por una columna de intercambio aniónico (DEAE-sefacel), equilibrada con 3.0 mM NaH_2PO_4 , 7.0 mM Na_2HPO_4 pH 7.4 (PB). Las fracciones se eluyeron con 50 ml de un gradiente lineal de 0.0-0.4 M NaCl-PB. Los carriles corresponden a: marcadores de peso molecular (A,1) y a las primeras fracciones eluidas con el gradiente (A-B, carriles 2-15). La proteína de 36 kDa se detectó en las fracciones 3-16 (**B**, carriles 2-15) mientras que la proteína de 29 kDa se detectó en las fracciones 10-16 (**B**, carriles 9-14).

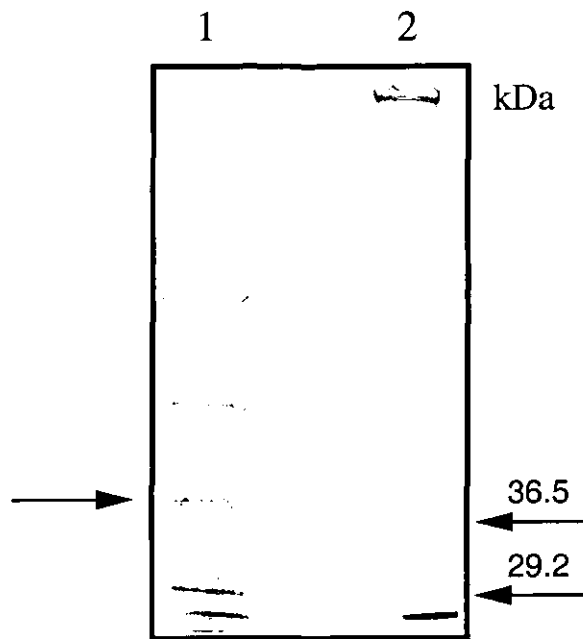


Fig. 23.- ENRIQUECIMIENTO DE LA PROTEINA DE 36 KDa PRESENTE EN EL EJE EMBRIONARIO DE FRIJOL. Análisis electroforético de un gel de 10 % de acrilamida desnaturalizante teñido con azul de coomassie. Las fracciones 1-6 obtenidas de la columna de intercambio aniónico se concentraron hasta un volumen mínimo y se analizaron en éste gel (carril 1); para el corte de la banda correspondiente a 36 kDa, que fué inmunodetectada por los anticuerpos anti-Grb2. El carril 2 corresponde a los marcadores de peso molecular.

β de una proteína G heterotrimérica de *Glycine max* (Fig. 24), mientras que los otros tres péptidos alinearon con un precursor de fitohemaglutinina eritroaglutinante de *Phaseolus vulgaris* (Fig. 25). Debido a que el análisis por espectrometría de masas está acoplado a un programa computacional de alineamiento con el banco de datos, las secuencias de los péptidos que nos fueron enviadas aparecen como 100 % idénticas a la secuencia de la proteína reportada.

1	AHTDVVTAIATPIDNSDMIVTASR	24	1	FSPSTLQPTIVSASWDR	17
	AHTDVVTAIATPIDNSDMIVTASR			FSPSTLQPTIVSASWDR	
13	AHTDVVTAIATPIDNSDMIVTASR	36	157	FSPSTLQPTIVSASWDR	173

1	LWDLAAGTSAR	11	1	IWDLESK	7
	LWDLAAGTSAR			IWDLESK	
89	LWDLAAGTSAR	99	259	IWDLESK	265

Fig. 24.- Alineamiento entre cuatro secuencias de péptidos obtenidos por espectrometría de masas de la banda de 36 kDa (arriba), y una proteína similar a la subunidad β de una proteína de unión a nucleótidos de guanina de *Glycine max* (# de acceso 3023858) (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia.

1	LTNVNDNGEPTLSSLGR	17	1	LSDGTTSEALNLANFALNQIL	21
	LTNVNDNGEPTLSSLGR			LSDGTTSEALNLANFALNQIL	
53	LTNVNDNGEPTLSSLGR	69	255	LSDGTTSEALNLANFALNQIL	275

1	HIGIDVNSIK	10
	HIGIDVNSIK	
160	HIGIDVNSIK	169

Fig. 25.- Alineamiento entre tres secuencias de péptidos obtenidos por espectrometría de masas de la banda de 36 kDa (arriba), y una proteína precursora de fitohemaglutinina eritroaglutinante de *P. vulgaris* (# de acceso 130007) (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia.

Con el objetivo de confirmar el resultado anterior, se pidió a la Universidad de Harvard un análisis de la secuencia por degradación de Edman de la misma muestra. Este análisis se realizó a partir de dos picos de elución obtenidos de la espectrometría de masas. El resultado obtenido fueron tres secuencias de péptidos. Dos de los péptidos alinearon con una proteína LEA D-34 de algodón (*Gosypium hirsutum*) (Fig. 26), mientras que el tercer péptido alineó con regiones de cinasas de tirosina tipo Src o con homología a Src (Fig. 27). Para la realización de éstos alineamientos se utilizó el programa de BLAST para secuencias cortas.

1 DAALMQ 6	1 DAALMQA 7
DAA+MQ	DAA +QA
43 DAAMMQ 48	43 DAAAVQA 48
identidad: 83 % similitud: 99%	identidad: 71 % similitud: 85 %
2 AALMQA 7	1 ENQTLGQAQK 10
AA+MQA	E Q LGQ QK
64 AAVMQA 69	51 ETQVLGQTQK 60
identidad: 83 % similitud: 99%	identidad: 70 % similitud: 70 %

Fig. 26.- Alineamiento entre dos péptidos obtenidos por degradación de Edman de la banda de 36 kDa (arriba) y una proteína LEA D-34 de *G. hirsutum* (# de acceso 126078) (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia.

1 GEFSDV 6
GEF DV
204 GEFGDV 209
identidad: 83 % similitud: 83 %
(# de acceso 4758078 y 30256)

Fig. 27.- Alineamiento entre un péptido obtenido por degradación de Edman de la banda de 36 kDa (arriba) y algunas cinasas de tirosina tipo Src o con homología a Src (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia.

5.13 *Inmunodetección de la proteína de 36 kDa en distintos tejidos de P. vulgaris.*

Se decidió analizar la distribución de la proteína de 36 kDa en algunos tejidos de frijol. Para ello se realizaron extracciones de proteína a partir de: eje embrionario, cotiledón, nódulo, raíz, hoja y flor. La **Fig. 28 A** muestra el análisis electroforético de los distintos extractos, con una concentración de proteína total equivalente en cada carril (Materiales y Métodos). En la inmunodetección paralela con anticuerpos anti-Grb2 (utilizados como un método de detección), se identificó la presencia de proteínas inmunoreactivas principalmente en el eje embrionario, cotiledón y raíz (**Fig. 28 B**, carriles 2, 3 y 5 respectivamente). La proteína de 30 kDa se detectó únicamente en eje embrionario (**Fig. 28 B**, carril 2), y en este mismo tejido la proteína de 36 kDa dió una reacción con el anticuerpo que fué mucho más fuerte que en los demás. Esto sugiere que ambas proteínas pueden ser importantes en el embrión para el desarrollo de la planta durante la germinación.

5.14 *Inmunodetección de la proteína de 36 kDa en una cinética de imbibición de ejes embrionarios.*

Debido a que la proteína de 36 kDa se localizó preferentemente en el eje embrionario de la semilla, se procedió a analizar el patrón de expresión de ésta proteína durante la imbibición de la semilla. La extracción de proteínas se realizó en los siguientes tiempos después de haber iniciado la imbibición: 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, se midió la concentración de proteína total y se analizó una cantidad equivalente de proteína en cada carril (**Fig. 29 A**). La inmunodetección equivalente con anticuerpos anti-Grb2 mostró una disminución importante en los niveles de la proteína de 36 kDa a partir de las 24 h (**Fig. 29 B**, carril 4), mientras que la presencia de la proteína de 30 kDa solo se detectó en el tiempo 0 (**Fig. 29 B**, carril 1). Sin embargo, no se puede descartar que esta proteína de 30 kDa también disminuye conforme avanza el tiempo de imbibición y se vuelve indetectable por el método utilizado. Será importante determinar el significado de esta disminución en la cantidad de la proteína en etapas específicas de la germinación.

5.15 *Identificación y purificación de una proteína de 34 kDa con afinidad a fosfotirosinas.*

Debido a nuestro interés en caracterizar proteínas relacionadas con la transducción de señales se decidió analizar a la proteína de 34 kDa obtenida parcialmente pura de la elución con 1 M KCl de la columna de fosfotirosinas (**Fig. 21 A**, carril 4). Para ello se realizaron tres purificaciones independientes y se concentró el volumen de las fracciones correspondientes (Materiales y Métodos). Uno de los objetivos de purificar a la proteína de 34 kDa fué la obtención y análisis de su secuencia parcial de aminoácidos. En la **Fig. 30** (carril 1) se corrió la muestra de proteína concentrada a partir de la cual se cortó la banda correspondiente a 34 kDa.

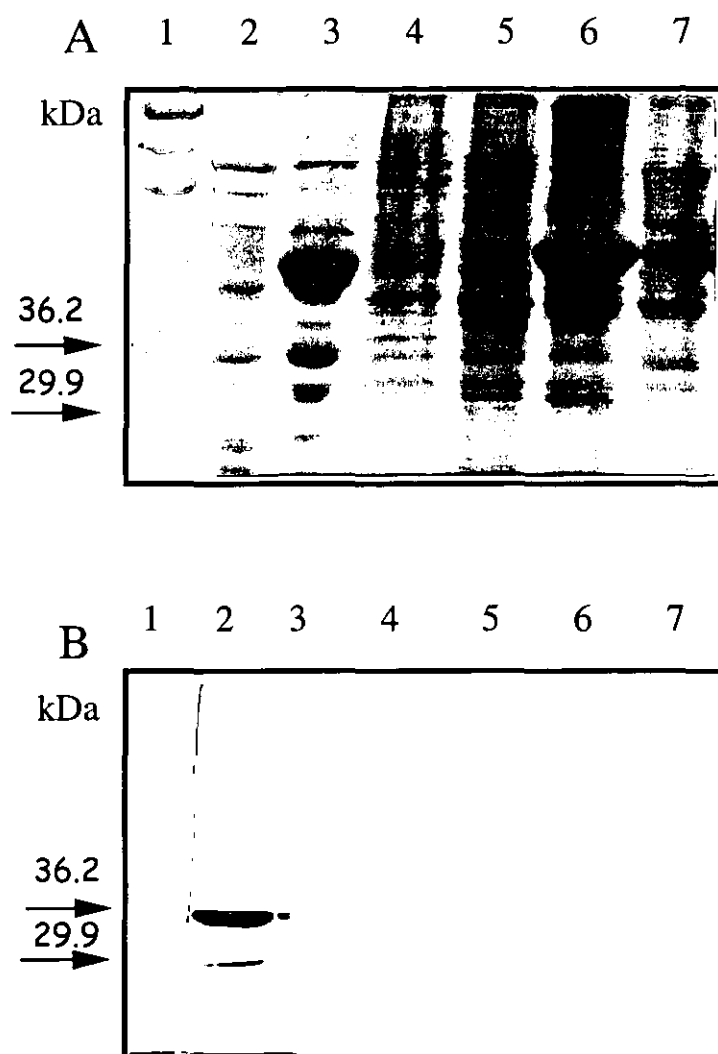


Fig. 28.- INMUNODETECCION DE LA PROTEINA DE 36 kDa EN DISTINTOS TEJIDOS DE FRIJOL. Análisis electroforético en gel de 12 % de acrilamida desnaturalizante teñido con azul de coomassie (A) e inmunodetección equivalente (B), de distintos extractos proteicos de frijol derivados de: eje embrionario (2), cotiledón (3), nódulo (4), raíz (5), hoja (6) y flor (7). Se analizaron cantidades equivalentes de proteína en cada carril (aproximadamente 100 μ g). La inmunodetección se realizó con anticuerpos anti-Grb2. La presencia de proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-Grb2 se detectó principalmente en el extracto de eje embrionario (B, carril 2), cotiledón (B, carril 3) y raíz (B, carril 5). La proteína de 30 kDa se observó únicamente en el eje embrionario (B, carril 2).

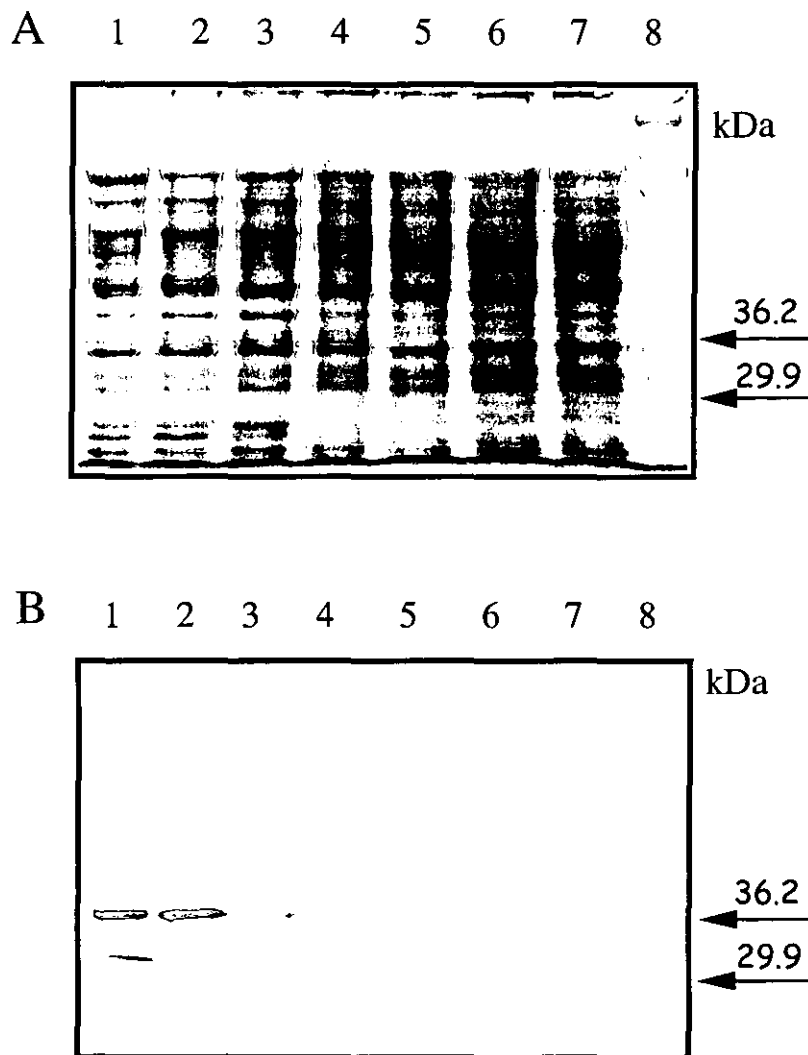


Fig. 29.- INMUNODETECCION DE LA PROTEINA DE 36 kDa EN EL INICIO DE LA IMBIBICION. Análisis electroforético de un gel de 12 % de acrilamida desnaturizante teñido con azul de coomassie (A) e inmunodetección equivalente (B), de extractos de eje embrionario a distintas horas de iniciada la imbibición. Se analizaron cantidades equivalentes de proteína en cada carril (aproximadamente 90 μ g). Los carriles corresponden a: ejes embrionarios de semillas maduras (1), y embebidos por 6 (2), 12 (3), 24 (4), 48 (5) 72 (6) y 96 h (7). La inmunodetección se realizó con anticuerpos anti-Grb2. Se observa una disminución importante en la expresión de la proteína de 36 kDa, a partir de las 24 h (B, carril 4). El carril 8 corresponde a los marcadores de peso molecular.

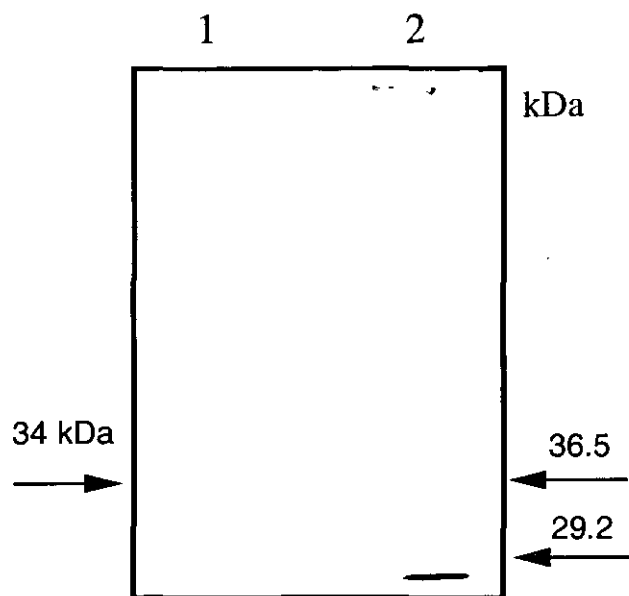


Fig. 30.- ENRIQUECIMIENTO Y PURIFICACION DE LA PROTEINA DE 34 KDa, CON AFINIDAD A FOSFOTIROSINAS. Análisis electroforético de un gel de 10 % de acrilamida teñido con azul de coomassie. Las fracciones 1-3 obtenidas de la elución de la columna de fosfotirosinas, se concentraron hasta un volumen mínimo y se analizaron en éste gel (carril 1), para el corte de la banda correspondiente a 34 kDa. El carril 2 corresponde a los marcadores de peso molecular.

5.16 Secuencia parcial de aminoácidos de péptidos derivados de la proteína de 34 kDa.

Después de haber realizado la purificación de la proteína de 34 kDa de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos, ésta fué enviada a la Universidad de Harvard donde se obtuvo su secuencia parcial de aminoácidos. El análisis de la secuencia se realizó por el método de espectrometría de masas, el cual dió como resultado dos secuencias de péptidos derivados de la proteína, los cuales alinean con una secuencia reportada para una posible proteína relacionada con la desecación en *Arabidopsis thaliana* (Fig. 31). Esto sugiere que esta proteína puede unirse a proteínas que contengan tirosinas fosforiladas y puede ser importante durante los eventos de germinación en frijol.

1	KLVALLLGVESGQDAVIR	18	1	TPEEILR	7
	KLVALLLGVESGQDAVIR			TPEEILR	
174	KLVALLLGVESGQDAVIR	191	262	TPEEILR	268

Fig.31.- Alineamiento entre dos secuencias de péptidos obtenidos por espectrometría de masas de la proteína de 34 kDa (arriba), y una probable proteína relacionada con la desecación en *Arabidopsis thaliana* (# acceso 12323093) (abajo). El número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia.

VI

DISCUSION

Durante la germinación y cualquier otro proceso biológico ocurren numerosos eventos que involucran la transducción de señales como son: división celular, diferenciación y una alta actividad metabólica. Estos eventos están regulados por una gama de proteínas que ejercen control preciso sobre cada paso del proceso de germinación. En plantas se han realizado estudios con el objetivo de caracterizar a los elementos que están involucrados en las vías de señalización. La gran mayoría de las proteínas involucradas en transducción de señales en vegetales se han identificado mediante el análisis de mutantes; a partir de estos estudios se han podido aislar cDNAs que codifican para algunas de las proteínas que participan en las vías de señalización en plantas como *Arabidopsis*, tabaco y maíz, entre otras (Møller y Chua 1999; Hardie 1999). En el presente trabajo se mostró la presencia de proteínas potencialmente relacionadas con la transducción de señales en ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris*.

6.1 *Secuencias homólogas a Grb2 en Phaseolus vulgaris.*

Grb2 es una proteína adaptadora de la transducción de señales que se caracteriza por tener dos dominios SH3 y un dominio SH2, los cuales le permiten interactuar con otros componentes de la cascada de señalización en sistemas animales (Lowenstein *et al.*, 1992; László 1999). Una de las estrategias que utilizamos para identificar proteínas relacionadas con la transducción de señales en frijol, fué a través de inmunodetecciones con anticuerpos obtenidos contra una proteína de 30 kDa, identificada como Grb2 en plaquetas de humano. Utilizando esta técnica, se identificó a una proteína de 30 kDa en ejes embrionarios de frijol y de soya (Figs. 7 y 8). Estos resultados fueron siempre reproducibles. Cuando en experimentos independientes se utilizaron anticuerpos comerciales contra Grb2, se obtuvo el mismo resultado pero se observó una proteína de 36 kDa que reaccionó fuertemente con el anticuerpo, además de la de 30 kDa. Esto sugirió fuertemente que en ambos tejidos existía un homólogo de esta proteína. Debido a lo anterior, se decidió seguir una metodología de amplificación por PCR para aislar la(s) secuencia(s) que codifica(n) para la proteína homóloga de Grb2 en frijol.

Los productos de la amplificación por PCR en hoja de frijol y plántula de soya se obtuvieron con oligonucleótidos específicos para Grb2, sin embargo al analizar su secuencia nucleotídica no se detectaron secuencias similares a Grb2, o a dominios SH2-SH3 (Figs. 12 y 15). La obtención de estas secuencias pudo deberse a que las condiciones de temperatura utilizadas en el PCR, favorecieron interacciones inespecíficas entre los oligonucleótidos y el DNA. A pesar

de que la elección de los productos de PCR para su posterior purificación y secuencia se realizó con base en su hibridación con el cDNA de Grb2 utilizado como sonda, no se obtuvo secuencia con similitud a este gen. El hecho de que los productos de PCR obtenidos de frijol y soya mostraron una señal detectable de hibridación, pudo deberse a que hay varias regiones en la secuencia de éstos productos que tienen similitud en 8-10 nucleótidos, los cuales podrían estar siendo reconocidos por la sonda de Grb2. Es probable que al utilizar oligonucleótidos con base en las secuencias reportadas recientemente para dominios similares a SH2-SH3 en plantas, se pueda favorecer la amplificación de éste tipo de secuencias en frijol.

Los resultados obtenidos en las hibridaciones sobre DNA genómico y RNA total de hoja de frijol, utilizando como sonda el cDNA de Grb2 mostraron la presencia de regiones con similitud a Grb2 en ambos casos. La señal observada en la hibridación northern (**Fig. 17**) sugiere la existencia de secuencias de RNA homólogas a Grb2 que se están expresando en la hoja de frijol. Por otro lado, las señales observadas en la hibridación Southern indicaron la presencia de 1 o 2 genes con posibles regiones homólogas a Grb2 (**Fig. 16**). Las condiciones de hibridación utilizadas en ambos casos se consideran de medianamente estrictas; condiciones similares se han reportado en la hibridación de una sonda heteróloga (de humano) sobre DNA vegetal (Raghuram *et al.*, 1999), por lo que se pensó que las señales observadas en nuestros análisis fueron específicas.

Aunque el número de “ufp” que se plaquearon para cada búsqueda en los bancos fué el indicado (de acuerdo al tamaño del genoma, tamaño de los insertos clonados, etc), algunas de las razones por las que no se pudieron detectar clonas positivas en los tamizados pudo ser una baja actividad específica en la sonda utilizada. Otra razón es que posiblemente el gen o cDNA homólogo a Grb2 no estuviera representado en el banco, o bien se hubiera perdido durante la re-amplificación del banco, en el caso del banco de DNA genómico. Es probable que al incrementar la actividad específica de la sonda, o bien al utilizar una sonda homóloga como pudiera ser un producto de PCR del mismo frijol, se favorezca la obtención de clonas positivas con una secuencia similar a Grb2.

Aunque los resultados de las búsquedas en los bancos de frijol y amplificaciones por PCR fueron infructuosos, los análisis por hibridación tipo Southern y northern mostraron que en el RNA de hoja y DNA genómico de frijol existen secuencias que podrían ser homólogas a esta proteína involucrada en la transducción de señales, Grb2.

6.2 Identificación de dos proteínas en ejes embrionarios de frijol con distintos anticuerpos anti-Grb2.

Como se describió en los resultados, los anticuerpos anti-p30 reconocieron en ejes embrionarios de frijol a una proteína de 30 kDa (**Fig. 7** carril 4), mientras que los anticuerpos comerciales anti-Grb2 reconocieron a la misma fracción de 30 kDa, y además una proteína de 36

kDa (**Fig. 18 B**, carril 2) en el mismo tejido. Los anticuerpos anti-p30 fueron purificados contra la proteína Grb2 nativa mediante una columna de afinidad en el laboratorio de la Dra. E. Bearer, Brown University; mientras que los anticuerpos anti-Grb2 se obtuvieron contra un péptido de 27 aminoácidos correspondientes a la región carboxilo terminal de Grb2. Es probable que la secuencia que corresponde al péptido o secuencias similares a éste, se encuentren presentes en varias proteínas y por ello los anticuerpos anti-Grb2 reconocen dos proteínas en el eje embrionario.

Con el objetivo de determinar la especificidad en la reacción de los anticuerpos anti-Grb2, se decidió purificar por inmunoabsorción a los anticuerpos comerciales anti-Grb2. La purificación de los anticuerpos se realizó contra la proteína de 36 kDa del eje embrionario de frijol, y por otro lado, contra la proteína Grb2 de plaquetas; posteriormente se probaron en un extracto de plaquetas y de ejes embrionarios de frijol respectivamente. El resultado mostró que el reconocimiento de los anticuerpos fué específico para ambas proteínas (**Fig. 19**), y que las dos proteínas pueden compartir el mismo epítotope que reconocen los anticuerpos anti-Grb2; por lo tanto, al purificar los anticuerpos contra la proteína de 36 kDa estos también reconocieron a la proteína Grb2 de plaquetas, y viceversa. Estos resultados sugieren, que tal vez hay una secuencia o dominio similar a Grb2 que esté localizado en más de una proteína que pudiera o no, ser homóloga a Grb2. El hecho de que no se logró detectar la proteína de 30 kDa en el extracto de eje embrionario, pudo deberse a la baja concentración obtenida de anticuerpos purificados contra Grb2 de plaquetas. Por lo que es probable que al incrementar la concentración de los anticuerpos o al aumentar la concentración de proteínas de este tejido, éstos también reconozcan a la proteína de 30 kDa presente en el eje embrionario.

6.3 Ensayos de afinidad de las proteínas de 30 y 36 kDa a columnas de poli-L-prolina y fosfotirosinas.

La proteína Grb2 de animales puede interaccionar con regiones ricas en prolina a través de sus dominios SH3; se ha reportado que los dominios SH3 de Grb2 prefieren ligandos con aminoácidos básicos en el extremo carboxilo terminal de péptidos ricos en prolina (Sparks *et al.*, 1996). Bearer *et al.*, (2000), reportó un ensayo de unión a poli-L-prolina donde se analizó la interacción de profilina, VASP y Grb2 de plaquetas de humano en una columna de poli-L- prolina y una de sus conclusiones es que Grb2 puede interaccionar directamente con la poli-L-prolina. Basados en éste ensayo de afinidad, se utilizaron condiciones muy similares para probar la interacción de las proteínas reportadas en el presente trabajo. Debido a que ambas proteínas se detectaron en el volumen que no se une a la columna, y no en las fracciones correspondientes a la elución de la misma; el resultado de nuestro ensayo indicó que las proteínas de 30 y 36 kDa presentes en el eje embrionario, no interaccionan directamente con la poli-L-prolina bajo estas condiciones (**Fig. 20**)

Dentro de las características de Grb2 también se encuentra su capacidad de interactuar con proteínas que poseen tirosinas fosforiladas, a través de su dominio SH2. Se sabe que la unión al fosfopéptido se lleva a cabo por dos regiones en el dominio SH2, una de ellas reconoce a la tirosina fosforilada, mientras que la otra reconoce los residuos que se encuentran inmediatamente hacia el extremo carboxilo terminal de la tirosina fosforilada (Pascal *et al.*, 1994). Las condiciones en que se realizó el ensayo se consideran favorables para mantener la fosforilación de la tirosina y así permitir su posible interacción con otras proteínas. Debido a que las proteínas de 30 y 36 kDa se detectaron en el volumen que no se une a la columna, y no en las fracciones correspondientes a la elución de la misma; el resultado de nuestro ensayo indicó que las proteínas de 30 y 36 kDa no tuvieron afinidad a fosfotirosinas bajo estas condiciones (Fig. 21). Los resultados obtenidos en ambos ensayos nos indican que probablemente las proteínas de 30 y 36 kDa no son homólogas a Grb2. Es probable que las proteínas de 30 y 36 kDa posean epítopes comunes que representan regiones similares a Grb2, y por ello los anticuerpos anti-Grb2 las pueden reconocer. Por lo tanto, las proteínas inmunodetectadas con anticuerpos anti-Grb2 corresponden a otro tipo de proteínas con una posible secuencia común en proteínas relacionadas con la transducción de señales en plantas.

6.4 Purificación y secuencia parcial de aminoácidos de la proteína de 36 kDa.

Una vez determinado que ninguna de las dos proteínas poseía propiedades que sugirieran que fuera un homólogo de Grb2, pero intrigados por el reconocimiento aparentemente específico de los anticuerpos anti-Grb2, decidimos averiguar su secuencia. Debido a la relativa abundancia de la proteína de 36 kDa respecto a la de 30 kDa decidimos enfocarnos en la purificación de la primera. La proteína de 36 kDa fue enriquecida y purificada parcialmente después de pasar un extracto de ejes embrionarios por una columna de intercambio aniónico (Fig. 23). Este proceso permitió cortar la banda correspondiente y enviarla a la Universidad de Harvard para el análisis de su secuencia parcial de aminoácidos. El resultado obtenido después de un análisis por espectrometría de masas y degradación de Edman fue la secuencia parcial de varios péptidos, los cuales tuvieron similitud con un mínimo de cuatro diferentes proteínas (Figs. 24-27). El aspecto interesante de este resultado fue la identificación de una proteína con posible similitud a varias cinasas de tirosina tipo Src o con homología a Src (Fig. 27). Las proteínas cinasas Src se caracterizan por tener dominios SH2-SH3 en su secuencia de aminoácidos, son específicas para la fosforilación de tirosinas y participan en procesos como la diferenciación, migración y proliferación celular en células animales (Klint *et al.*, 1999; Timokhina *et al.*, 1998). Esta información podría explicar los resultados obtenidos en las inmunodetecciones con los anticuerpos anti-Grb2. Para poder comprobar que la posible proteína con similitud a la cinasas de tipo Src en ejes embrionarios de frijol, corresponde a la proteína inmunodetectada por los anticuerpos anti-

Grb2, se tendrá que separar a ésta proteína del resto de las proteínas que co-migran en la banda de 36 kDa, o bien obtener la secuencia nucleotídica que codifica para ella.

También llama la atención, la identificación de una proteína con similitud a la subunidad β de una proteína G heterotrimérica de *G. max* (Fig. 24), así como un precursor de la proteína fitohemaglutinina eritroaglutinante (PHA-E) de *P. vulgaris* (Fig. 25). Las proteínas G heterotriméricas modulan una gran variedad de procesos de señalización en todas las células eucariotas; aunque el mecanismo de acción de estas proteínas en plantas aún no está claro. Numerosos estudios moleculares y funcionales apoyan el papel de las proteínas G heterotriméricas en varios procesos de transducción de señales en plantas; entre otros: la regulación de la apertura estomatal, señalización de factores nod, transducción de luz roja y azul, expresión genética relacionada con patógenos y señalización de hormonas (Bischoff *et al.*, 1999). Por otro lado, las lectinas PHA-E participan en el tráfico de glucoproteínas y glucolípidos en las células vegetales; Rebbaa *et al.*, (1996) mostró la interacción entre una proteína PHA-E de frijol y una secuencia de oligosacáridos presentes en el receptor del EGF de células de humano. Estos antecedentes sugieren que las posibles proteínas identificadas en la secuencia parcial de aminoácidos pueden tener un importante papel en la transducción de señales al inicio de la germinación en *Phaseolus vulgaris*.

6.5 Análisis de la distribución de la proteína de 36 kDa en distintos tejidos y durante el inicio de la imbibición de ejes embrionarios en *P. vulgaris*.

Con el objetivo de analizar el patrón de expresión de la proteína de 36 kDa, se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos anti-Grb2 (utilizados como un método de detección) en diferentes tejidos de frijol y en una cinética de imbibición con ejes embrionarios de la misma planta. El resultado mostró que las proteínas de 30 y 36 kDa se detectan preferentemente en el eje embrionario de la semilla (Fig. 28). Por otro lado, se pudo detectar una disminución en la expresión de la proteína de 36 kDa a medida que avanza la imbibición (Fig. 29). En las primeras horas después de haber iniciado la imbibición ocurre la inducción del metabolismo y en consecuencia, se activan procesos como la degradación de proteínas de almacenamiento necesarias para soportar el crecimiento y desarrollo de la plántula. Entre las proteínas que disminuyen su expresión al inicio de la imbibición se encuentran las proteínas LEA (Colmenero-Flores *et al.*, 1997), y una cinasa similar a MAPK en semillas de cebada que disminuye su expresión al iniciar la germinación (Testerink *et al.*, 2000). Por otro lado se han reportado proteínas cuya expresión se activa al inicio de la imbibición como es el caso de la actina de *P. vulgaris* (Villanueva *et al.*, 1999), y una cinasa básica de la mielina en semillas de cebada (Testerink *et al.*, 2000).

Como se indicó en los resultados, una de las cuatro posibles proteínas que co-migran en la banda de 36 kDa corresponde a una proteína LEA (Fig. 26). Las proteínas LEA se caracterizan

por su expresión durante la desecación de la semilla, por lo que no se puede descartar que la proteína inmunodetectada con anticuerpos anti-Grb2 en el eje embrionario de frijol, corresponda a esta proteína LEA debido a las características de su expresión en la semilla y durante el inicio de la imbibición (Fig. 28 y 29); aunque también existe la posibilidad de que la proteína inmunodetectada corresponda a cualquiera de las otras proteínas identificadas en la secuencia parcial de aminoácidos.

6.6 Purificación y secuencia parcial de aminoácidos de una proteína de 34 kDa con afinidad a fosfotirosinas.

Después de realizar un ensayo de unión a fosfotirosinas, se detectó en la elución de la columna una proteína parcialmente pura con un peso molecular de 34 kDa (Fig. 21 A, carril 4). Debido a nuestro interés en la identificación de proteínas relacionadas con la transducción de señales, se decidió cortar la banda correspondiente a ésta proteína y enviarla a la U. de Harvard para el análisis de su secuencia parcial de aminoácidos (Fig. 31). El resultado obtenido de éste proceso fué la secuencia de dos péptidos que tienen homología con una probable proteína relacionada con la desecación en *Arabidopsis thaliana*.

Es muy posible que esta proteína de 34 kDa sea importante para el embrión y se encuentre relacionada con la desecación, puesto que muchos de los genes que se han aislado en condiciones de estrés hídrico en plantas tolerantes a la desecación como *C. plantagineum*, tienen una alta identidad con genes que se expresan en las semillas de otras especies (Ingram y Bartels 1996). La secuencia parcial de aminoácidos de la proteína de 34 kDa posee una menor identidad con una proteína de respuesta a ABA en la planta de resurrección *C. plantagineum*; este antecedente sugiere que la expresión de la proteína de 34 kDa puede estar modulada por ABA, lo cual también es característico de los cDNAs que codifican para proteínas LEA y que se expresan en condiciones de desecación, como se ha descrito para *P. vulgaris* (Colmenero-Flores *et al.*, 1997) y otras plantas (Finkelstein 1993; Moons *et al.*, 1997). Una posible función de p34 en la semilla puede ser similar a la de las proteínas LEA, las cuales participan en la protección celular durante la desecación.

La característica de afinidad a fosfotirosinas de la proteína de 34 kDa debe tomarse con precaución, debido a que las proteínas relacionadas con la desecación que tienen similitud con esta proteína, no poseen regiones o secuencias similares a dominios SH2 (necesarios para el reconocimiento de la fosfotirosina). Sin embargo, se debe conocer la secuencia completa de aminoácidos, o bien la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de 34 kDa, para poder determinar si realmente hay alguna region con similitud a dominios SH2, lo cual podría explicar los resultados de la interacción con tirosinas fosforiladas. Es posible que existan otras proteínas que pueden unirse a fosfotirosinas y que se encuentren en el extracto total de embrión, el cual no fué analizado en este ensayo. Otra posibilidad es que la proteína de 34 kDa haya interactuado de

forma indirecta, es decir a través de otra proteína que se unió a las tirosinas fosforiladas de la columna.

Es importante resaltar que al obtener la secuencia parcial de aminoácidos de estas proteínas se podrán diseñar oligonucleótidos que nos permitan obtener al gen que codifica para cada una de ellas en *P. vulgaris*. También se podrán diseñar péptidos específicos para posteriormente generar anticuerpos contra cada una de las proteínas. La importancia de estos futuros experimentos radica en definir cómo participan diversas proteínas involucradas en la transducción de señales y el posible papel de las proteínas de 34 y 36 kDa en estos eventos durante la germinación en *P. vulgaris*.

VII

CONCLUSIONES

- Anticuerpos purificados contra Grb2 reconocen dos proteínas con un peso molecular de 30 y 36 kDa, en el eje embrionario de semillas maduras de frijol.
- Los resultados del análisis tipo Southern y northern indican la presencia de regiones similares a Grb2 en el DNA genómico y RNA total de hoja de frijol, respectivamente.
- Las proteínas de 30 y 36 kDa reconocidas por anticuerpos anti-Grb2 no presentan la característica de afinidad por poli-L-prolina o tirosinas fosforiladas, en las condiciones establecidas, por lo que no poseen propiedades similares con Grb2.
- El análisis de la secuencia parcial de aminoácidos, correspondiente a la proteína de 36 kDa, sugiere que los péptidos obtenidos corresponden a un mínimo de cuatro diferentes proteínas, entre las cuales se encuentra una cinasa tipo Src o con homología a Src; la subunidad β de una proteína de unión a nucleótidos de guanina de *G. max*, una proteína LEA D-34 de *G. hirsutum* y un precursor de fitohemaglutinina eritroaglutinante de *P. vulgaris*.
- Ensayos de inmunodetección mostraron que la proteína de 36 kDa se encuentra preferentemente en el eje embrionario de la semilla de frijol.
- Una proteína de 34 kDa localizada en el eje embrionario de frijol, presentó la característica de afinidad a fosfotirosinas. El análisis de la secuencia parcial de aminoácidos de esta proteína, sugiere que los péptidos obtenidos presentan similitud con una probable proteína relacionada con la desecación en *Arabidopsis thaliana*.

VIII

PERSPECTIVAS

- Con base en la secuencia parcial de aminoácidos, diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias representativas de los genes que codifican para la posible proteína con similitud a una cinasa Src, la proteína relacionada con la desecación, y las otras proteínas identificadas en el genoma de *Phaseolus vulgaris*.
- Obtener anticuerpos específicos contra péptidos que correspondan a la secuencia de aminoácidos de la posible proteína cinasa Src, la proteína relacionada con la desecación en frijol y las otras proteínas identificadas.
- **Analizar** la distribución de ambas proteínas en diferentes etapas de la embriogénesis y germinación, mediante ensayos de inmunodetección y/o inmunolocalización.
- Analizar la función de la posible proteína tipo Src de frijol, mediante la microinyección celular de anticuerpos específicos que bloqueen la actividad de cinasa de tirosina de esta proteína.
- Transformar plantas de *Arabidopsis* con DNA anti-sentido de los genes que codifican para las posibles proteínas identificadas en frijol.

IX

REFERENCIAS

- Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. Garland Publ. Inc. New York-London. 1294 pp.
- Amano M.**, Chihara K., Kimura K., Fukata Y., Nakamura N., Matsuura Y. y Kaibuchi K. 1997. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*. 275: 1308-1311.
- Amrein K.E.**, Panholzer B., Flint N.A., Bannwarth W. y Burn P. 1993. The Src homology 2 domain of the protein-tyrosine kinase p56lck mediates both intermolecular and intramolecular interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:10258-10289.
- Anderson D.**, Koch C.A. Grey L., Ellis C., Moran M. F., y Pawson T. 1990. Binding of SH2 domains of phospholipase C γ 1, GAP, and src to activated growth factor receptors. *Science*. 250:979-982.
- Ausubel F.M.**, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y Struhl K. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Bearer E.L.**, Frackelton R., Dunaway S., Knowles R., Jaffe H. y Allen P. 1996. A complex of platelet proteins that bind profilin and effect actin polymerization. *Supplement to Molecular Biology of the Cell*. 7: 545a.
- Bearer E.L.**, Prakash J.M., Manchester R.D y Allen P.G. 2000. VASP protects actin filaments from gelsolin: An *in vitro* study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 47(4): 351-64.
- Bio-Rad**. 1994. Life Science Research Products. Bio-Rad Laboratories. 372 pp.
- Bischoff F.**, Molendijk A., Rajendrakumar C.S. y Palme K. 1999. GTP-binding proteins in plants. *Cell. Mol. Life Sci*. 55(2): 233-256.
- Blatt M.R.** 2000. Ca²⁺ signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 3(3): 196-204.
- Bochmann H.**, Gehrlich S. y Jaross W. 1999. The gene structure of the human growth factor bound protein Grb2. *Genomics*. 56: 203-207.
- Bogre L.**, Calderini O., Merskiene I., y Binarova P. 2000. Regulation of cell division and the cytoskeleton by mitogen-activated protein kinases in higher plants. *Results Probl. Cell Differ*. 27: 95-117.
- Bolwell P.G.** 1995. Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *Trends Biochem. Sci*. 20: 492-495.

- Bowler C.** y Chua N. 1994. Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell*. 6: 1529-1541.
- Bowler C.**, Neuhaus G., Yamagata H. y Chua N.H. 1994. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*. 77: 73-81.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 22:248
- Braun D.M.** y Walker J.C. 1996. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem. Sci.* 242: 70-73.
- Bringloe D.H.**, Rao S.K., Dyer T.A., Raines C.A. y Bradbeer J.W. 1996. Differential gene expression of chloroplast and cytosolic phosphoglycerate kinase in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 30(3): 637-640.
- Bush D.S.** 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95-122.
- Cary L.A.** y Guan J.L. 1999. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Frontiers in Bioscience*. 4:d102-113.
- Chang C.** 1996. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm?. *Trends Biochem. Sci.* 21: 129-133.
- Chasan R.** 1995. Signalling a role for phospholipid-derived compounds in plants. *Plant Cell*. 7: 1971-1974.
- Chen J.K.**, Lane W.S., Brauer A.W., Tanaka A. y Schreiber S.L. 1993. Biased combinatorial libraries: Novel ligands for the SH3 domain of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 1291-1292.
- Cheng A.M.**, Saxton T.M., Sakai R., Kulkarni S., Mbamalu G., Vogel W., Tortorice C.G., Cardiff R.D., Cross J.C., Muller W.J., y Pawson T. 1998. Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell*. 95: 793-803.
- Clark S.E.**, Williams R.W. y Meyerowitz E.M. 1997. The CLAVATA 1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*. 89: 575-585.
- Cohen G.B.**, Ren R. y Baltimore D. 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*. 80: 237-248.
- Colmenero-Flores J.M.**, Campos F., Garcarrubio A. y Covarrubias A.A. 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant. Mol. Biol.* 35(4): 393-405.
- Conway L.J.** y Poething R.S. 1997. Mutations of *Arabidopsis thaliana* that transform leaves into cotyledons. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 10209-10214.
- Coté G.G.** y Crain. R.C. 1993. Biochemistry of phosphoinositides. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 333-356.

- Darnell J.**, Lodish H., y Baltimore D. 1995. *Molecular Cell Biology*. Freeman. New York. 1105 pp.
- Davies P.J.** 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Editors. 2n edit. p 206-211.
- De Wit P.J. G.M.** 1992. Molecular characterization of gene for gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 391-418.
- Divecha N.** e Irvine R.F. 1995. Phospholipid signaling. *Cell.* 80: 269-278.
- Ecker R.J.** 1997. BRI-ghtening the pathway to steroid hormone signaling events in plants. *Cell:* 90: 825-827.
- Feng S.**, Chen J.K., Yu H., Simon J.A. y Schreiber S. 1994. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: Development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science.* 266: 1241-1247.
- Ferreira C.V.**, Taga E.M. y Aoyama H. 2000. Inhibition of acid phosphatase isoforms purified from mature soybean (*Glycine max*) seeds. *J. Enzyme Inhib.* 15(4): 403-410.
- Finkelstein R.R.** 1993. Abscisic acid-insensitive mutations provide evidence for stage-specific signal pathways regulating expression of an *Arabidopsis* late embryogenesis-abundant (lea) gene. *Mol. Gen Genet.* 238(3): 401-8.
- Firth J.D.**, Ebert B.L., Pugh C.W. y Ratcliffe P.J. 1994. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(14): 6496-6500.
- Furuya M.** y Schafer E. 1996. Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci.* 1: 301-306.
- Gomez-Cadenas A.**, Verhey S.D., Holappa L.D., Shen Q., Ho T.H. y Walker-Simmons M.K. 1999. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(4): 1767-72.
- Grabski S.**, Guang X.X., Holland J.F. y Schindler M. 1994. Lipids trigger changes in the elasticity of the cytoskeleton in plant cells: A cell optical displacement assay for live cell measurements. *The Journal of Cell Biology.* 126 (3): 713-726.
- Gray W.M.**, del Pozo J.C., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W.L., Yang M., Ma H. y Estelle M. 1999. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 13: 1678-1691.
- Harada J.J.** 1999. Signaling in plant embryogenesis. *Curr. Opin Plant Biol.* 2(1): 23-7.
- Hardie D.G.** 1999. Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 97-131.
- Hardtke C.S.**, Gohda K., Osterlund M.T., Oyama T., Okada K. y Deng X.W. 2000. HY5

- stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.* 19(18):4997-5006.
- Harmon A.C.** 1997. The calcium connection. *Trends Plant Sci.* 2: 121-122.
- Harper J.F.,** Susman M.R., Schaller G.E., Putnam-Evans C., Charbonneau H. y Harmon A.C. 1991. A calcium dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science.* 252: 951-954.
- Hayashi K.,** Inoguchi M., Kondo H y Nozaki H. 2000. Gibbestatin B inhibits the GA-induced expression of alpha-amylase expression in cereal seeds. *Phytochemistry.* 55(1): 1-9.
- Holappa L.D.** y Walker-Simmons M.K. 1997. The wheat protein kinase gene, *TaPK3*, of the *PKABA1* subfamily is differentially regulated in greening wheat seedlings. *Plant Mol. Biol.* 33:935-941.
- Hong S.W.,** Jon J.H., Rwak J.M. y Nam P. 1997. Identification of a receptor like kinase and rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 113: 1203-1212.
- Hong-Yan L.** y Gray J.E. 1997. Pollination-enhanced expression of a receptor-like protein kinase related gene in tobacco styles. *Plant. Mol. Biol.* 33:653-665.
- Hsing Y.C.,** Chen Z.Y., Shih M.D., Hsieh J.S. y Chow T. Y. 1995. Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Mol. Biol.* 29(4): 863-8.
- Huber S.C.** y Huber J.L. 1995. Metabolic activators of spinach leaf nitrate reductase : effects on enzymatic activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. *Planta.* 196: 180-189.
- Ingram J.** y Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 47: 377-403.
- Irvine R.** y Cullen P. 1996. Intracellular signalling: inositol phosphates-Whither bound? *Curr. Biol.* 6: 537-540.
- Ishitani M.,** Xiong L., Stevenson B. y Zhu J.K. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell.* 9: 1935-1949.
- Jang J.C.,** León P., Zhou L. y Sheen J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell.* 9: 5-19.
- Jeffrey P.D.,** Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J. y Pavletich N.P. 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature.* 376: 313-320.
- Jonak C.,** Kiegerl S., Ligterink W., Barker P.J., Huskisson N.S. y Hirt H. 1996. Stress signalling in plants: A MAP kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11274-11279.

- Kaiser D.A.**, Goldschmidt-Clermont P.J., Levine P.J. y Pollard T.D. 1989. Characterization of renatured profilin purified by urea elution from Poly-L-Proline agarose columns. *Cell Motil. Cytoskel.* 14: 251-262.
- Kashem M.A.**, Itoh K., Iwabuchi S., Hori H y Mitsui T. 2000. Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of alpha-amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 41(4): 399-407.
- Klint P.**, Kanda S., Kloog Y.y Claesson-Welsh L. 1999. Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene.* 18(22):3354-64.
- Kretsinger R.H.** 1990. Why cells must export calcium. In: Intracellular calcium regulation, (Ed. F. Bronner), Wiley-Liss.p. 439-457.
- Laemmli U.K.**1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.).* 227:680-685.
- László B.** 1999. Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1422: 187-204.
- Lee J.W.**, Zhang Y., Weaver C.D., Shomer N.H., Louis C.F. y Roberts D.M. 1995. Phosphorylation of nodulin 26 on serine 262 affects its voltage-sensitive channel activity in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 270: 27051-57.
- Leyser H.M.**, Lincoln C.A., Timpte C., Lammer D., Turner J. y Estelle M. 1993. *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature.* 364: 161-164.
- Li H.**, Ko H.P. y Whitlock J.P. 1996. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Amt and HIF1 alpha. *J. Biol. Chem.* 271(35): 21262-7.
- Lin Y.**, Wang Y., Zhu J.-K. y Yang Z. 1996. Localization of a Rho GTPase implies a role in tip growth and movement of the generative cell in pollen tubes. *Plant Cell.* 8: 293- 303.
- Lindberg U.** Schutt C.E., Hellsten E., Tjäder A.C. y Hult T. 1988. The use of poly (L-proline)-sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 967: 391-400.
- Lotan T.**, Ohto M., Yee K.M., West M.A.L., Lo R., Kwong R.W., Yamagishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B. y Haradda J.J. 1998. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell.* 93: 1195- 1205.
- Lowenstein E.J.**, Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. y Schlessinger, J. 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell.* 70: 431-442.
- Lu W.**y Mayer B.J. Submitted (17-FEB-1997). HHMI/Molecular Medicine Children's Hospital. 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA.
- Mauseth J.D.** 1998. Botany an introduction to Plant Biology. Multimedia enhanced edition.

Jones and Bartlett Publishers. Sudbury Massachusetts. 794 pp.

Mc Curdy D.D. y Williamson R.E. 1991. Actin and actin-associated proteins. The cytoskeletal basis of plant growth and form. Editor: Lloyd Clyve W. Academic Press. San Diego.

Meinke D.W. 1995. Molecular genetics of plant embryogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 369-394.

Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H. y Shinozaki K. 1993. ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 336: 440-446.

Mizoguchi T., Ichimura K y Shinozaki K. 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol.* 15: 15-19.

Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Haayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K. y Shinozaki K. 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 765-769.

Møller S.G. y Chua N. 1999. Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J.Mol.Biol.* 293: 219-234.

Moons A., De Keyser A. y Van Montagu M. 1997. A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress. *Gene.* 191(2): 197-204.

Moore R., Clark W.D., Vodopich D.S., Stern K.R. y Lewis R. 1998. Botany in: Reproductive morphology of flowering plants. 2nd Ed. WCB/ Mc Graw Hill Inc. USA. p.383-412.

Morton C.J. y Campbell I.D. 1994. Molecular "velcro". *Current Biology.* 4(7): 615-617.

Naoyuki I. Masaaki I., Takeshi N., y Masaki I. 1994. Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends Biochem. Sci.* 19: 448-452.

Németh K., Salchert K., Putnoky P., Bhalerao R., Koncz-Kálmán Z., Stankovic-Stangeland B., Bakó L., Mathur J., Ökrész L., Stabel S., Geigenberger P., Stit M., Rédei G.P., Schell J. y Koncz C. 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 12: 3059-3973.

Neuhaus G., Bowler C., Kern R. y Chua N. 1993. Calcium / calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell.* 73: 937-952.

Nishihama R., Banno H., Shibata W., Hirano K., Nakashima M., Usami S. y Machida Y. 1995. Plant homologues of components of MAPK (mitogen-activated protein kinase) signal pathways in yeast and animal cells. *Plant Cell Physiol.* 36: 749-757.

Olivier J.P., Raabe T., Henkemeyer M., Dickson B., Mbamalu G., Margolis B., Schlessinger J., Hafen E. y Pawson T. 1993. A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell.* 73: 179-191.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Orvar B.L.**, Sangwan V., Omann F. y Dhindsa R.S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant. J.* 23(6): 785-94.
- Pascal S.M.**, Singer A.U., Gish G., Yamazaki T., Shoelson S.E., Pawson T., Kay L.E. y Forman-Kay J. D. 1994. Nuclear magnetic resonance structure of an SH2 domain of phospholipase C γ 1 complexed with a high affinity binding peptide. *Cell.* 77: 461-472.
- Pawson T.** 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 373: 573-580.
- Pedros A.R.**, McLeod M.R., Ross H.A., McRae D., Tiburcio A.F., Davies H.V. y Taylor M.A. 1999. Manipulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers. An increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution. *Planta.* 209(1): 153-160.
- Pei Z.M.**, Ward J.M., Harper J.F. y Schroeder J.I. 1996. A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J.* 15: 6564-74.
- Pellicci G.**, Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti L., Grignani F., Pawson T., Pellicci P.G. 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* 70: 93-104.
- Peskan T.** y Oelmüller R. 2000. Heterotrimeric G-protein β -subunit is localized in the plasma membrane and nuclei of tobacco leaves. *Plant Molecular Biology.* 42: 915-922.
- Raghuram N.**, Chandok M.R., Sopory S.K. 1999. Light regulation of nitrate reductase gene expression in maize involves a G-protein. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2(2): 86-90.
- Rebbaa A.**, Yamamoto H., Moskal J.R. y Bremer E.G. 1996. Binding of erythroagglutinating phytohemagglutinin lectin from *Phaseolus vulgaris* to the epidermal growth factor receptor inhibits receptor function in the human glioma cell line. *J Neurochem.* 67(6):2265-72.
- Ruegger M.**, Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J. y Estelle M. 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* 12: 198-207.
- Sambrook J.**, Fritsch E.F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schenk P.W.** y Snaar-Jagalska B.E. 1999. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1449: 1-24.
- Schlessinger J.** 1994. SH2/SH3 signaling proteins. *Current Opinion in Genetics and Development.* 4: 25-30.
- Seo S.**, Sano H. y Ohashi Y. 1999. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell.* 11: 289-298.
- Sheen J.** 1994. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell.* 2: 1027-1038.

- Shinozaki K.** y Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Simon J.A.** y Shreiber S.L. 1995. Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Curr. Biol.* 2: 53-60.
- Soderman E.M.,** Brocard I.M., Lynch T.J y Finkelstein R.R. 2000. Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive 4 gene in seed and abscisic acid response signal networks. *Plant Physiol.* 124 (4): 1752-65.
- Songyang Z.,** Shoelson S.E., Chaudhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W.G., King F., Roberts T., Ratnofsky S., Lechleider R.J., Neel B.G., Birge R.B., Fajardo J.E., Chou M.M., Hanafusa H., Schaffhausen B. y Cantley L.C. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* 72: 767-778.
- Sparks A.B.,** Rider J.E., Hoffman N.G., Fowlkes D.M., Quillam L.A. y Kay B.K. 1996. Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20;93(4):1540-4.
- Spiteri A.,** Viratelle O.M., Raymond P., Rancillac M. Labouesse J. y Pradet A. 1989. Artfactual origins of cyclic AMP in higher plant tissues. *Plant Physiol.* 91:624-628.
- Stever C.M.** y Mc Court P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125 (2): 763-769.
- Suen K.,** Bustelo X.R., Pawson T. y Barbacid M. 1993. Molecular cloning of the mouse grb2 gene: differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5500-5512.
- Sudeep K.B.** y Veena T. 1998. Induction of a germination specific, low molecular weight, acid phosphatase isozyme with specific phosphotyrosine phosphatase activity in lentil (*Lens esculenta*) seeds. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 250: 629-634.
- Sudhir K.S.** y Munshi M. 1998. Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 17(3): 245-318.
- Sun H.** y Tonks N.K. 1994. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signalling. *Trends Biochem. Sci.* 19: 480-484.
- Szymkowiak E.J.** y Sussex I.M. 1996. What chimeras can tell us about plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 351-376.
- Takai Y.,** Sasaki T., Tanaka K. y Nakasishi H. 1995. Rho as regulator of the cytoskeleton. *TIBS.* 20: 227-231.
- Testerink C.,** Vennik M., Kijne J.W., Wang M. y Heimovaara-Dijkstra S. 2000. Inactivation of a MAPK-like protein kinase and activation of a MBP kinase in germinating barley embryos. *FEBS Lett.* 484(1):55-9.
- Timokhina I,** Kissel H., Stella G. y Besmer P. 1998. Kit signaling through PI 3-kinase and Src

kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J.* 17(21):6250-62.

Tomlinson M.G., Lin J. y Weiss A. 2000. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. *Immunology Today.* 21(11):584-591.

Torii K.U., Mitsukawa N., Osumi T., Matsuura Y., Yokoyama R., Whittier R.F., Komeda Y. 1996. The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell.* 8(4):735-46.

Trewavas A.J. y Malhó R. 1997. Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. *Plant Cell.* 9: 1181-1195.

Trotochaud A.E., Hao T., Wu G., Yang Z. y Clark S.E. 1999. The CLAVATA 1 receptor-like kinase requires CLAVATA 3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and Rho-related protein. *Plant Cell.* 11: 393-405.

Vera-Estrella R., Barkla B.J., Higgins V.J. y Blumwald E. 1994a. Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* 104: 209-215.

Vera-Estrella R., Barkla B.J., Higgins V.J. y Blumwald E. 1994b. Plant defense response to fungal pathogens II. G-protein mediate changes in host plasma membrane redox reaction. *Plant Physiol.* 106: 97-102.

Vidali L., Perez H.E., Valdez L.V., Noguez R. Zamudio F. y Sánchez F. 1995. Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *P. vulgaris*. *Plant Physiol.* 108: 115-123.

Villanueva M.A., Campos F., Diaz C., Colmenero-Flores J.M., Dantán E., Sánchez F. y Covarrubias A. 1999. Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *PLANTA* 207(4): 582-589.

Wasenius V.M., Merilainen J. y Lehto V.P. 1993. Sequence of a chicken cDNA encoding a GRB2 protein. *Gene.* 134(2): 299-300.

Wenzel C.L., Williamson R.E. y Wasteneys G.O. 2000. Gibberellin-induced changes in growth anisotropy precede gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin-responsive dwarf mutant, M489. *Plant Physiol.* 124(2): 813-822.

Yu H., Chen J.K., Feng S., Dalgarno D.C., Brauer A.W. y Scheiber S.L. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell.* 76: 933-945.

Zhang S. y Klessing D. 1998. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *phytophthora* spp. *Plant Cell.* 10: 435-449.