

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN cDNA
QUE SE INDUCE POR DEFICIENCIA DE FOSFATO
EN RAÍCES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA GALICIA VÁZQUEZ



EXAMENES PROFESIONALES
México, D. F. FACULTAD DE QUÍMICA 2005

m339764



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente Profra. Alicia Cervantes Peredo
Vocal Profra. María Eugenia Torres Márquez
Secretario Profra. Martha Patricia Coello Coutiño
1er. Suplente Profra. Gloria Gutiérrez Venegas
2º. Suplente Profra. Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

Departamento de Bioquímica, Conjunto E
Facultad de Química.

Asesor:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño



Sustentante:

Gabriela Galicia Vázquez



A mis padres, Lolita y Roge, quienes me regalaron la existencia e incondicionalmente me acompañan

A mi hermanita, la pequeña Llanís, con quien comparto día a día mi caminar

A mi familia

y amigos...

Quienes han estado conmigo y siempre me apoyan para
alcanzar mis sueños

Gracias por creer en mí y en todo lo que puedo lograr

Los quiero mucho

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Coello por su asesoría y comprensión.

A la Maestra Ma. del Carmen Parra gracias por su guía y sus valiosos consejos.

A los miembros del jurado por su asesoría y orientación.

A mis compañeros de Laboratorio por su ayuda y apoyo, especialmente a Selene, Lili y Yola

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 <i>Fósforo</i>	2
2.2 <i>Deficiencia de fosfato en el suelo</i>	6
2.3 <i>Síntomas de deficiencia de fosfato en plantas</i>	6
2.4 <i>Respuestas a la deficiencia de fosfato</i>	7
Morfológicas	8
Modificación de la arquitectura de la raíz	8
Pelos radicales	9
Raíces proteoides	9
Bioquímicas	10
Secreción de ácidos orgánicos	10
Fosfatasas	12
Alcalinas	12
Ácidas	13
Transportadores de fosfato	14
2.5 <i>Regulación genética en microorganismos (Regulón Pho)</i>	17
Regulón Pho en bacterias (<i>Escherichia coli</i>)	17
Regulón Pho en levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	20
2.6 <i>Regulón pho en plantas</i>	23
3. Justificación	26
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1 <i>Objetivo General</i>	28
5.2 <i>Objetivos Específicos</i>	28
6. Materiales y Métodos	29
6.1 <i>Material Biológico</i>	29
6.2 <i>Preparación y electroforesis de geles de agarosa al 1%</i>	29
6.3 <i>Extracción y aislamiento de RNA</i>	30
6.4 <i>Cuantificación de RNA</i>	30
6.5 <i>Extracción y aislamiento de DNA</i>	31
6.6 <i>Cuantificación de DNA</i>	31
6.7 <i>Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción</i>	32

6.8	<i>Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción</i>	32
6.9	<i>Transformación</i>	32
6.10	<i>Aislamiento de DNA plasmídico</i>	33
6.11	<i>Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa al 1%</i>	33
6.12	<i>Transferencia tipo Northern</i>	33
6.13	<i>Transferencia tipo Southern</i>	34
6.14	<i>Escrutinio de la biblioteca de cDNA de raíces de frijol</i>	34
6.15	<i>Hibridación</i>	35
6.16	<i>Escrutinios consecutivos</i>	36
6.17	<i>Escisión de fagos</i>	36
6.18	<i>Secuenciación de clonas</i>	37
7.	Resultados	38
7.1	<i>Clona 15.2</i>	38
	Descripción de la clona 15.2	38
	Expresión diferencial de la clona 15.2 en deficiencia de PI	39
	Análisis de la secuencia de la clona 15.2	41
7.2	<i>Obtención de la clona R15.2</i>	42
	Escrutinio de la Biblioteca de cDNA de raíces de Frijol	42
	Escisión de los fagos obtenidos en el escrutinio de la Biblioteca de cDNA	44
	Transferencia tipo Southern	44
7.3	<i>Clona R15.2</i>	46
	Expresión diferencial de la clona R15.2 en deficiencia de PI	46
	Transferencia tipo Southern	48
	Respuesta de R15.2 ante la resuplementación con PI	49
	Análisis de la secuencia de nucleótidos de la Clona R15.2	51
8.	Discusión	57
9.	Conclusiones	62
10.	Referencias	63

1. RESUMEN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para los organismos vivos. Forma parte estructural de biomoléculas como fosfolípidos y ácidos nucleicos; y, a su vez, posee un papel importante en regulación enzimática. Las plantas lo adquieren en forma de ion fosfato (PI), el cual es muy reactivo y forma complejos insolubles con los elementos del suelo. Por este motivo, el fosfato es uno de los nutrientes con menor disponibilidad para las plantas.

Para superar la constante deficiencia en fosfato, las plantas han desarrollado adaptaciones morfológicas y metabólicas, que les permiten adquirir fosfato del suelo y recircular el fosfato interno. Algunas de estas adaptaciones, requieren la síntesis *de novo* de algunas proteínas y por tanto la activación transcripcional de sus genes.

Utilizando la técnica de AFLP-cDNA para identificar fragmentos que se expresen en condiciones de deficiencia de fosfato, se identificó un fragmento de aproximadamente 113pb. Utilizando este fragmento como sonda, se hizo el escrutinio de una biblioteca de cDNA de raíces de frijol que habían sido expuestas a deficiencia de fosfato. El fragmento obtenido fue de 1131pb.

Análisis de hibridaciones tipo Northern, utilizando el fragmento de 1131pb como sonda, indicó que la transcripción del mensajero de la clona 15.2 se estimula por deficiencia de PI. Adicionalmente, se observó que la resuplementación con PI produce una disminución del RNA mensajero al segundo día.

El Análisis por hibridación tipo Southern, sugiere que la clona 15.2 puede ser parte de una pequeña familia génica.

El análisis de la secuencia de nucleótidos de 15.2, traducida a aminoácidos, en las bases de datos Swissprot y de *Arabidopsis*, indica una alta homología con metiltransferasas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Fósforo

Los elementos minerales son importantes para el crecimiento de las plantas. Éstos se dividen en dos clases: micronutrientes y macronutrientes. Principalmente, los micronutrientes forman parte de enzimas, y se necesitan en pequeñas cantidades. Mientras que los macronutrientes se requieren en mayor cantidad, y tienen un papel importante en la formación de compuestos orgánicos, como proteínas, o ácidos nucleicos.

Clasificación	Elemento
Macronutriente	N, P, S, K, Mg, Ca
Micronutriente	Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl

Tabla 2.1 Clasificación de los elementos minerales necesarios para el crecimiento de las plantas

El fósforo está clasificado como un macronutriente esencial para las plantas (Tabla 2.1). La cantidad de fósforo en el suelo puede llegar a ser muy alta; sin embargo, normalmente está presente en formas que no son disponibles para las plantas. El fosfato orgánico representa entre el 20% y el 80% del fósforo total que se encuentra en el suelo, y debe mineralizarse a una forma inorgánica para ser asimilado por las plantas (Figura 2.1). El resto, la fracción inorgánica, contiene hasta 170 formas minerales (Coello, 2001). La única forma asimilable del fósforo es el ion ortofosfato (PI), siendo su concentración promedio en los suelos de 10 μ M, lo que representa una concentración de varios órdenes de magnitud menor a la existente en tejidos vegetales (5–20mM), (Raghothama, 1999).

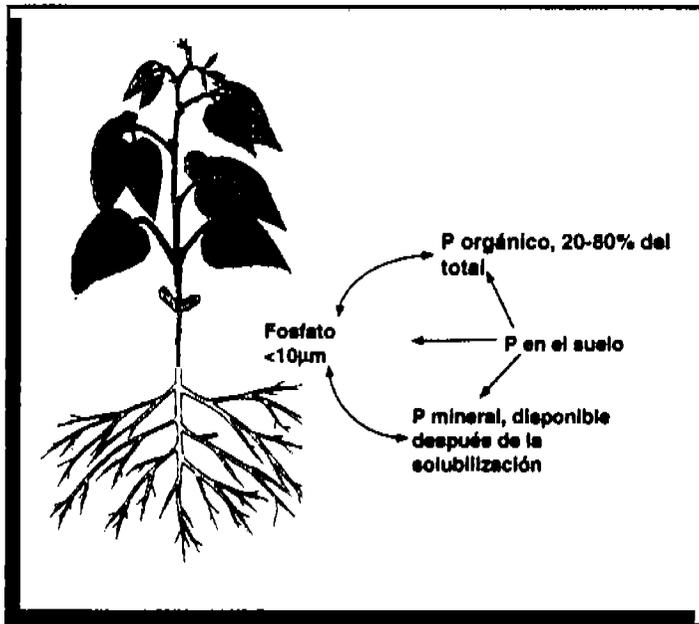


Figura 2.1 Compuestos fosfatados en el suelo

El fósforo está involucrado en diferentes funciones biológicas y es un componente estructural de biomoléculas, como ácidos nucleicos (*Figura 2.2*), (Marschner, 1995).

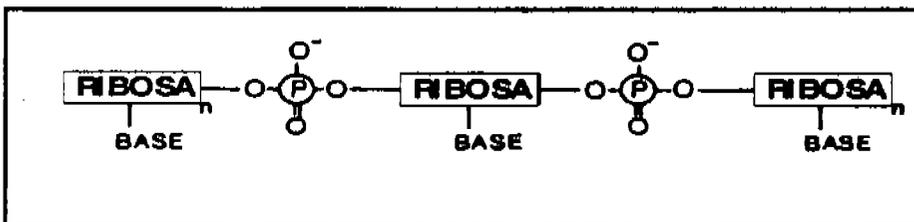


Figura 2.2 Fosfato como componente estructural, formando enlaces fosfodiéster en una molécula de RNA

Los enlaces éster fosfato y pirofosfato representan una fuente de energía metabólica para las células. La mayoría de los compuestos con estos enlaces son intermediarios en rutas metabólicas de biosíntesis y degradación en la célula (Marschner, 1995). Por ejemplo, la energía liberada durante la glucólisis, se utiliza para sintetizar enlaces pirofosfato en moléculas de adenosina trifosfato ó ATP.

El ATP puede transmitir dicha energía al donar el fosfato a otro compuesto (*Figura 2.3*).

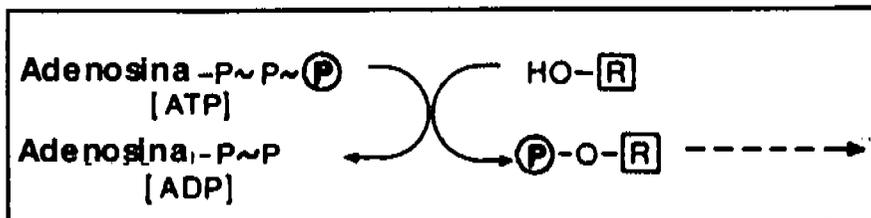


Figura 2.3 Transmisión de la energía de la molécula de ATP a otros compuestos, mediante fosforilación

Los enlaces pirofosfato también se pueden formar en otros compuestos, como el UTP ó GTP, que difieren del ATP solamente en su base nitrogenada.

El fosfato puede actuar como una molécula regulatoria a través del mecanismo de fosforilación-desfosforilación, en donde participan proteínas cinasas. Una gran cantidad de enzimas como PEP carboxilasa y H⁺-ATPasa sufren una fosforilación reversible modificando su actividad (Marschner, 1995). Se ha observado que durante la deficiencia de Pi, la fosforilación de proteínas disminuye de manera importante (Coello, datos no publicados).

2.2 Deficiencia de fosfato en el suelo

De todos los macronutrientes, el fósforo (P), es el que tiene menor disponibilidad, debido a las interacciones que forma con los elementos del suelo. En los suelos orgánicos, el ácido fítico (inositol hexafosfato) es el componente principal del fosfato orgánico (Schachtman *et al.*, 1998). El fosfato que contiene en su molécula necesita ser liberado para que las plantas lo asimilen. En contraste, en suelos ácidos o alcalinos, la mayor parte del fosfato está formando compuestos inorgánicos. Los compuestos principales son fosfato de hierro, aluminio y calcio. Los fosfatos de hierro y aluminio son abundantes en suelos ácidos, mientras que el fosfato de calcio predomina en suelos neutros a alcalinos, en forma de hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] (Narang *et al.*, 2000).

Para contrarrestar los efectos nocivos de la deficiencia en fosfato, se recurre al uso de fertilizantes, cuya fuente primaria es un recurso no renovable llamada "roca fosfato", obtenida a partir del fosfato de organismos que vivieron en eras geológicas pasadas (Russell, 1973). Sin embargo, solamente el 20% del fosfato de los fertilizantes se aprovecha por los cultivos; el resto es fijado en el suelo, o es arrastrado hasta depósitos subterráneos de agua, lagos y ríos (Russell, 1973).

2.3 Síntomas de la deficiencia de fosfato en plantas

Las plantas que sufren de deficiencia de P presentan un crecimiento retardado, así como una reducción en el crecimiento de las hojas. La deficiencia de P lleva a una reducción general de los procesos metabólicos, incluyendo división celular, fotosíntesis y respiración. Frecuentemente, estas plantas tienen un color verde más oscuro que las

plantas normales; esto se debe a que la formación de la clorofila avanza más rápido que el crecimiento de la planta, incrementándose la relación contenido de clorofila/área de la hoja. En ocasiones, se presenta una coloración rojiza debido al aumento en la formación de antocianinas (Marschner, 1995).

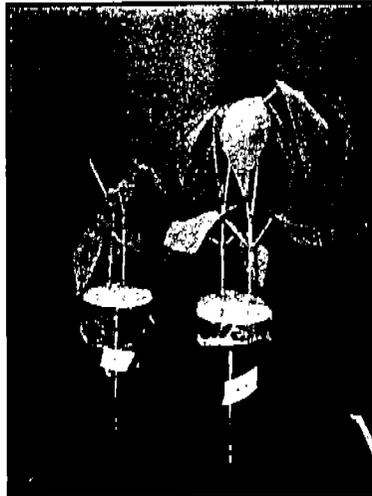


Figura 2.4 Síntomas de la deficiencia de P en frijol sometido a 21 días de deficiencia (izquierda) y suficiencia de fósforo (derecha)

2.4 Respuestas a la deficiencia de fósforo

Como respuesta a los bajos niveles de fósforo en la rizósfera, las plantas han desarrollado adaptaciones morfológicas y bioquímicas para solubilizar el fósforo que se encuentra formando complejos, así como recircular el fósforo interno (Raghothama, 1999).

Morfológicas

Modificación de la arquitectura de la raíz. La modificación del crecimiento de la raíz es una respuesta típica a la deficiencia de fósforo (*Figura 2.5*). Los genotipos más eficientes para responder ante la deficiencia en fósforo, cuentan con un sistema radicular altamente ramificado comparado con los genotipos que no tienen una respuesta eficiente (Lynch, 1995). La relación raíz/tallo se incrementa, lo que se refleja en un aumento en el área de la raíz para explorar y adquirir nutrimentos.

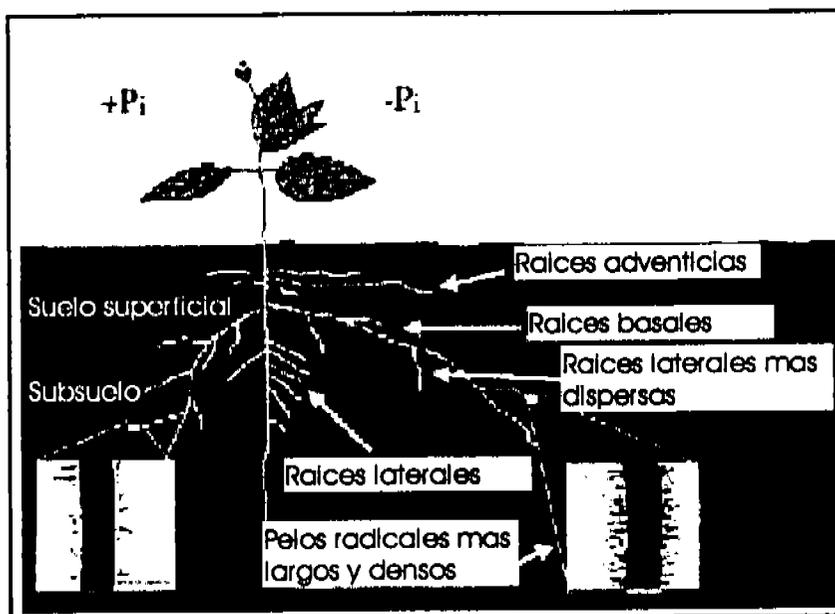


Figura 2.5 Cambios en la arquitectura de la raíz en plantas creciendo en suficiencia y deficiencia de fósforo

El frijol altera la morfología de su raíz en respuesta a la deficiencia de fósforo, cambiando el volumen total de exploración de suelo. Esto se pone de manifiesto al observarse la elongación de raíces laterales, así

como la proliferación de las mismas en respuesta a la baja disponibilidad de Pi (Lynch, 1995).

Pelos radicales. Los *pelos radicales* son extensiones subcelulares de la epidermis de la raíz (Bates y Lynch, 2000). En *Arabidopsis thaliana*, la baja disponibilidad de Pi provoca el incremento en la longitud y la densidad de los pelos radicales, (Figura 2.5 y 2.6), (Bates y Lynch, 1996). Al igual que el crecimiento de la raíz, estas modificaciones permiten aumentar la superficie de exploración del suelo (Bates y Lynch, 2000).

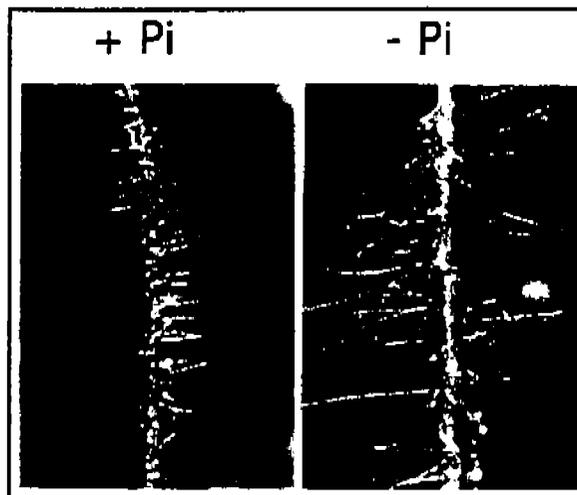


Figura 2.6 Cambios en los pelos radicales en plantas sometidas a deficiencia de fósforo. *Arabidopsis* tratadas 10 días con 5 mM (+Pi) ó 5 μ M (-Pi), (Polrier y Bucher, 2002)

Raíces proteoides. El lupino blanco (*Lupinus albus*) es conocido por su tolerancia a la baja disponibilidad de Pi, y se ha propuesto como modelo para entender la adaptación de las plantas sometidas a concentraciones bajas de Pi. Estas plantas desarrollan raíces proteoides

como una adaptación morfológica a la deficiencia de Pi (Uhde-Stone *et al.*, 2003). Las raíces proteoides están compuestas por grupos de raíces terciarias cortas, de manera que parecen "cepillos", cubiertas por una densa masa de pelos radicales (*Figura 2.7*). Las raíces proteoides están especializadas en la síntesis y secreción de ácidos orgánicos. Para sintetizar dichos ácidos se da la activación de algunas enzimas como fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), citrato sintasa (CS), y malato deshidrogenasa (MDH) (Johnson *et al.*, 1996).



Figura 2.7 Raíces proteoides

Bioquímicas

Secreción de ácidos orgánicos. Una de las adaptaciones bioquímicas más estudiadas, es la secreción de exudados radicales (*Figura 2.8*). Los componentes principales de los exudados radicales son azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos. Cuantitativamente, los azúcares y los ácidos orgánicos son los compuestos predominantes (Marschner, 1995). Los exudados de plantas

que han crecido en deficiencia de Pi contienen una gran cantidad de ácidos orgánicos, principalmente málico y cítrico (Raghothama, 1999).

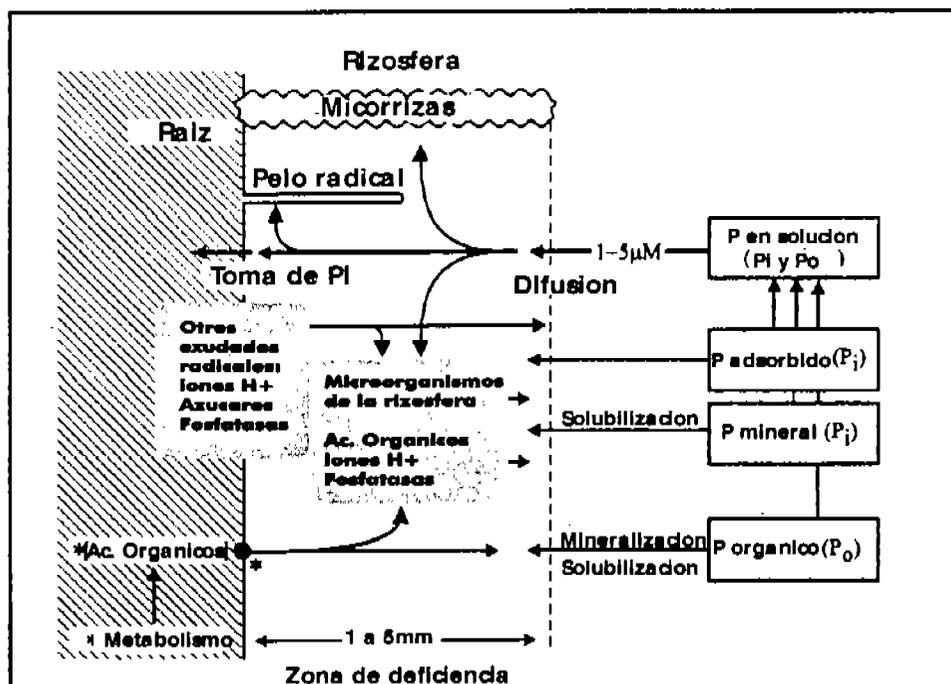


Figura 2.8 Liberación del fósforo de compuestos Inorgánicos y orgánicos por medio exudados radiculares.

Se ha encontrado que los ácidos orgánicos liberan el fósforo de compuestos de calcio y aluminio. La propiedad que tienen los ácidos orgánicos de solubilizar el fósforo mineral se puede atribuir a la formación de complejos estables al quelar cationes como Ca^{2+} , Al^{3+} , y Fe^{3+} (Figura 2.9). Los compuestos orgánicos más eficientes son los ácidos di y tricarbóxicos (Mc Laren y Peterson, 1967).

Fosfatasa s ácidas. La inducción de fosfatasa s ácidas es una respuesta distintiva y universal de las plantas a la inanición de fosfato (Figura 2.8). Debido a este hecho, la actividad de fosfatasa ácida se ha usado como un marcador potencial del estado de las plantas ante la disponibilidad de Pi (Baldwin *et al.*, 2001). Se han logrado purificar y caracterizar fosfatasa s ácidas que responden a la deficiencia en Pi. Éstas son inespecíficas, lo que les permite actuar sobre distintos compuestos orgánicos (Coello, 2001). Aunque las fosfatasa s ácidas no tienen una especificidad, pueden tener actividad catalítica sobre distintos sustratos.

A su vez, las fosfatasa s ácidas pueden clasificarse como intracelulares o extracelulares. A partir de un extracto protéico de *Arabidopsis thaliana*, se aisló una fosfatasa de 34kDa, AtACP5, que se induce en deficiencia de Pi. Su expresión se induce tanto en raíces, como en la parte aérea de la planta, específicamente en hojas senescentes. Esta fosfatasa tiene una alta homología con las fosfatasa s ácidas púrpuras (PAPs) del tipo 5 de mamíferos. Con esta familia PAP, comparte todos los residuos implicados en la unión a ligando, y tiene actividad de peroxidasa como sus homólogos de mamíferos (del Pozo *et al.*, 1999). La purificación de la proteína permitió el aislamiento de su gen. El gen de esta fosfatasa no se induce solamente ante la deficiencia de fosfato, sino que responde también a estrés salino, oxidativo y por ácido abscísico.

En una búsqueda en el genoma de *Arabidopsis* de genes con homología a fosfatasa s ácidas púrpuras, se encontraron 29 genes (Li *et al.*, 2002). Se han descrito dos tipos de fosfatasa s: las PAPs de bajo peso molecular, estructuralmente similares a las PAPs de mamíferos y generalmente monoméricas, con un peso molecular aproximado de 35kDa, y las de alto peso molecular que funcionan como homodímeros,

con un peso de 55kDa por monómero. (Li *et al.*, 2002). El estudio de la expresión de estas PAPs, indicó que no todas ellas inducen su expresión en condiciones de deficiencia de Pi (Li *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis thaliana* no hay muchos reportes que describan las características de fosfatasa ácidas secretadas. Coello (2002) reportó que una fosfatasa secretada en respuesta a la deficiencia de fósforo en *Arabidopsis*, tiene actividad sobre pirofosfato. Esta proteína está formada por 2 subunidades, probablemente glicosiladas, de 52kDa y 63 kDa respectivamente.

Miller *et al.* (2001) encontraron y caracterizaron otra fosfatasa ácida en lupino blanco, que se encuentra en secreciones de raíz, después de someter a la planta a 14 días de deficiencia de Pi. Esta fosfatasa es una glicoproteína de 70kDa. En experimentos *in vitro*, presenta actividad sobre PEP, ATP, y NADPH⁺ y tiene poca actividad sobre ácido fítico.

Transportadores de fósforo Se ha observado que ante la deficiencia de fósforo, hay un incremento en la velocidad de toma de fósforo. A partir de las características cinéticas del sistema de toma de fósforo, se ha propuesto un modelo dual, en el que dos tipos de transportadores pueden estar en función. El primero, de alta afinidad, que opera en bajas concentraciones de fósforo (rango micromolar) y otro de baja afinidad, que funciona cuando la concentración de Pi es alta, en un rango milimolar (Schachtman *et al.*, 1998). La expresión de la mayoría de los transportadores ocurre en los pelos radicales y la epidermis de la raíz (Coello, 2001).

Arabidopsis es considerada el modelo básico de estudio para plantas. En esta planta se han encontrado varias familias de transportadores de Pi. La primera es la *Pht1* que pertenece a una proteína con 12 dominios transmembranales (Figura 2.10), con un asa hidrofílica entre los dominios 6 y 7 (Poirier y Bucher, 2002). La sobreexpresión de este gen en cultivos celulares de tabaco, incrementó la velocidad de la toma de fosfato en condiciones de deficiencia de Pi (Mitsukawa *et al.*, 1997). La familia génica de *Pht1* codifica para cotransportadores Pi/H^+ , de alta afinidad que intervienen en la toma de fosfato a través de la membrana plasmática (Poirier y Bucher, 2002). Análisis de transferencias tipo Northern muestran que esta familia génica se expresa principalmente en raíces (Muchal *et al.*, 1996).

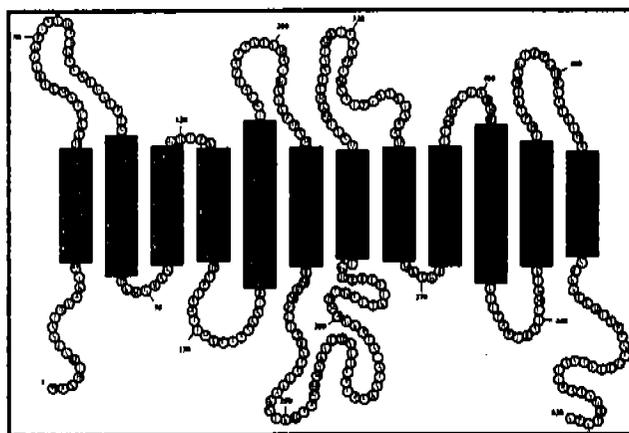


Figura 2.10 Estructura predicha para el transportador de fosfato LePT1 de jitomate, homólogo de *pht1-1* (Poirier y Bucher, 2002)

La familia *Pht2* representa otra familia de genes que codifican para transportadores de Pi. El cDNA de *pht2-1* codifica para una proteína estructuralmente similar a las de la familia *Pht1* (Daram *et al.*, 1999), pero es distinta al tener un asa hidrofílica entre los dominios

transmembranales 8 y 9 (*Figura 2.11*). Este gen se expresa principalmente en tejidos verdes alrededor de tejidos vasculares, y lleva a cabo un transporte de tipo simporte H^+/Pi . Se piensa que esta familia génica tiene un papel en el transporte de fosfato hacia la parte aérea de la planta (Daram *et al.*, 1999).

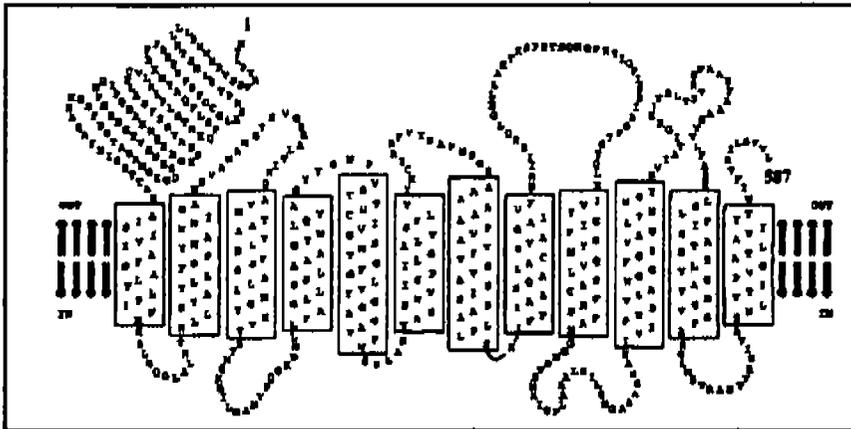


Figura 2.11 Estructura predicha para el transportador de fosfato *pht2-1* de *Arabidopsis* (Daram *et al.*, 1999)

La tercera familia de genes transportadores de Pi , *Pht3*, codifica para una pequeña familia de proteínas con 4 a 6 dominios transmembranales, su cadena tiene de 309 a 375 aminoácidos. Estos transportadores se encuentran en las mitocondrias (Poirier y Bucher, 2002).

El gen *pho1*, expresado principalmente en la raíz, ha sido identificado y caracterizado recientemente (Hamburger *et al.*, 2002). El gen *pho1* no tiene homología con cotransportadores H^+-Pi de plantas, pero podría tratarse de un transportador de iones que lleva al Pi hacia el

xilema. En *Arabidopsis* hay 10 genes putativos que tienen homología con *pho1*. Es posible que varios miembros de esta familia de genes tengan un papel en la homeostasis del Pi en la planta (Poirier y Bucher, 2002).

Aunque una gran cantidad de cDNA's que codifican para transportadores de Pi se han aislado y caracterizado en varias especies de plantas, no se ha identificado un transportador vacuolar de Pi (Poirier y Bucher, 2002).

2.5 Regulación genética en microorganismos (Regulón Pho)

Las plantas llevan a cabo varias adaptaciones ante la deficiencia de Pi. En bacterias y hongos ocurren cambios similares. Los mecanismos de control de la adaptación de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, se han estudiado ampliamente. Se han descrito numerosos componentes de la red de regulación ligados a la activación de genes en distintas condiciones de fosfato. Esta red de regulación es llamada Regulón Pho, tanto en levaduras como en bacterias (Poirier y Bucher, 2002).

Regulón Pho en bacterias (*Escherichia coli*)

Se han descrito las respuestas de varios microorganismos a la deficiencia en fosfato, como *Bacillus subtilis* (Liu y Hulett, 1997), ó *Salmonella typhimurium* (Jiang et al., 1995). *E. coli* es el modelo más estudiado en la deficiencia de fosfato en bacterias. El modelo que se ha planteado es el de un sistema de dos componentes para regular la

expresión de por lo menos 15 genes involucrados en la adquisición de Pi (Regulón Pho).

Gen	Función de la proteína a la que codifica
<i>phoR</i>	Histidina cinasa
<i>phoB</i>	Factor de transcripción
<i>pstA</i>	Transportador de Pi
<i>pstB</i>	Transportador de Pi
<i>pstC</i>	Transportador de Pi
<i>phoE</i>	Proteína porina
<i>pstS (phoS)</i>	Proteína de unión a fosfato
<i>phoA</i>	Fosfatasa alcalina
<i>phoM</i>	Histidina cinasa

Tabla 2.2 Principales genes que forman el Regulón Pho de *Escherichia coli* (Yamada et al., 1989)

El sistema de dos componentes está formado por PHOB-PHOR. El fosfato llega hacia el espacio periplásmico a través de PHO E, una porina. PHO R, una histidina-cinasa localizada dentro de la membrana interna, actúa como un sensor de Pi. En estrés de fosfato, PHOR se autofosforila, y posteriormente dona su grupo fosforilo para activar a la proteína PHOB. PHO B, que es el factor transcripcional del regulón Pho en *E. coli*, (Yamada et al., 1989) se une a una región específica del promotor de cada gen del Regulón Pho, y activa su transcripción (Poirier y Bucher, 2002).

Se sabe que hay una secuencia consenso compartida en regiones regulatorias de *phoA*, *phoB*, *phoE*, *pstS*, que fue nombrada caja *pho*. Se ha comprobado que PHOB es capaz de unirse a ésta caja en el caso de *phoB* y *pstS*, activando la transcripción (Yamada, 1989). La Interacción entre los diferentes componentes del Regulón Pho se muestra en la figura 2.12.

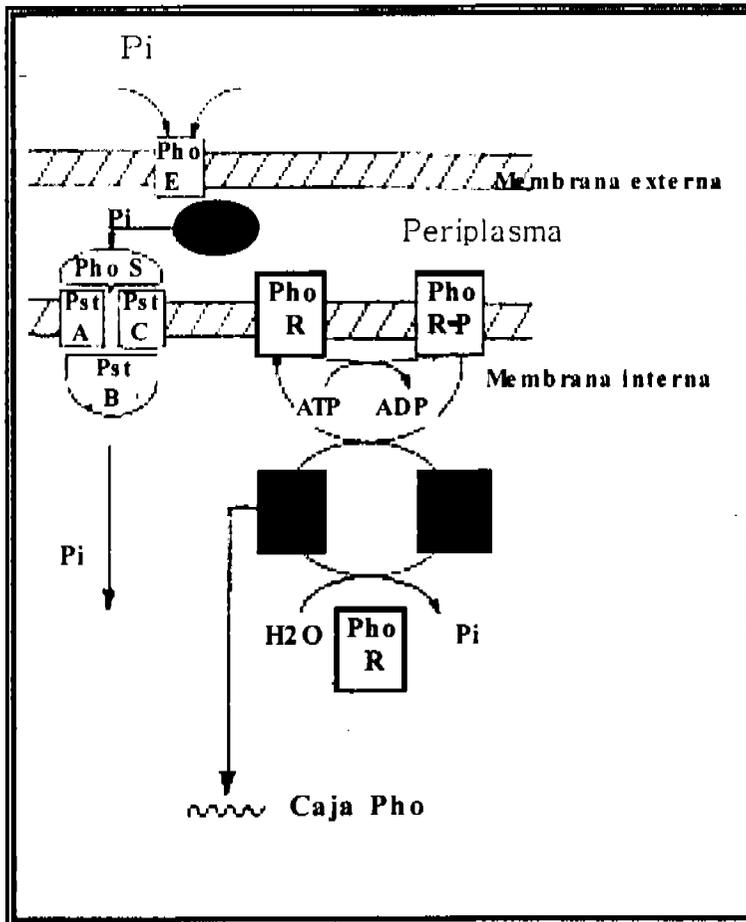


Figura 2.12 Regulón Pho en *E. coli*. PHO E es la porina que permite la entrada del Pi al espacio periplásmico. El complejo PST de unión a fosfato, lo transporta al interior de la célula. PHOR se autofosforila en deficiencia de fosfato, fosforilando a su vez a PHOB, que actúa como factor de transcripción para los genes de respuesta a la deficiencia de Pi.

En la ausencia de PHOR, PHOM puede reemplazar la función regulatoria positiva de PHOR en el Regulón Pho. PHO M se descubrió en una mutante sin sentido de PHOR, buscando obtener un fenotipo sin la

expresión de fosfatasa ácida. Sin embargo, esta mutante expresaba fosfatasa ácida de manera constitutiva (Amemura *et al.*, 1990). PHOM tiene una secuencia homóloga a PHOR, y pertenece a una familia de histidinas cinasas.

Regulón Pho en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

El modelo para estudiar la deficiencia de fosfato en levaduras es *Saccharomyces cerevisiae*. El Regulón Pho en esta especie comprende al menos 22 genes (Oshima, 1997). Los principales genes que forman el sistema de Regulón Pho en *S. cerevisiae* se muestran en la *tabla 2.3*.

Las proteínas PHO 80, PHO 81, PHO85 y PHO4 son los factores clave para controlar la expresión de los genes del Regulón Pho (Poirier y Bucher, 2002).

PHO4 es el factor transcripcional que controla la expresión de los genes del regulón Pho. Su localización dentro de la célula depende de su nivel de fosforilación. Cuando está hiperfosforilado se localiza preferentemente en el citoplasma, mientras que la forma hipofosforilada se encuentra en el núcleo, donde puede ejercer su acción (Springer *et al.*, 2003). La fosforilación de PHO4 está controlada por un complejo PHO80-PHO85 [ciclina-cinasa dependiente de ciclina (CDK)]. Este complejo está a su vez controlado por PHO81 (Oshima, 1997).

En condiciones limitantes de fosfato, la proteína PHO81 inhibe el complejo PHO80-PHO85, impidiendo así la fosforilación de PHO4. De esta manera, PHO4 junto con PHO2, activan la transcripción de los genes del regulón. PHO2 es un factor transcripcional de algunos genes del regulón Pho, pero necesita la presencia de PHO4 para poder realizar su función (Shao *et al.*, 1996). Al estar en condiciones de suficiencia de

fosfato, el complejo PHO80-PHO85 está activo y fosforila a PHO4. De esta manera, PHO4 (fosforilado) se encuentra en el citoplasma y no puede activar la transcripción de los genes del *regulón Pho* (Shao *et al.*, 1996).

Gen	Función de la proteína a la que codifica
ESTRUCTURALES	
<i>pho3</i>	Tiamina fosfatasa
<i>pho5</i>	Fosfatasa ácida p60
<i>pho10</i>	Fosfatasa ácida p58
<i>pho12</i>	Fosfatasa ácida
<i>pho11</i>	Fosfatasa ácida p56
<i>pho8</i>	Fosfatasa alcalina
<i>pho9</i>	Proteasa para PHO8
<i>pho13</i>	p-nitrofosfatasa específica
<i>pho84</i>	Transportador de fosfato
<i>pho86</i>	Proteína asociada a transportador de Pi.
<i>pho87</i>	Proteína asociada a transportador de Pi.
<i>pho88</i>	Proteína asociada a transportador de Pi.
<i>gtr1</i>	Proteína asociada a transportador de Pi.
REGULATORIOS	
<i>pho2</i>	Activador transcripcional
<i>pho4</i>	Activador transcripcional
<i>pho6</i>	Requerido para la expresión de PHO3
<i>pho7</i>	Requerido para la expresión de PHO3
<i>th13</i>	Requerido para la expresión de PHO3
<i>pho80</i>	Ciclina, Inhibidor de PHO4
<i>pho81</i>	Inhibidor de PHO80/PHO85
<i>pho85</i>	Cinasa dependiente de ciclina, inhibidor de PHO4

Tabla 2.3 Genes estructurales y regulatorios que forman el Regulón Pho en *S. cerevisiae* (Oshima, 1997)

PHO4 tiene la capacidad de unirse a dos secuencias de 6pb (CACGTG y CACGTT) que se encuentran en el promotor de una fosfatasa alcalina que forma parte del *regulón Pho*. Una búsqueda reveló que varios promotores de genes que forman parte del regulón, tienen una o ambas secuencias concenso como los genes del transportador de fosfato *pho84*

(ambas) y la fosfatasa ácida *pho5* (CACGTT) (Oshima, 1997). El funcionamiento del *Regulón Pho* se muestra en la figura 2.13.

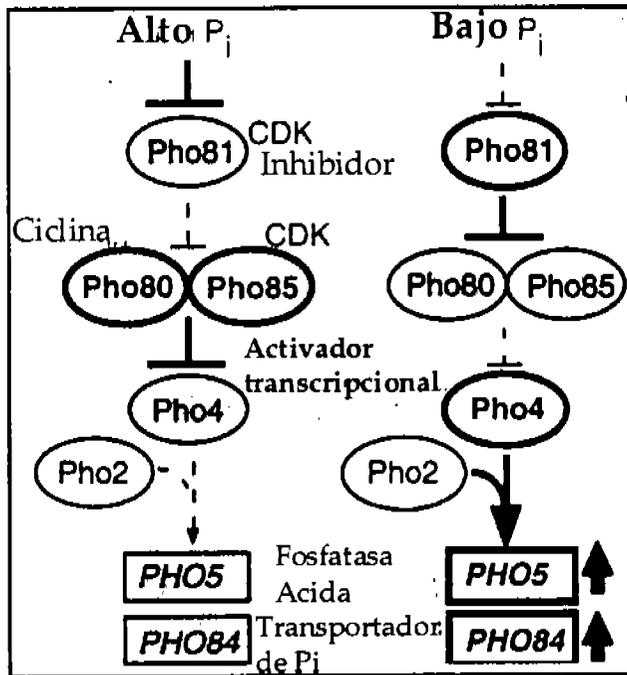


Figura 2.13 El *Regulón Pho* en *S. cerevisiae*. Los óvalos son proteínas y los rectángulos son genes. Las líneas gruesas significan señales que se transducen al siguiente componente, mientras que las punteadas indican ausencia de interacción. Los óvalos y rectángulos claros indican estados activados, y los grises indican un estado inactivado.

En este sistema, se ha tratado de encontrar cuál es la señal que indica a la levadura la presencia o ausencia de fosfato. Se ha propuesto que los transportadores de fosfato podrían dar la señal de la cantidad de fosfato extracelular. Para comprobar dicha teoría, PHO84, un transportador de fosfato inorgánico (Bun-Ya *et al.*, 1991), fue evaluado junto con otros transportadores de fosfato (PHO89, PHO87, PHO91).

Aunque se demostró que PHO84 tiene un papel relevante en la toma de fosfato durante la inanición del mismo, no se encontró que fuera el indicador de concentración de fosfato extracelular (Wykoff y O'Shea, 2001).

2.6 Regulón Pho en plantas

La existencia de un sistema de genes inducibles por deficiencia de fosfato análogo al de los microorganismos, se ha propuesto para plantas. Esto se basa en los reportes de una variedad de genes que responden a la deficiencia en fosfato. Mediante técnicas convencionales, se han identificado una gran cantidad de estos genes y las proteínas para las que codifican; entre ellas se encuentran RNAsas, fosfatasas ácidas, transportadores de fosfato de alta afinidad, fosfodiesterasas, β -glucosidasa, y otras proteínas con función desconocida todavía (Wu *et al.*, 2003). Aunque se han clonado varios genes que responden a la disponibilidad de fosfato, los sensores del mismo y los componentes que regulan la ruta de transducción de señales, no se han identificado.

Las técnicas bioquímicas y moleculares que se han utilizado para disectar la respuesta de las plantas a la inanición de fosfato, se han enfocado en la identificación de genes inducibles en deficiencia de Pi. Esto, principalmente con enzimología, escrutinios de bibliotecas de cDNA, AFLPs y microarreglos.

La técnica de AFLP-cDNA fue utilizada por *Peñalosa et al.* (2002) para encontrar los cDNA's que se expresan diferencialmente en deficiencia y resuplementación de Pi, durante el periodo de excreción de citrato en lupino blanco. El análisis de las secuencias de las clonas obtenidas indicó

que tres de ellas pertenecían a los genes de la PEPC, auxinas Inducibles por estrés de Pi y Gliceraldehído-3-Pi-deshidrogenasa respectivamente.

La tecnología de microarreglos es una herramienta importante para el análisis de la expresión del genoma de una planta. Con esta técnica se pueden comparar perfiles de expresión genética, bajo distintas condiciones ambientales y de su desarrollo (Wu *et al.*, 2003). Mediante microarreglos se han podido encontrar genes que forman parte de la respuesta a deficiencia en Pi, tanto en hojas como en raíces. Estos están involucrados en mecanismos de transporte, síntesis de proteínas, metabolismo de aminoácidos y ácidos nucleicos, metabolismo del fósforo, transducción de señales, etc.

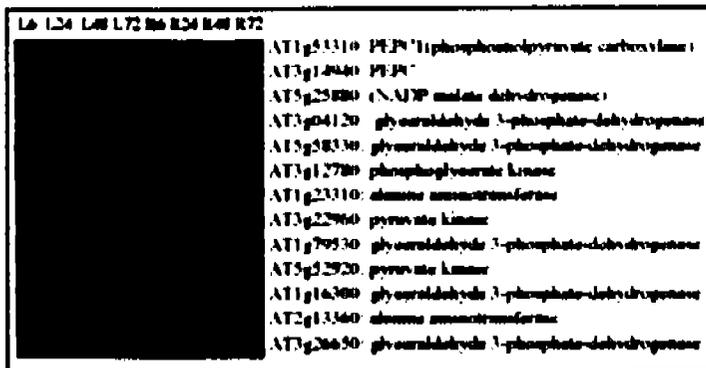


Figura 2.14 Expresión diferencial de genes involucrados en la glicólisis. Microarreglo con tallos y hojas de *Arabidopsis* sometidas a 6, 24, 48 y 72 horas de deficiencia de fósforo (Wu *et al.*, 2003)

Wu *et al.* (2003), obtuvo un perfil muy amplio de los genes que se expresan diferencialmente en deficiencia de fósforo durante los primeros días de tratamiento, utilizando microarreglos. Encontró que la mayoría de los genes que estudió, se inducían desde la sexta hora de deficiencia, y al llegar a las 48 horas alcanzaban un máximo. Esto se observó tanto

en raíces como en hojas. En la *Tabla 2.4*, se muestran los genes que se expresaban diferencialmente.

Fotosíntesis	Gliceraldehído-3P deshidrogenasa Precursor de ferredoxina Rubiaco, subunidad pequeña 1b, 2b, 3b Proteína de unión a Clorofila A/B Fotosistema I, subunidad XI, PSI E, V	Reprimidos
Metabolismo del carbono	Beta-cetoacil-CoA sintasa Omega-3 ácido graso desaturasa ADPG-pirofosforilasa Fosfolipasa Invertasa Transportador de glucosa Acil-CoA deshidrogenasa Sacarosa fosfato sintasa Pectinesterasa Beta-xilosidasa	Reprimido Reprimido Reprimido Inducido Inducido Inducido Inducido Inducido Inducido
Glicólisis	PEPC NADP malato deshidrogenasa Gliceraldehído-3P deshidrogenasa Fosfoglicerato cinasa Alanina aminotransferasa Piruvato cinasa	Reprimido Reprimido Reprimido Inducido Inducido
Síntesis de Proteínas	50S proteína ribosomal L21, L24 Proteína ribosomal L18 60S proteína ribosomal L10A, L23A proteína ribosomal L1 de cloroplasto 50S proteína ribosomal L22 de cloroplasto	Reprimidos
Degradación de Proteínas	FtsH metaloproteasa Cisteína proteinasa, Aspártico proteinasa Poliubiquitina ATP-dependiente Clp proteasa 20S proteasoma subunidad beta ATP-dependiente Clp proteasa 3 Serina proteasa	Inducidos
Genes con secuencias para factores de transcripción	MYB59, MYB4, Prot. Relacionada a MYB Proteína de unión a DNA ME12, proteína de unión a RNA Histona deacetilasa TFIID1 factor de iniciación transcripcional SigC factor sigma ATP-dependiente RNA helicasa	Inducido Inducido Inducido Inducido Inducido Reprimido Reprimido
Genes de transducción de señales	Proteína regulada por auxina Calmodulina CDPK, CDPK9 Proteína cinasa Proteína relacionada a calmodulina Serina/treonina cinasa Tirosina fosfatasa Inositol-1,3,4-tirosinofosfato-5,6 cinasa	Inducido Inducido Inducido Inducido Inducido Reprimido Reprimido Reprimido

Tabla 2.4 Expresión diferencial de genes sometidos a deficiencia en Pi. Microarreglo con tallos y hojas de *Arabidopsis* sometidas a 6, 24, 48 y 72 horas de deficiencia (Wu et al., 2003)

3. JUSTIFICACIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa comestible más importante en el mundo, se cultiva principalmente en América latina y África, y es una fuente importante de proteína (Posada *et al.*, 1995).

Cerca del 50% del frijol en América Latina crece en suelos bajos en Pi, de modo que, los rendimientos promedio del frijol son bajos (Posada *et al.*, 1995). A nivel agronómico, las estrategias para solucionar la baja productividad debida a la deficiencia de Pi, se han enfocado en la identificación de líneas de plantas que tienen tolerancia para crecer en condiciones limitantes de fosfato (Coello, 2001). Para esto, se han realizado estudios como el de Acosta *et al.* (1995), evaluando un grupo de 36 genotipos de frijol de diferentes orígenes clasificando entre ellos a los que eran susceptibles y a los tolerantes a la falta de Pi, basándose en su rendimiento.

Otra forma de abordar el problema es identificar, con técnicas moleculares, cuáles son los genes que se estimulan durante una condición de estrés nutrimental y establecer el papel de éstos durante la deficiencia de Pi.

En nuestro laboratorio se han aislado, mediante la técnica de AFLP-cDNA, fragmentos de cDNA, cuya expresión se aumenta en los primeros días de deficiencia en fosfato (Figura 3.1). Uno de esos fragmentos es la clona 15.2, cuya identidad y posible función no ha sido evaluada.

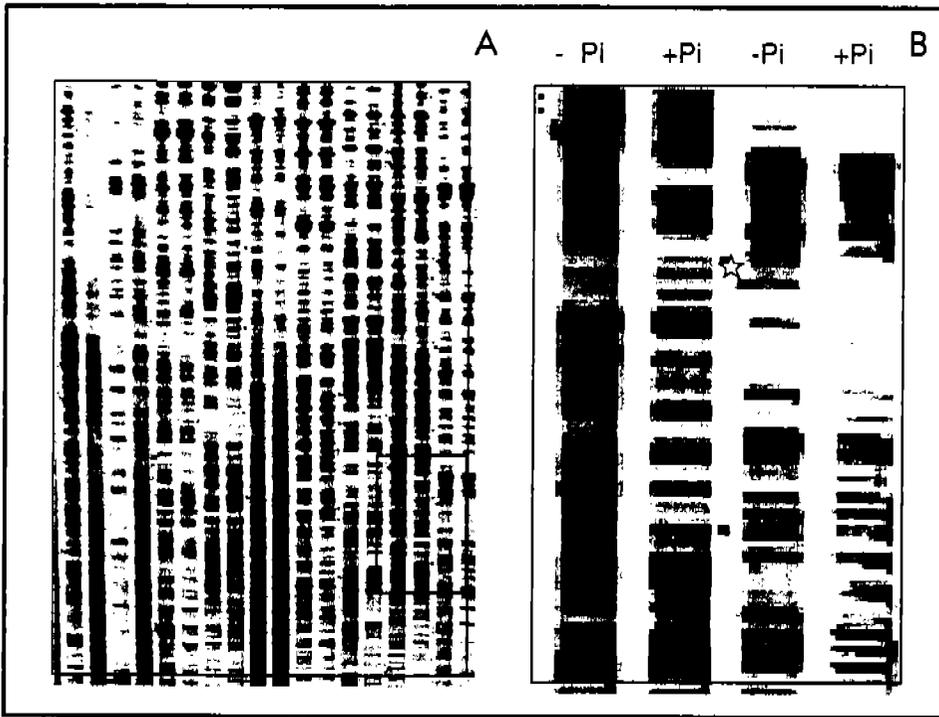


Figura 3.1 A. AFLP's de raíces de frijol. B. Acercamiento de la placa fotográfica. Los fragmentos que aparecen o se incrementan durante la deficiencia de fosfato fueron seleccionados.

Con estos antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

4. HIPÓTESIS

El cDNA de la clona 15.2 codifica para una proteína cuya función es importante en la adaptación del metabolismo celular a la deficiencia de fosfato.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar el cDNA de la clona 15.2

5.2 Objetivos Específicos

- Realizar el análisis de la secuencia del fragmento de cDNA de la clona 15.2.
- Realizar el escrutinio de una biblioteca de cDNA.
- Caracterizar con una transferencia tipo Northern, la expresión de la clona obtenida en el escrutinio de la biblioteca de cDNA.
- Determinar si existen genes homólogos al cDNA de la clona 15.2, mediante una transferencia tipo Southern.
- Secuenciar el cDNA de la clona 15.2.
- Analizar la secuencia del cDNA 15.2 en las bases de datos disponibles y determinar la posible función de la proteína para la que codifica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 15% (v/v), se agitaron durante 10 minutos y se lavaron con agua desionizada estéril de 5 a 10 veces. Las semillas se germinaron en un papel filtro húmedo. Cuando las radículas alcanzaron aproximadamente 1cm de longitud, se transplantaron a agrolita. Fueron regadas durante 10 días con solución nutritiva Hoagland completa, compuesta por 6mM KNO₃, 4mM Ca(NO₃)₂, 0.5mM NH₄H₂PO₄, 2mM MgSO₄*7H₂O, 0.03mM Fe(III) EDTA, 0.009mM MnCl₂*4H₂O, 0.046mM H₃BO₃, 0.0008mM ZnSO₄*7H₂O, 0.0003mM CuSO₄*5H₂O, 0.01mM H₂MoO₄*H₂O, ajustando el pH a 5.2-5.4. Para el tratamiento de deficiencia en fosfato (-PI), las plantas fueron regadas con la solución anterior en donde se sustituyó el fosfato de amonio por 500µM de sulfato de amonio. Para el tratamiento de resuplementación, las plantas con un día de deficiencia en fosfato, se regaron durante 1 o 2 días con solución nutritiva Hoagland completa. Las plantas se mantuvieron en Invernadero con ciclos de 26°C durante el día y 15°C durante la noche con iluminación constante. Las raíces se congelaron y se usaron para el aislamiento de RNA.

6.2 Preparación y electroforesis de geles de agarosa al 1%

Los geles se prepararon con 1% (w/v) de agarosa en amortiguador TAE 1X que contiene 40mM de Tris-HCl pH 8.0, 20mM de ácido acético glacial, 1mM de EDTA (pH 8.0) y bromuro de etidlo a una concentración final de 1µg/mL. Para la corrida, se utilizó TAE 1X como amortiguador y Ficoll 10X como amortiguador de muestra [0.25% (w/v) azul de bromofenol, 0.25% (w/v) xilen cianol, 25% (w/v) Ficoll tipo 400]. El gel se corrió a un voltaje constante de 60-70 V, visualizando los ácidos nucleicos con un transiluminador de luz UV.

6.3 Extracción y aislamiento de RNA

Para el aislamiento de RNA de las raíces de frijol, se utilizó el reactivo de TRIzol (INVITROGEN). El reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (basado en Chomczynski y Sacchi, 1987). La extracción se realizó de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Se homogenaron 100 mg de raíz con mortero hasta polvo fino, congelándolo con nitrógeno líquido. La solución de TRIzol se agregó a la muestra y se mezcló en vórtex por 3 minutos. La muestra se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (15–30°C), para disociar complejos de nucleoproteínas. Se añadieron 200µL de cloroformo por cada mililitro de TRIzol, se agitó con vórtex durante 1 minuto, y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una centrifugación a 12000g por 15 minutos a 4°C, para separar la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa se precipitó con 0.5mL de Isopropanol (por cada mililitro de TRIzol original), incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de RNA con 1mL de etanol 75% por cada mililitro de TRIzol inicial. El RNA se centrifugó a 7500g durante 5 minutos a 4°C. La pastilla se dejó secar 5–10 minutos (sin usar centrifugación al vacío), se disolvió en 100µL de agua tratada con DEPC y se almacenó a –70°C. El agua con DEPC (0.1% v/v) se preparó agitándola toda la noche e inactivando el DEPC por esterilización durante 30 minutos a 15 lb/in².

6.4 Cuantificación de RNA

Para cuantificar el RNA obtenido en la extracción con TRIzol se utilizó un método espectrofotométrico. Se realizó la lectura de absorbencia a 260nm, de una dilución 1:50 de una alícuota de la muestra en agua (con DEPC). La pureza de la muestra se evaluó considerando la relación $A_{260/280}$, siendo ésta igual a 1.6. Con la relación $D.O._{260} = 40\mu\text{g/mL}$, se calculó la cantidad de RNA presente.

6.5 Extracción y aislamiento de DNA

Protocolo Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) para extracción de DNA en plantas

Raíces de frijol (1g) se homogeneizaron en nitrógeno líquido. El polvo obtenido se transfirió a tubos estériles de 30mL, y se añadieron 15mL de buffer de extracción (100mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 500mM NaCl, 10mM β -mercaptoetanol), junto con 1mL de 20% SDS agitando ligeramente. La mezcla se incubó a 65°C por 10 minutos. Se agregaron 5mL de acetato de potasio 5M, se mezcló y se incubó por 20 minutos en hielo. La muestra se centrifugó a 25000g por 20 minutos. Se filtró el sobrenadante a través de una gasa estéril en un tubo nuevo que contenía 10mL de isopropanol. La muestra se incubó a -20°C por 20 minutos, y los ácidos nucleicos se recuperaron centrifugando a 20000g por 15 minutos. El sobrenadante se desechó, y la pastilla se disolvió en 0.7mL de 5mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH 8.0. Se llevó a cabo una centrifugación en a 14000g durante 10 minutos para eliminar los restos insolubles. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf, y se incubó con 1 μ g de RNAasa, y la muestra se incubó durante 30min a 37°C. Para eliminar las proteínas, se realizó una extracción de la muestra, añadiendo un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI 25:24:1), se mezcló y centrifugó a 14000g por 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo y el DNA se precipitó agregando 1/10 de volumen de 3M NaOAc pH 5.6 y 500 μ L de isopropanol. La muestra se mezcló y se centrifugó a 14000g por 10 minutos. La pastilla de DNA se lavó con 1mL de etanol frío al 80%. La pastilla seca se disolvió en 100 μ L de solución 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0 y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.6 Cuantificación de DNA

La medición se hizo mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260nm, diluyendo una alícuota de la muestra en agua estéril. Se realizó el cálculo considerando que la absorbencia de 1 equivale a 50 μ g/mL de DNA en la dilución.

6.7 Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción

Para la digestión del DNA con enzimas de restricción, se mezclaron 10 μ L de amortiguador 10X (específico para cada enzima), 30 μ g de DNA, 2 μ L de enzima de restricción (10u/ μ L), y se llevó a un volumen final de 100 μ L con agua estéril. Las reacciones se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para verificar la digestión del DNA, una alícuota correspondiente a 1 μ g de DNA, se separó en un gel de agarosa. El DNA digerido se liofillizó y se guardó a -70°C hasta su uso.

6.8 Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción

Para la digestión, se mezclaron 3 μ L de amortiguador 10X (específico para cada enzima de restricción), 20 μ L de plásmido (0.6 μ g/ μ L), 1 μ L de enzima de restricción (10u/ μ L), y se llevó a un volumen final de 30 μ L con agua estéril. El plásmido pGEM se digirió con *EcoRI* y para pBluescript se utilizó *BamHI* y *KpnI*. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 horas. Para verificar la digestión del plásmido, la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1%.

6.9 Transformación

Para realizar la transformación de células bacterianas, células competentes de *Escherichia coli* se descongelaron totalmente, se les agregó 1 μ L del plásmido (0.6 μ g/ μ L) y se colocaron en hielo por 10 minutos. Se realizó un choque térmico a 42°C por 90 segundos y se les adicionó un mililitro de medio LB (que contiene 1% (w/v) Bacto-triptona, 0.5% (w/v) de extracto de levadura, 85mM NaCl a pH 7.5 ajustado con NaOH 1M). Se incubó durante 1 hora a 37°C. Se tomaron 100-200 μ L para plaquear en cajas selectivas LB agar con ampicilina (50 μ g/mL). Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C.

6.10 Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó utilizando el kit Rapid Plasmid Purification System (MARLIGEN BIOSCIENCES INC), de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. El DNA plasmídico se recuperó en 75µL de amortiguador TE [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA] a 65°C. En los casos en que el plásmido se utilizaba para secuenciación, la elución se realizó con agua estéril, a una temperatura de 65°C.

6.11 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa al 1%

Se realizó utilizando el kit Rapid Gel Extraction System (MARLIGEN BIOSCIENCES INC), de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. El DNA se recuperó con 50µL de amortiguador TE [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA] a 65°C.

6.12 Transferencia tipo Northern

Para realizar la transferencia tipo Northern se preparó un gel al 1% (w/v) de agarosa, que contenía 1X HEPES/EDTA (0.05M HEPES pH 7.98, 0.001M EDTA) y 0.062% (w/v) formaldehído. Las muestras de RNA que se utilizaron, se alicuotaron para cargar la misma cantidad en cada carril y se liofilizaron. La pastilla se resuspendió con 4.8µL de amortiguador A (0.15M HEPES pH 7.98, 0.003M EDTA) y 9.2µL de solución F/F (9.7% formaldehído, 74% formamida). Las muestras se incubaron a una temperatura de 65°C por 10 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo. A cada muestra se le añadió amortiguador de muestra [1.5µL de 10X Ficoll, que contiene 0.25% (w/v) azul de bromofenol, 0.25% (w/v) xilen cianol, 25% (w/v) Ficoll tipo 400], libre de RNAsas. Las muestras se cargaron al gel y se separaron a 60V constantes utilizando como amortiguador de corrida 1X HEPES/EDTA con 6% formaldehído, hasta que el frente de corrida alcanzó 3/4 partes del gel. Al término de la electroforesis, el gel se lavó durante 15-30 minutos con solución 20X SSC (3M NaCl, 0.3M citrato de sodio) y se transfirió durante toda

la noche, a una membrana de nylon cargada (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) mediante capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando 20X SSC como solución de transferencia. Para fijar el RNA, la membrana se horneó a 80°C en un horno al vacío durante 2 horas. La integridad del RNA se observó tiñendo los RNAr con 0.3M NaOAc pH 5.2, 0.03% azul de metileno (Wilkinson *et al.*, 1990).

6.13 Transferencia tipo Southern

Las muestras de DNA, se cargaron en un gel al 1% (w/v) de agarosa y se separaron a 70V constantes hasta que el frente de corrida recorrió 3/4 partes del gel. El gel se trató durante 45 minutos con solución desnaturalizante (1.5M NaCl, 0.5N NaOH). Se lavó brevemente con agua estéril y se neutralizó con 1M Tris pH 7.4, 1.5M NaCl. El gel se transfirió durante toda la noche, a una membrana de nylon cargada (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) mediante capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando como solución de transferencia 10X SSC (1.5M NaCl, 0.15M citrato de sodio). Para fijar el DNA, la membrana se horneó a 80°C en un horno al vacío durante 2 horas.

6.14 Escrutinio de la biblioteca de cDNA de raíces de frijol

Se realizó una dilución 1:100 (8×10^5 ufp/mL) de la biblioteca de cDNA de raíz de frijol en medio SM (100mM NaCl, 8mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% w/v gelatina). Se tomaron 6.3µL de la dilución (5×10^3 ufp) y se mezclaron con 600µL de suspensión de células XL1-BLUE MRF' (D.O. equivalente a 4.8×10^8 células). La mezcla se incubó a 37°C por 15 minutos para dejar que el fago se adhiriera a las células. Las células infectadas con los fagos se agregaron a 6mL de LB Top Agar (medio LB, 10mM $MgSO_4$, 7.2g/L agar) precalentado a 50°C, y la mezcla se vació rápidamente en una placa de 137mm de diámetro, con LB agar preincubada a 37°C. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche. El escrutinio se llevó a cabo en 30,000 ufp. Las placas se colocaron a 4°C por 2 horas. La

transferencia del DNA de los fagos a una membrana de nylon cargada positivamente (Immobilon-Ny⁺, Millipore), se llevó a cabo poniendo en contacto a la placa con la membrana durante 2 minutos. El DNA transferido se desnaturizó por 2 minutos en una solución 1.5M NaCl, 0.5N NaOH. La neutralización se realizó en una solución 1M Tris (pH 7.4), 1.5M NaCl durante 5 minutos. Finalmente, las membranas se lavaron por 30 segundos en 2X SSC (0.3M NaCl, 0.03M citrato de sodio). Para fijar el DNA, las membranas se hornearon en un horno al vacío por 2 horas a 80°C.

6.15 Hibridación

(Escrutinio de la Biblioteca de cDNA, Transferencias tipo Northern y Southern)

Las membranas obtenidas por transferencia tipo Northern y Southern, o en el escrutinio de la biblioteca, se prehibridaron por 1-2 h a 65°C con amortiguador de hibridación de fosfatos que contiene 300mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.2, 1mM EDTA, 7% SDS. La sonda para la hibridación, se marcó radiactivamente con [α^{32} P] dCTP, utilizando el *kit Random primer (Invitrogen)*. Se desnaturizaron 3 μ L de la sonda (0.6 μ g/ μ L), previamente aislada y purificada, en 20 μ L de agua estéril, calentándola por 5 minutos, en agua en ebullición; el fragmento de DNA se colocó en hielo para no permitir la formación de la cadena doble. Se le agregaron 1 μ L de 500 μ M dATP, 1 μ L de 500 μ M dTTP, 1 μ L de 500 μ M dGTP, 20 μ L de 2.5X de amortiguador Rad Prime (125mM Tris-HCl pH 6.8, 12.5mM MgCl₂, 25mM 2-mercaptoetanol, 150 μ g/ μ L oligodeoxirribonucleótidos: random octamers [octámeros al azar]), y 50 μ Cl de [α^{32} P] dCTP (10 mCi/mL). El volumen se llevó a 49 μ L con agua estéril. Se añadió 1 μ L de fragmento Klenow (40 U/ μ L, 50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 100mM KCl, 1mM DTT, 50% (v/v) glicerol), se mezcló gentilmente y se centrifugó de 15 a 30 segundos. La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con 5 μ L de 500mM EDTA pH 8.0. Para purificar la sonda marcada de los nucleótidos no incorporados, se empacó una columna de Sephadex G-10 en un tubo eppendorf de 0.5mL de capacidad. La mezcla de reacción se cargó en la columna, y ésta se

centrifugó por 5 minutos a 23000g. La sonda purificada se desnaturizó en agua en ebullición, por 5 minutos, y se colocó en hielo durante 5 minutos. La sonda se agregó al amortiguador de hibridación de fosfatos, para que quedara en contacto con las membranas, y se dejaron hibridando durante toda la noche a 65°C en un baño de agua con agitación. Las membranas se lavaron de la siguiente manera: se agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución 2X SSC (0.3M NaCl, 0.03M citrato de sodio), 0.2% SDS, y se realizó un segundo lavado con solución 0.2X SSC (0.03M NaCl, 0.003M citrato de sodio), 0.2% SDS por 20 - 30 minutos a 65°C. Las membranas marcadas radiactivamente se expusieron a placas de rayos-X (Kodak, BIOMAX MS), entre dos pantallas intensificadoras. El cassette se guardó a -70°C.

6.16 Escrutinios consecutivos

Para purificar y aislar una sola placa de lisis, se realizaron escrutinios consecutivos. Los fagos que se encontraban en el medio LB-agar, se eluyeron en 0.5mL de medio SM y 0.02mL de cloroformo, durante 2 horas a 4°C. Se prepararon 100µL de una dilución 10^{-3} de la suspensión de fagos. Se infectaron 200µL de células XL1-Blue MRF' (1.6×10^8 células) con la dilución, y se incubaron por 15 minutos a 37°C. Las células infectadas por los fagos se agregaron a 3.5mL de LB Top Agar (50°C). La mezcla se vació en una placa, de 85mm de diámetro, con LB-agar y se incubó a 37°C durante toda la noche. Las membranas para la transferencia del DNA se realizaron como se describió anteriormente.

6.17 Escisión de fagos

Los fagos seleccionados del LB-agar se eluyeron en medio SM. Se infectaron 200µL células XL1-Blue MRF' (1.6×10^8 células) con 250µL de los fagos eluidos, y 1µL fago auxiliar (1×10^7 ufp). La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 3mL de medio LB con suplementos (10mM MgSO₄, 0.2% maltosa), y se

Incubó por 3 horas a 37°C con agitación. Con el fin de lisar las partículas fágicas y las células, se calentó la mezcla a 65°C por 20 minutos. Para eliminar los restos celulares, la muestra se centrifugó a 1000g por 10 minutos. Para obtener el plásmido de doble cadena, se incubó 1 μ L del sobrenadante que contiene los fagémidos con 200 μ L de células SOLR durante 15 minutos a 37°C. Se tomaron 100 μ L de dicha mezcla y se plaquearon en cajas selectivas con LB agar y ampicilina (50 μ g/mL). Las células se incubaron a 37°C toda la noche.

6.18 Secuenciación de clonas

La secuenciación se llevó a cabo con 5 μ g de plásmido de la clona deseada, en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular, C.U., UNAM

7. RESULTADOS

7.1 CLONA 15.2

Descripción de la clona 15.2

La clona 15.2 fue obtenida en el laboratorio previamente. Se identificó a través de la técnica de AFLP-cDNA, al realizar la búsqueda de genes cuya expresión se ve aumentada en condiciones de deficiencia de fosfato.

Con el fin de llevar a cabo una caracterización, el DNA de esta clona se introdujo en el vector pGEM-T Easy Vector (Figura 7.1). El plásmido obtenido se nombró como p15.2.

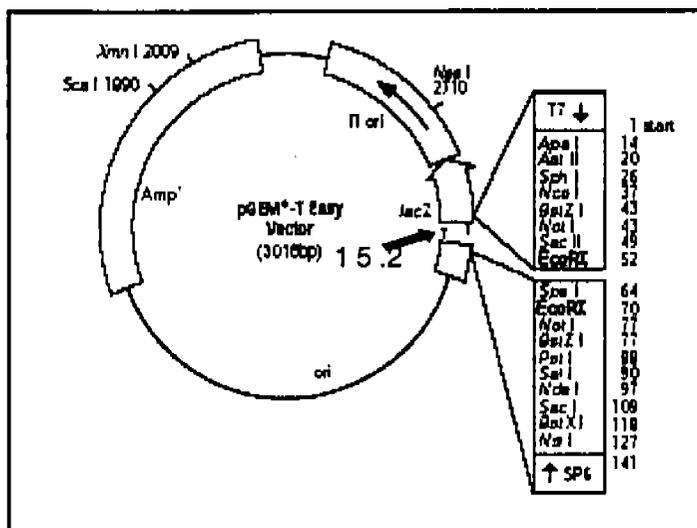


Figura 7.1 Mapa del plásmido pGEM-T Easy Vector. El sitio de inserción de la clona 15.2 se muestra con una flecha, y los sitios de corte con *EcoRI* se encuentran en los cuadros grises.

Después de transformar células de *Escherichia coli* con p15.2, se realizó la extracción del mismo a partir de un cultivo de células. Mediante una digestión del plásmido con la enzima de restricción *EcoRI* (Figura 7.2A), se liberó el inserto, el cual se aisló directamente del gel de agarosa al 1% (Figura 7.2B).

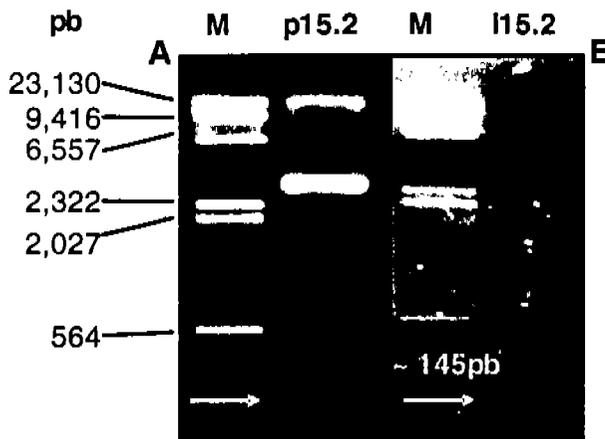


Figura 7.2 A. Digestión del plásmido p15.2 con *EcoRI*. B. Inserto aislado del gel anterior (i15.2). El inserto está señalado con flechas blancas. M—marcadores de peso molecular

Expresión diferencial de la clona 15.2 en deficiencia de Pi

Mediante una transferencia tipo Northern, se demostró que la clona 15.2 aumenta su expresión en raíces de plantas en deficiencia de Pi. Existe una baja expresión en el control; y al primer día de deficiencia, el mensaje aumenta de manera importante. Dicha expresión disminuye paulatinamente y al quinto día de tratamiento los niveles están por debajo del control (Figura 7.3A).

El análisis de las bandas por densitometría indica que la expresión al primer día de deficiencia de fosfato aumentó un 78% con respecto al control; mientras que al tercer y quinto día, la expresión es de 88% y 32% la expresión del control, respectivamente (*Figura 7.3C*).

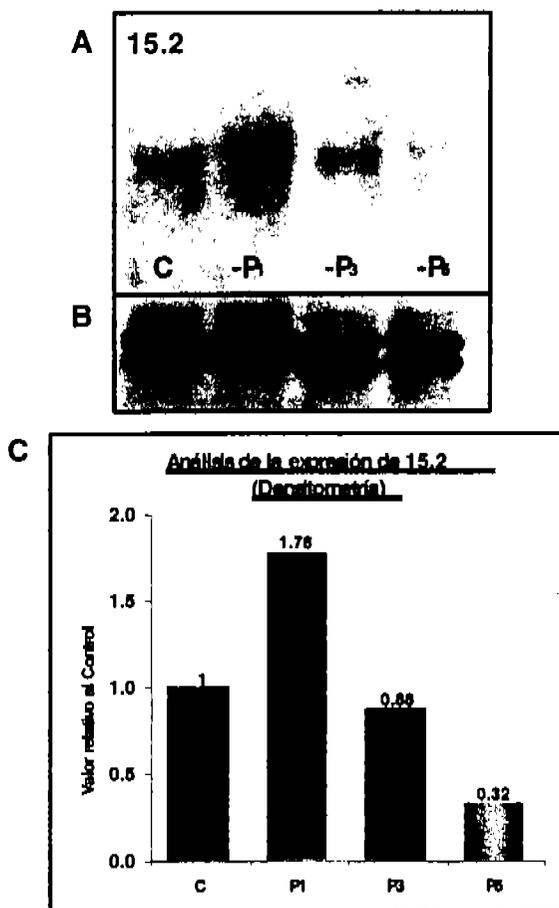


Figura 6.3 Expresión diferencial de la clona 15.2 en deficiencia de fosfato.

A. Transferencia tipo Northern de la clona 15.2 contra RNA aislado de raíces de frijol tratadas con 1, 3 y 5 días de deficiencia de Pi.

B. Integridad del RNA aislado de raíces de frijol, transferido a membranas Hybond-N⁺.

C. Comparación de la expresión de las bandas obtenidas en A por densitometría.

Análisis de la secuencia de la clona 15.2

La clona 15.2 consta de 113pb cuya secuencia se muestra en la figura siguiente.

```

1  AATTCACAGCACACCAAGGGAGATTATTCATTTCTCAGTGCAGGCTTCTGGAACTTAC 60
61 CGTGAACCCACACTCTTGCCATGCACTTCCCTTTCTGGCGATTTATAGACTTA 113
  
```

Figura 7.4 Secuencia de nucleótidos de la Clona 15.2

La secuencia de la clona, traducida a aminoácidos en todos los marcos abiertos de lectura, se comparó con Proteínas reportadas, utilizando la Base de datos Swissprot. En el segundo marco de lectura de 3' a 5' existe una secuencia de 28 aminoácidos, que presenta homología con dos proteínas con actividad de metiltransferasas (Figura 7.5).

```

T [REDACTED] GGTAAGTTC
[REDACTED] G K F
[REDACTED] ATAATCTCCCTTGGTGTGCTGTGAGAATT
[REDACTED] S P L V C C E N
  
```

Figura 7.5 Traducción de la Clona 15.2 Segundo marco de lectura 3'-5' (-2)

La secuencia sombreada es similar a una metiltransferasa de ratón (282aa) y de *Drosophila melanogaster* (325aa), ambas con un índice de identidad de $10^{-3.3}$ (Figura 7.6).

```

Raton      246  RETVWKKKELCVDAVFLQSKERKPKDPAPTSLSASLII 10-3.3
Drosophila 301  RLQVNRCRRLKMYDANIQTGRKRL-----II 10-3.3
15.2      1    -KSLNRKRLKCMQVNVHGKQKVALRNE-----
  
```

Figura 7.6 Alineamiento de la Clona 15.2 traducida a aminoácidos, con una proteína homóloga a metiltransferasas en ratón y *Drosophila melanogaster*

Al comparar la secuencia de nucleótidos traducida, con la base de datos de proteínas de *Arabidopsis*, no se encontró ninguna similitud. A pesar de que el resultado de la búsqueda arrojó similitud con algunas proteínas reportadas, el índice de identidad es alto, por lo que la homología es pobre. Esto pudo deberse a que el fragmento de nucleótidos era muy pequeño. Una de las formas para obtener un fragmento mayor de la clona 15.2 es realizar un escrutinio en una biblioteca de cDNA. De esta forma se tendría un fragmento mayor del mensaje, para poder determinar la identidad de la clona 15.2, y su posible papel en la deficiencia de fosfato.

7.2 OBTENCIÓN DE LA CLONA R15.2

Escrutinio de la Biblioteca de cDNA de raíces de Frijol

Buscando un fragmento mayor de la clona 15.2, se llevó a cabo el escrutinio de una biblioteca de cDNA de raíces de frijol en deficiencia de fosfato, obtenida con anterioridad en el laboratorio. Los fagos de la biblioteca de cDNA se utilizaron para infectar células XL1-Blue, produciéndose placas de lisis. El DNA de los fagos se transfirió a membranas de Nylon cargadas positivamente. Las membranas se hibridaron utilizando a la clona original como sonda. Como resultado del escrutinio, se aislaron 4 muestras con fagos purificados, que contenían un inserto que hibridaba con 15.2. Éstos fueron nombrados como I, III, IV, V (*Figura 7.7*). Todas estas placas provenían de la misma membrana original. Las otras placas aisladas, fueron falsos positivos, pues en una segunda hibridación no se obtuvo señal.

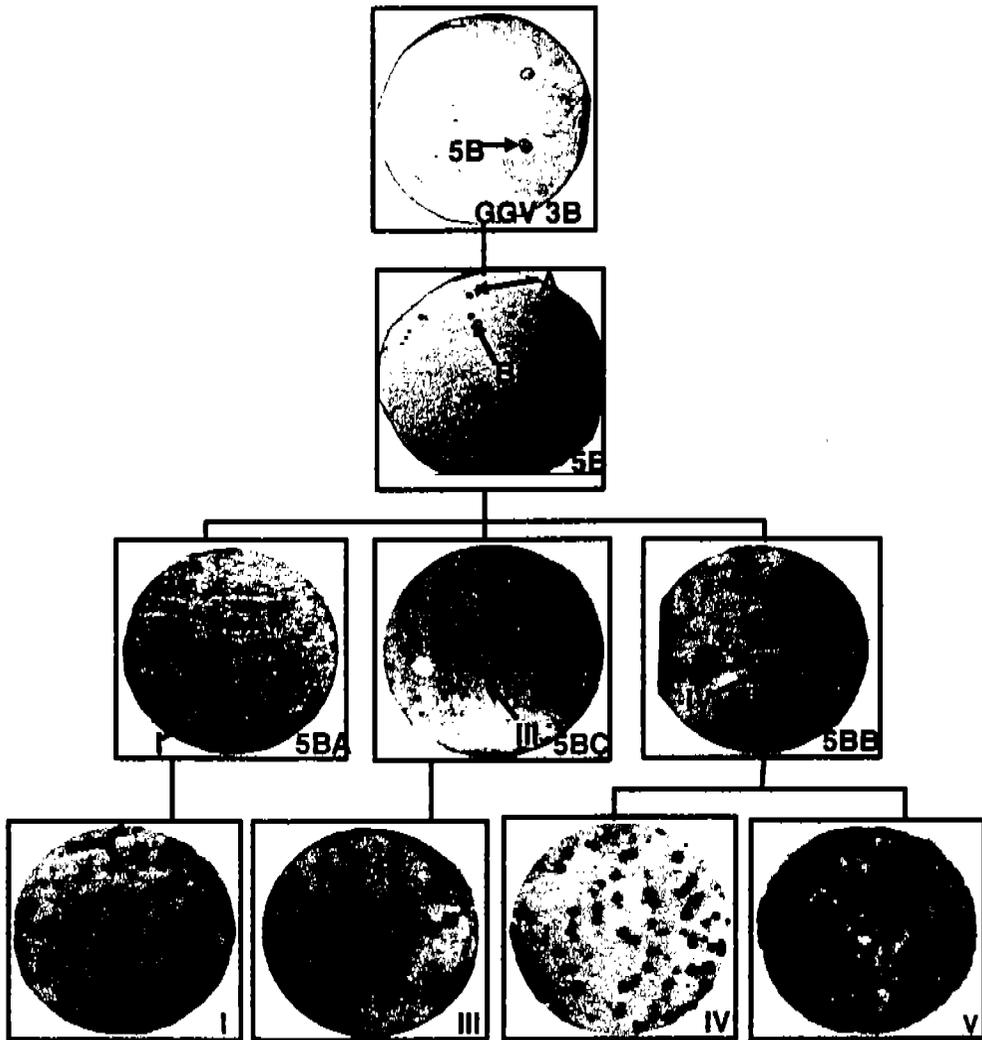


Figura 7.7 Esquematización de los 4 escrutinios consecutivos llevados a cabo para obtener las clonas I, III, IV y V. Éstas se muestran en la parte baja de la figura.

Escisión de los fagos obtenidos en el escrutinio de la Biblioteca de cDNA

El vector (fago λ) en el que se encuentran contenidos los insertos tiene un sitio en el DNA que reconocen las proteínas del bacteriófago f1 como origen de replicación, y otro que es reconocido como el sitio de terminación de síntesis de DNA. La secuencia contenida entre estos dos sitios corresponde a la del plásmido pBluescript SK(-). Dicho plásmido contiene en su Sitio de Clonación Múltiple (SCM), la secuencia del inserto que hibridó con 15.2.

Basándose en lo anterior, se llevó a cabo el proceso de escisión de fagos. El proceso involucra una coinfección de células XL1-Blue con los fagos eluidos de cada muestra obtenida del escrutinio y con el fago f1 ("fago auxiliar"). Las proteínas del fago auxiliar replicaron la secuencia entre los sitios de origen y terminación, obteniéndose una cadena sencilla de DNA. La cadena se circularizó con el producto del gen II del fago auxiliar. Las células infectadas se lisaron, para liberar el DNA circular, e introducirlo en células SOLR, que no permiten la replicación del fago auxiliar, pero sí la del vector con el inserto. De esta manera, se obtiene el vector pBluescript con el inserto deseado en él (*Figura 7.8*). Cada escisión se realizó por duplicado (A y B para cada muestra).

Transferencia tipo Southern

Para comprobar que existía un inserto de DNA en cada plásmido obtenido, se llevó a cabo una digestión con las enzimas *BamHI* y *KpnI*, que eran las enzimas que flanqueaban el sitio de inserción. Con el fin de visualizar dicho inserto, se corrió un gel de agarosa (*Figura 7.9A*). Para

las muestras (IB, IIIA y IIIB), la banda situada en la parte superior del carril corresponde al plásmido (aproximadamente 3kb), mientras que la banda inferior, al inserto liberado del plásmido. Las tres muestras presentaban insertos de tamaño similar (~1kb). Para determinar si estos insertos tenían la capacidad de hibridar con la clona 15.2, se realizó una transferencia tipo Southern utilizando la sonda original de 113 pb (Figura 7.9B).

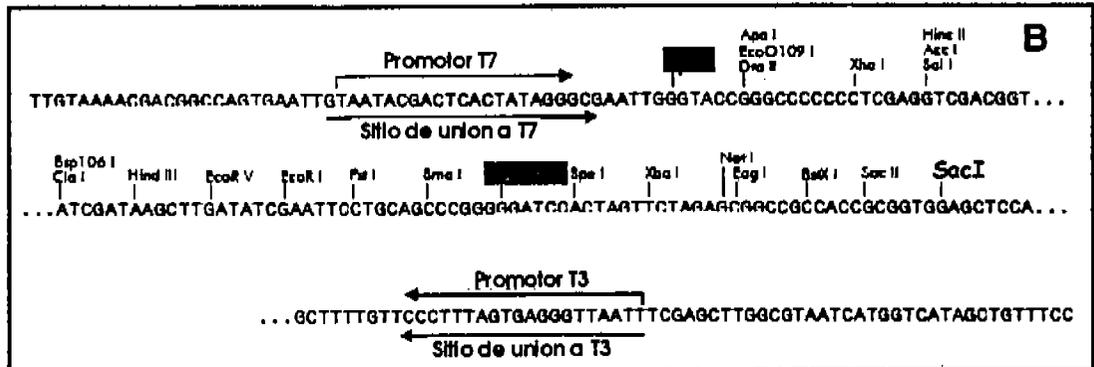
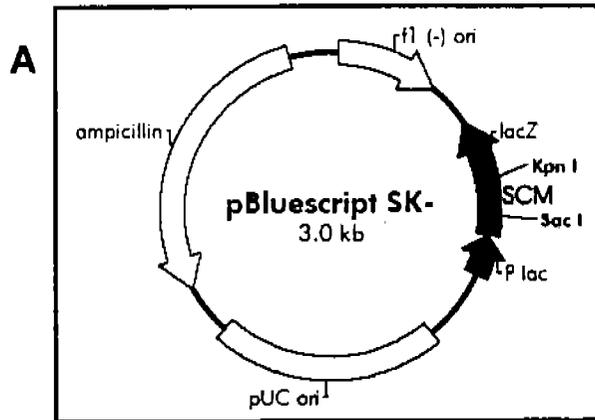


Figura 7.8 A. Mapa del vector pBluescript SK-
B. Sitios blanco para diversas enzimas de restricción. Los sitios en donde pueden cortar *BamHI* y *KpnI* están resaltados en gris.

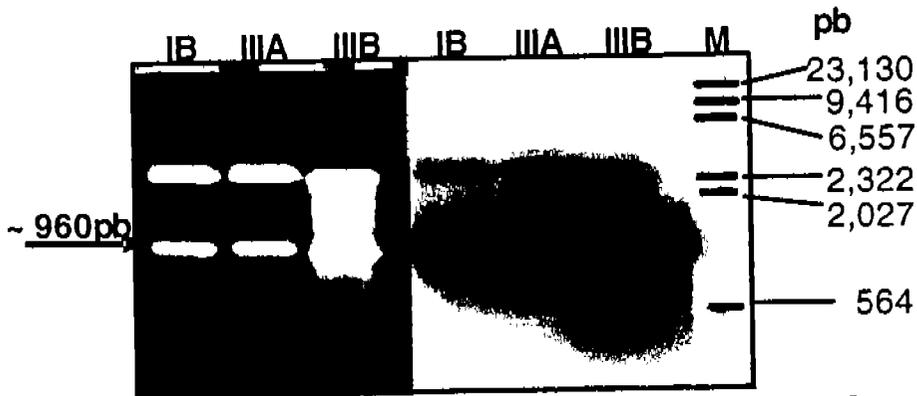


Figura 7.9 A. Digestión de los plásmidos IB, IIIA y IIIB, obtenidos en el escrutinio de la biblioteca de cDNA de raíces de frijol.

B. Transferencia tipo Southern de la digestión anterior. Utilizando como sonda 15.2.

Al observar la *Figura 7.9*, se puede notar que los 3 Insertos hibrdaron con la sonda 15.2, indicando que representan fragmentos mayores de la clona original. La muestra IIIA se eligió para realizar los siguientes experimentos. Esta *clona será referida de ahora en adelante como R15.2*.

7.3 CLONA R15.2

Expresión diferencial de la clona R15.2 en deficiencia de Pi

Para corroborar que el fragmento de ~1kb también aumentaba su expresión ante la deficiencia de fosfato, se realizó una hibridación tipo Northern (*Figura 7.10A*). El análisis densitométrico indica un aumento significativo en su expresión en muestras que tenían 1, 3 y 5 días de deficiencia (*Figura 7.10C*), en comparación con el control.

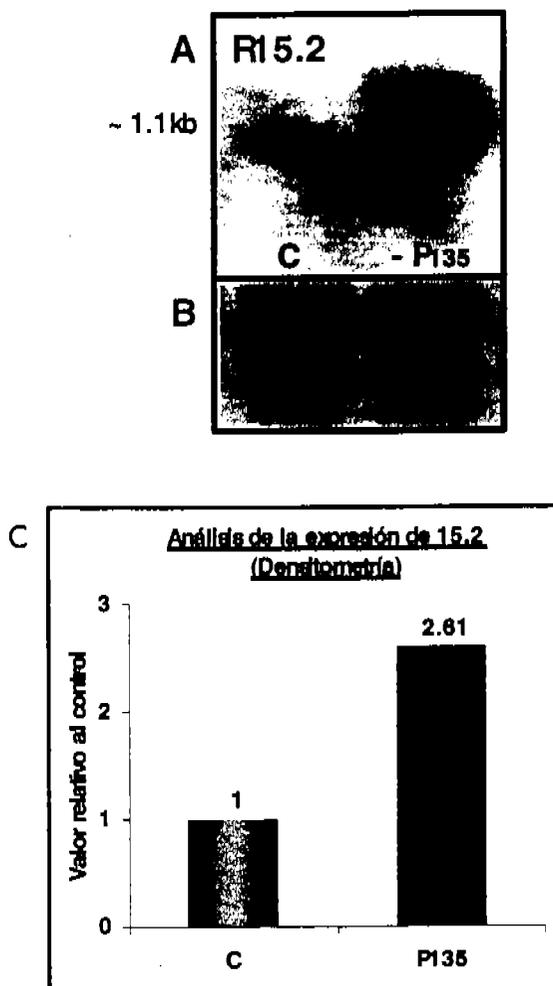


Figura 6.10 Expresión diferencial de la clona R15.2 en deficiencia de fosfato
A. Transferencia tipo Northern de la clona 15.2 contra RNA de raíces de frijol (Mezcla 1,3 y 5 días de tratamiento).
B. Integridad del RNA aislado de raíces de frijol, transferido a membrana Hybond-N+
C. Comparación de la expresión de las bandas obtenidas en A, mediante densitometría.

El tamaño del mensaje que corresponde a las bandas de la *figura 7.10A*, sugiere un fragmento de 1.1kb, tamaño que está muy cerca del fragmento aislado de la biblioteca de cDNA (960pb).

Transferencia tipo Southern

Con el fin de conocer más características de la clona obtenida en el escrutinio de la biblioteca de cDNA, se aisló DNA genómico a partir de hojas de frijol. Su integridad se comprobó al correr 1 μ g en un gel de agarosa, visualizándose una sola banda en el gel, sin ningún barrido (*Figura 7.11*).

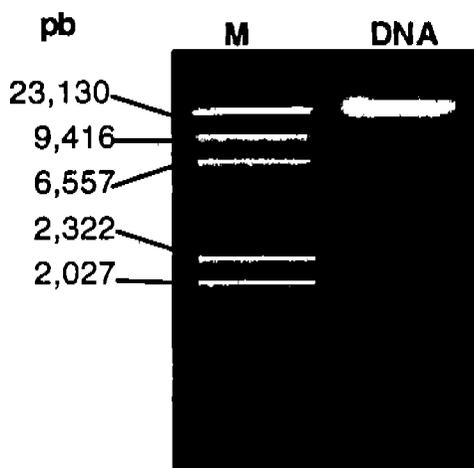


Figura 7.11 Gel de agarosa al 1% con DNA (1 μ g), obtenido a partir de hojas de frijol.

Se tomaron alícuotas de 30 μ g de DNA y se digirieron con *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII* como enzimas de restricción. El DNA digerido se separó en un gel de agarosa (*Figura 7.12A*), y se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente.

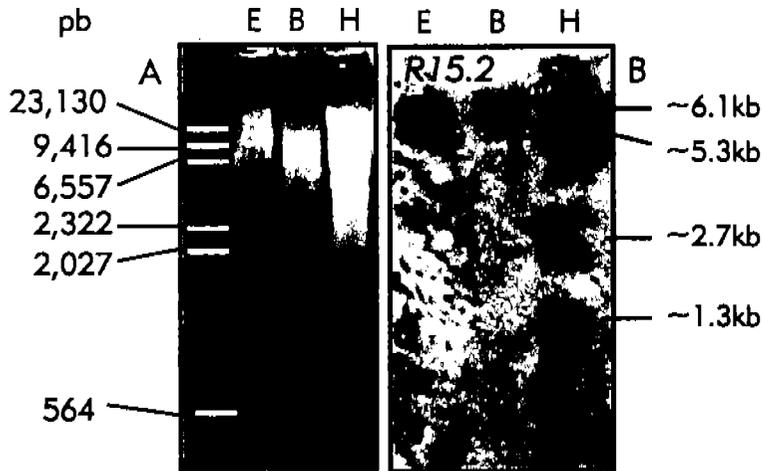


Figura 7.12 A. Digestión de DNA genómico de raíces de frijol, con las enzimas *EcoRI* (E), *BamHI* (B) y *HindIII* (H). B. Transferencia tipo Southern de la digestión de A. Utilizando R15.2 como sonda.

Se realizó una transferencia tipo Southern con el DNA transferido, utilizando como sonda a la clona R15.2 (*Figura 7.12B*). El análisis de la Hibridación Southern reveló la presencia de tres bandas en el carril de DNA digerido con *Hind III*. Los otros dos carriles, que contenían menor cantidad de DNA, no mostraron bandas muy definidas.

Respuesta de R15.2 ante la resuplementación con Pi

Para observar la expresión de la clona R15.2 en raíces de frijol que han sido resuplementadas con fosfato, después de un día de deficiencia, se realizó una transferencia tipo Northern, hibridando con la sonda R15.2 (*Figura 7.13A*).

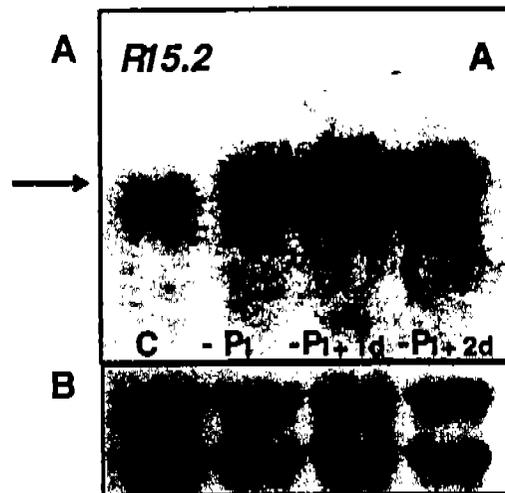


Figura 7.13 Respuesta de la clona R15.2 ante la resuplementación con Pi.

A. Transferencia tipo Northern de la clona 15.2 contra RNA de raíces de frijol con tratamiento de 1 día de deficiencia en Pi, y resuplementando con fosfato por 1 y 2 días.

B. Integridad del RNA aislado para la transferencia tipo Northern de raíces de frijol, transferido a membrana Hybond-N+

Como ya se había mencionado, la expresión de la clona R15.2 se ve aumentada en el primer día de deficiencia con respecto al control. En el caso del tratamiento de resuplementación con fosfato, al primer día, se aprecia que la cantidad de transcrito es mayor que la del primer día de deficiencia. Esta cantidad disminuye para el segundo día de resuplementación con Pi, aunque todavía no alcanza los niveles del control (*Figura 7.13A*).

Análisis de la secuencia de nucleótidos de la Clona R15.2

El análisis de la secuencia, utilizando los promotores T7 y T3, dio como resultado una secuencia de 1131pb, la cual contenía a la clona original de 113pb (*Figura 7.14*).

15_	15.2	1	-----	
T3_	R15.2	51	AGCAGAAACTTGAATAAGTGTACATTTTCATCTG	
15_	15.2	17		
T3_	R15.2	31		
15_	15.2	67		
T3_	R15.2	31		ACA

Figura 7.14. Alineamiento de la Clona R1.2 conteniendo a la clona 15.2

Teniendo la secuencia R15.2, ésta se tradujo obteniendo un marco de lectura de 218 aminoácidos que se presenta en la *Figura 7.15*.

Al buscar en la base de datos **Swissprot**, se encontró que, existe homología con proteínas parecidas a metiltransferasas, pertenecientes a diferentes especies. La *Tabla 7.1* indica los datos más importantes obtenidos en la búsqueda de homología proteína traducida-proteína para R15.2. Los índices de identidad de la *Tabla 7.1* reflejan una buena homología con metiltransferasas. Sin embargo, esta base de datos no muestra ninguna semejanza con proteínas pertenecientes a plantas.

```

AGACGTCCTAGCATGGAAAGCAATTTACCTTCGT CACG CATCTGGAACATTTCTTCAAGGAA
D V L A W K Q F H L R H A S G T F F K E
AGACGCTATTTGTTGAAGGAGTTCCTCCAGAACTACTCTCTCTCCCCAAACTCTAAGCTC
R R Y L L K E F P E L L S S P P N S K L
TTGGAAGTTGQTTGCGGCAATGGCAGCACTGCTCTTCCATTCTACGGGCAACAAAGAT
L E V G C G N G S T A L P I L R A N K D
TTGACTGTTTATGTATGCCACTGTAGTGATGAGACTCTTGAGAGGGCTAAAGAGATTATA
L T V Y V C D C S D E T L E R A K E I I
AGTGATGCCTCAACATCCTTTCAGTATCGT TTCCGTACATTCGTTGTGATATTTCACC
S D A S T S F Q Y R F R T F C C D I S T
AATGGATTCCCAACTGGTTGGCATGCTAC CTTGTCGAGATAAATTTTTACAAAAGCAG
N G F P T W L A C Y P C R D K F L Q K Q
TCATATGTTTGTGATGTCTAGAGAGGGTAATGGACTGCATTTTACCAATACATATCCA
S Y C L S D V R E G N G L H F T N T Y P
TCAGAAAGATGAATGTTGTGTTGGCGGAGTAGATT TTTAACAATTGATCTTCACACTATCA
S E D E C C V G G V D F I T L I F T L S
GCAGTACCCCTTAGGATGTC AAAATCTGTCAAAGAATGCTTTTTCGTTGTAAGCCA
A V P L D R M P K S V K E C F F V L K P
GGAGGCATGGTTTTTTAGGGACTA TGCCCTCTATGATGACTATGCTCGATTGAG
G G M V F F R D Y G L Y D M T N L R F E
CAAGACAAGCGAGTGGGATTCAGGGAAATACATGCCGGTCAGATGAAACACGATCATATTTTC
Q D K R V G P R E Y M R S D G T R S Y F
TTTGTTTAGATGCCGTCGGAACTATTTTGGGGTCCGCTCCTCAGCTTGAGCTTG
F V - M P S G T Y F W V R A S L S L S T
AATACTGTTGTTAAGTCTATAAATCGCCAGAAAGGAAAGTGCATGCAAAGAGTGTGGG
N T V V L S L - I A R K G S A C K E C G
TTCAGCGTAAGTTCAGAAAGCC TGCACTGAGAAATGAATAATCTCCCTTGCTGCTGTG
F T V S S R S L H - E M N N L P W C A V
AGAAATCAGATGAAAATGTACA CTTA TTCAAGTTTCTGCTACGCTGAAGAGAAAACAGGTA
R I Q M K M Y T Y S S F C Y A E E K Q V
GAAAAGAAATCTGATGTC AATG TAGT CTTTATTTTCGCTCC TAAATTTTTATTGCGCTAG
E K N S D V N V V L Y F R S - I L L R -
AAAATCTGAAATGATTTATTTCTGAAA CAGA AATATTGATATCATGGCTTCAGTGCAGAT
K I - N D Y F - N R K Y - Y H G F S A D
TAATCTATTTGTGAATTTGTTGATTG AATGAGAAATTCGGGGAAGCGGCATTTATTTTCT
- S I C E L L Y - M R I R E A G C I Y F P
TAAAAAACCTATTTTCTG TAAAACCTCGTG CCGAATTCCTGCAGCCCGGG
- K N L E C - N L V P N S C S P

```

Figura 7.15 Secuencia de nucleótidos de R15.2 traducida a aminoácidos (Segundo marco de lectura)

#	Nombre	Especie	Índice de identidad
1	Homólogo de Metiltransferasa	Ratón	1×10^{-27}
2	Proteína parecida a Metiltransferasa	Humano	7×10^{-23}
3	Proteína parecida a Metiltransferasa	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	8×10^{-21}
4	Proteína parecida a Metiltransferasa	<i>Drosophila melanogaster</i>	9×10^{-20}

Tabla 7.1 Homología de R15.2 con metiltransferasas de varias especies (Swissprot)

aproximadamente 70 aminoácidos antes de que el alineamiento con el primer aminoácido de R15.2 de frijol inicie (Figura 7.16). Esto, junto con la falta de una metionina al inicio de la secuencia, indica que la secuencia de nucleótidos está incompleta, lo que coincide con una diferencia en tamaño entre el rRNA y el cDNA obtenido.

En la base de datos de *Arabidopsis thaliana*, se encontró una homología con proteínas metiltransferasas, aún más fuerte que con las especies encontradas en la base de datos Swissprot (*Tabla 7.2*).

#	Nombre	Gen	Índice de identidad
1	Metiltransferasa	At1g54650	7×10^{-94}
2	Metiltransferasa	T22H22.9	1×10^{-89}

Tabla 7.2 Homología de R15.2 con metiltransferasas de *Arabidopsis thaliana*

La cadena de aminoácidos obtenida se comparó con las metiltransferasas encontradas en las base de datos de Swissprot y *Arabidopsis thaliana* (*Figura 7.16*). El alineamiento reveló que existen muchos aminoácidos conservados entre todas las metiltransferasas. Se puede notar que existen una mayor cantidad de aminoácidos idénticos entre las metiltransferasas de plantas, que con las de otras especies.

Las metiltransferasas de *Arabidopsis* tienen una cadena de aproximadamente 70 aminoácidos antes de que el alineamiento con el primer aminoácido de R15.2 de frijol inicie (*Figura 7.16*). Esto, junto con la falta de una metionina al inicio de la secuencia, indica que la secuencia de nucleótidos está incompleta, lo que coincide con una diferencia en tamaño entre el RNAm y el cDNA obtenido.

R15.2 tiene una divergencia del 30%, en su secuencia de aminoácidos, con respecto a las de *Arabidopsis*. En tanto que, la similitud de R15.2 con las metiltransferasas de las otras especies estudiadas es mucho menor, pues en todos los casos, sus secuencias divergen en más del 55% (Tabla 7.3).

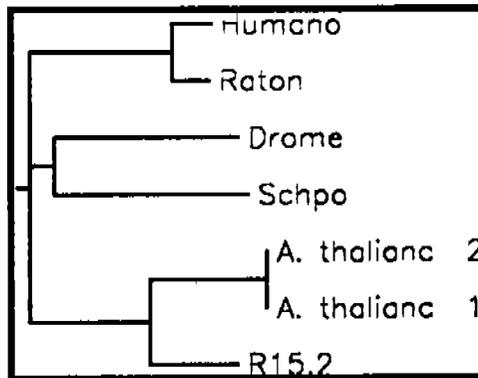


Figura 7.17 Árbol filogenético de metiltransferasas de humano, ratón, R15.2, *A. thaliana*, *Drosophila melanogaster* y *Schizosaccharomyces pombe*.

	Humano	Ratón	Drome	Schpo	A. thaliana 1	A. thaliana 2	R15.2
		11.4	59.2	60.2	62.7	62.7	58.9
	11.4		58.9	59.4	62.8	62.8	58.9
	59.2	58.9		57.3	67.5	67.5	61.7
	60.2	59.4	57.3		68.8	68.8	65.1
	62.7	62.8	67.5	68.8			31.0
	62.7	62.8	67.5	68.8			31.0
	58.9	58.9	61.7	65.1	31.0	31.0	

Tabla 7.3 Árbol filogenético de metiltransferasas de B. Matriz de similitud entre las metiltransferasas presentes en el cuadro filogenético de la figura 7.17

Lo anterior comprueba que las metiltransferasas de las plantas analizadas, están relacionadas de manera cercana; y, aunque tienen secuencias conservadas, poseen diferencias importantes con las

metiltransferasas de humano, ratón, *Drosophila melanogaster* y *Schizosaccharomices pombe*.

Al realizar una búsqueda proteína-proteína en la base de datos Swissprot de las secuencias de aminoácidos de *Arabidopsis*, se encontró que poseen el dominio de metilasa Ubi_E (Figura 7.16), que pertenece a metiltransferasas involucradas en la biosíntesis de la Ubiquinona (ó Coenzima Q, un componente de la cadena respiratoria mitocondrial). Este dominio está presente también en la secuencia de aminoácidos de la clona R15.2 de frijol.

La evidencia presentada anteriormente muestra que la clona R15.2 podría codificar para una metiltransferasa de frijol, pues tiene una gran similitud con éstas proteínas tanto en *Arabidopsis thaliana* como en ratón, humano, *Drosophila melanogaster* y *Schizosaccharomices pombe*.

8. DISCUSIÓN

Como parte de la respuesta a la deficiencia de fosfato, una gran cantidad de genes aumenta su expresión (Raghothama, 1999). Se han reportado genes con una respuesta inmediata a la deficiencia de Pi, cuya expresión se da unas cuantas horas después de iniciada la deficiencia. Un ejemplo de éstos son los genes *TpsI1* y *LePS2* de jitomate (Liu *et al.*, 1997; Stenzel *et al.*, 2003), así como en los transportadores de fosfato de *Arabidopsis* *AtPT1* y *AtPT2* (Uhtappa *et al.*, 2001). La fosfatasa ácida *AtACP5* de *Arabidopsis thaliana* se induce desde el segundo día de deficiencia (del Pozo *et al.*, 1999). En contraste, la expresión de otros genes se da después de varios días de deficiencia, como es el caso de calmodulina, una citocinina oxidasa y una fosfatasa de lupino blanco (Uhde-Stone *et al.*, 2003).

Por medio de la técnica de AFLP-cDNA se identificó y aisló una clona, 15.2, que responde a la deficiencia en fosfato. Este mensaje se incrementó rápidamente ante la inanición de Pi, en el primer día de tratamiento, para posteriormente regresar a los niveles del control (Figura 7.3). Este resultado contrasta con los encontrados para otros genes que responden ante la deficiencia de fosfato, como *AtPT2* (Uhtappa *et al.*, 2001), PEPC (Peñalosa *et al.*, 2002), *AtACP5* (del Pozo *et al.*, 1999), *LePS2* (Baldwin *et al.*, 2001) y *LePT1* (Liu *et al.*, 1998), cuya expresión aumenta al transcurrir el tiempo de inanición. Por otro lado *AtPT1*, presenta una expresión aumentada de su mensaje, pero es constante al pasar los días de tratamiento (Uhtappa *et al.*, 2001).

A pesar de obtener la secuencia de la clona 15.2, ésta no fue lo suficientemente grande para establecer una homología importante con proteínas reportadas en la base de datos Swissprot (Figura 7.6).

Buscando una secuencia mayor de 15.2 se llevó a cabo un escrutinio de una biblioteca de cDNA obtenida de raíces de frijol que habían estado en deficiencia de fosfato durante 1, 3 y 5 días (*Figura 7.7, 7.9*). La expresión de la clona R15.2 fue evaluada con hibridaciones tipo Northern, encontrando coincidencia en la expresión con la de la clona original (*Figura 7.10*).

El análisis tipo Southern da indicios de cuántos genes similares se encuentran en el genoma de ese organismo. Este tipo de experimento ayudó a discernir la existencia de una familia génica formada por 3 fosfatasa ácidas de jitomate (Stenzel *et al.*, 2003), al obtenerse varias bandas en las diferentes digestiones. Para los transportadores de Pi LePT1 y LePT2, la existencia de dos bandas en algunas de las digestiones realizadas, sugería la presencia de una pequeña familia génica (Liu *et al.*, 1998). En el caso de R15.2, la digestión con *Hind III* (*Figura 7.12*) sugiere la existencia de una familia génica al encontrarse tres bandas. Sin embargo, en los otros carriles no había bandas muy definidas, pues la cantidad de DNA cargado con las otras digestiones era menor. Se necesitan realizar digestiones con una mayor cantidad de DNA en los geles, para corroborar la presencia de una familia génica en el caso de la clona R15.2.

En el caso de una planta que ha sido sometida a inanición de fosfato, se ha comprobado que la expresión de genes que aumentan su cantidad de transcrito, regresan a niveles normales después de ser resuplementados (Liu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Stenzel *et al.*, 2003). En la *Figura 7.13* se observó la expresión de la clona R15.2 ante la resuplementación de Pi, después del primer día de deficiencia. Durante el primer día de resuplementación, el transcrito aumentó y comenzó a disminuir hasta el segundo día de resuplementación. Sin

embargo, no se llegó al mismo nivel del control. Sería necesario realizar experimentos evaluando la resuplementación con fosfato por un tiempo más prolongado. Adicionalmente, en la *Figura 7.3* se muestra que la expresión aumenta el primer día, y para el tercer día de deficiencia disminuye, pero no se tiene una referencia de la expresión de la clona en el segundo día de tratamiento. Es posible que sea el segundo día, y no el primero el que tenga una expresión mayor de R15.2 en raíces de frijol, y esto explicaría por qué existe un aumento en la expresión en ese día. A su vez, el efecto de la resuplementación podría no ser inmediato, sino hasta el segundo día. Un comportamiento similar se encontró para la fosfatasa ácida AtACP5 cuya expresión disminuye de manera paulatina desde el segundo día de resuplementación con PI y llega a niveles normales del control hasta el sexto día (del Pozo *et al.*, 1999).

La secuencia de la clona R15.2, aunque incompleta, presentó homología con las dos metiltransferasas de *A. thaliana*, implicadas en la síntesis de la Ubiquinona o Coenzima Q (*Tabla 7.2, Figura 7.16, Figura 7.17*). La Ubiquinona es un lípido que tiene como función primaria el transporte de electrones del complejo I al complejo citocromo bc en la cadena respiratoria (Barkovich *et al.*, 1997).

La secuencia de aminoácidos de R15.2 de frijol comparte con las metiltransferasas de *Arabidopsis thaliana*, un dominio llamado metilasa Ubi_E, perteneciente a una metiltransferasa de *E. coli*. Ésta interviene en un paso de metilación durante la síntesis de la Ubiquinona (Lee *et al.*, 1997). Además, se ha visto que UBI E posee tres motivos que utilizan las metiltransferasas dependientes de S-adenosil-metionina, como donador de metilos. Tanto UBI E, como su análogo en *S. cerevisiae* (COQ5), son indispensables para la formación de la Ubiquinona (*Figura*

7.1) y para el funcionamiento adecuado de la cadena respiratoria (Baba *et al.*, 2004).

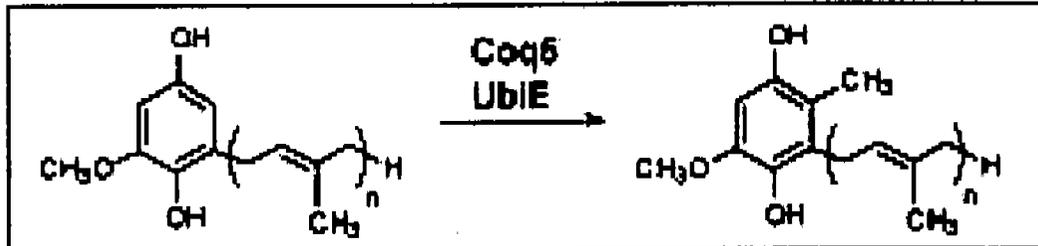


Figura 8.1 Reacción de la síntesis de la Ubiquinona en la que participan las metiltransferasas UBIE y COQ5.

Lange y Ghassemian (2003) encontraron una metiltransferasa parecida a UBI E y a COQ5 en el genoma de *A. thaliana*, lo que indica que estos genes también están presentes en plantas.

Durante la deficiencia de Pi, se activa una vía llamada de la oxidasa alterna, no fosforilativa en la mitocondria que permite el funcionamiento del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Poirier y Bucher, 2002). En la vía de la oxidasa alterna, la Ubiquinona no transfiere los electrones hacia el citocromo bc, sino que los da a la oxidasa para producir agua (Berthold y Siedow, 1993).

Se ha demostrado que la sobreexpresión en plantas de la síntesis de Ubiquinona, le proporciona una mayor tolerancia al estrés oxidativo (Ribas-Carbo *et al.*, 1995).

El genotipo de frijol utilizado en este trabajo, Mar1, es considerado como tolerante ante la deficiencia de fósforo, por lo que es capaz de desarrollar estrategias que le permitan reaccionar mejor al estrés de

fosfato. Con base en los resultados obtenidos, podríamos suponer que una de esas estrategias sería la de incrementar los niveles de Ubiquinona, a través de la expresión de la metiltransferasa. De esta manera, Mar1 sería capaz de amortiguar el estrés oxidativo y dirigir los electrones hacia la vía de la oxidasa alterna de una manera más eficiente, durante la deficiencia de fosfato. Esta hipótesis tendría que ser demostrada.

9. CONCLUSIONES

- ✓ La clona R15.2 es regulada positivamente durante los primeros días de deficiencia de fósforo.
- ✓ La clona R1.5.2 responde ante la resuplementación con fosfato, disminuyendo sus niveles de expresión.
- ✓ La clona R15.2 es, posiblemente, parte de una familia génica.
- ✓ La secuencia traducida de R15.2 tiene alta homología con metiltransferasas involucradas en la síntesis de la Ubiquinona.

10. REFERENCIAS

- Acosta J A, Acosta L, Alvarado S. 1995. **Identificación de genotipos de frijol con adaptación a suelos de baja fertilidad.** Taller internacional sobre bajo fósforo en frijol común. Costa Rica. pp. 26 - 34
- Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. 1990. **Cross Talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by phoM protein: phoM is a histidine protein kinase and catalyses phosphorylation of phoB and phoM-open reading frame 2.** J. Bacteriol. 172(11): 6300-6307
- Baba S W, Belogradov G I, Lee J C, Lee P T, Stahan J, Shepherd J N, Clarke C F. 2004. **Yeast Coq5 C-Methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in Coenzyme Q biosynthesis.** J. Biol. Chem. 279(11): 10052-10059
- Baldwin J, Karthikeyan A, Raghothama K G. 2001. **LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato.** Plant Physiol. 125: 728-737
- Barkovich R J, Shtanko A, Shepherd J, Lee P T, Myles D C, Tzagoloff A, Clarke C F. 1997. **Characterization of the COQ5 Gene from *Saccharomyces cerevisiae*.** Evidence for a C-Methyltransferase in Ubiquinone Biosynthesis. J. Biol. Chem. 272 (14): 9182-9188

- Bates T R, Lynch J P. 1996. **Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability.** Plant Cell Env. 19: 529–538
- Bates T R, Lynch J P. 2000. **The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition.** Am. J. Botany 87 (7): 964 – 970
- Berthold D A, Siedow J N. 1993. **Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) mitochondria.** Plant Physiol. 101: 113–119
- Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. 1991. **The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter.** Mol. Cell. Biol. 21(6): 3229–3238
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. **Single step method for RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate.** Anal. Biochem. 162: 156
- Coello P. 2001. **Respuesta de las plantas a la deficiencia de fosfato.** En Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Bernal I. y Loza H. eds. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 43 – 54
- Coello P. 2002. **Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*.** Physiol. Plantarum 116: 293–298

- Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M. 1999. ***Pht2;1* Encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis***. Plant Cell 11:2153-2166
- Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. 1983. **Isolation of DNA from higher plants**. PMB Reporter 4: 19-21
- Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petétot J, Somerville C, Polrer Y. 2002. **Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem**. Plant Cell 14: 889-902
- Jiang W, Metcalf W W, Lee K-S, Wanner B L. 1995. **Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho Regulon genes for phosphonate breakdown by the Phosphonatase Pathway of *Salmonella typhimurium* LT2**. J. Bacteriol. 177 (22): 6411-6421
- Johnson J F, Vance C P, Allan D L. 1996. **Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase**. Plant Physiol. 112: 31-41
- Lange B M, Ghassemian M. 2003. **Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism**. Plant Mol. Biol. 51: 925-948
- Lee P T, Hsu A Y, Ha H T, Clarke C F. 1997. **A C-Methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis:**

- Isolation and Identification of *Escherichia coli* ubiE gene.** J. Bacteriol. 179 (5): 1748-1754
- LI D, Zhu H, Liu K, Liu X, Leggewie G, Udvardi M, Wang D. 2002. **Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*.** Comparative Analysis and Differential Regulation by Phosphate Deprivation. J. Biol. Chem. 277 (31): 27772-27781
 - Liu W, Hulett M. 1997. ***Bacillus subtilis* Pho P binds to the *phoB* tandem promoter exclusively with the phosphate starvation-inducible promoter.** J. Bacteriol. 179 (20): 6302-6310
 - Liu C, Muchhal U S, Raghothama K G. 1997. **Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato.** Plant Mol. Biol. 33: 867-874
 - Liu C, Muchhal U S, Uthappa M, Kononowicz A K, Raghothama K G. 1998. **Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus.** Plant Physiol. 116: 91-99
 - Lynch J. 1995. **Root architecture and plant productivity.** Plant Physiol. 109: 7-13
 - Marschner H. 1995. **Mineral nutrition in higher plants.** 2ª edición. Academic Press. Londres. 3 - 5, 226 - 235, 455 - 457
 - Mc Laren A D, Peterson G H. 1967. **Soil Biochemistry.** Marcel Dekker Inc. USA. pp. 134 - 139

- Miller S S, Liu J, Allan D L, Menzhuber C J, Fedorova M, Vance C P. 2001. **Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin.** *Plant Physiol.* 127: 594-606
- Morales L, Coello MP. 2003. **Purificación y caracterización de una fosfatasa inducida por deficiencia de fosfato en raíces de frijol.** Tesis. Facultad de Química. UNAM. México
- Muchhal U S, Pardo J M, Raghothama K G. 1996. **Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:10519-10523
- Narang R A, Bruene A, Altmann T. 2000. **Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions.** *Plant Physiol.* 24:1786-1799
- Oshima Y. 1997. **The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genes Genet. Syst.* 72: 323-334
- Peñaloza E, Gutierrez A, Martínez J, Muñoz G, Bravo L A, Corcuera L J. 2002. **Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*).** *Physiol. Plantarum* 116:28-36
- Poirier Y, Bucher M. 2002. **Phosphate Transport and Homeostasis In *Arabidopsis*.** *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists. pp. 1 - 35

- Posada H, Kornegay J, Beck D. 1995. **Estudio de la herencia y mecanismos de tolerancia en líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) andinas y mesoamericanas a bajo fósforo en el suelo.** Taller Internacional sobre bajo fósforo en frijol común. Costa Rica. 41 - 51
- Pozo del J C, Allona I, Rubio V, Leyva A, de la Peña A, Aragoncillo C, Paz-Ares J. 1999. **A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions.** Plant J. 19(5): 579-589
- Raghothama K G. 1999. **Phosphate Acquisition.** Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 665-693
- Ribas-Carbo M, Wiskich J T, Berry J A, Sledow J N. 1995. **Ubiquinone redox behavior in plant mitochondria during electron transport.** Arch. Biochem. Biophys. 317 (1): 156-160
- Russell E W. 1973. **Soil conditions and plant growth.** 10^a ed. Longman. Londres. pp. 580 - 592
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2^o ed. Cold Spring Harbor Laboratory press Cold Spring Harbor NY. USA. Tomo 2. pp. 7.49
- Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M. 1998. **Phosphorus uptake by plants: from soil to cell.** Plant Physiol. 116: 447-453

- Shao D, Creasy C L, Bergman L W. 1996. **Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Pho2 with Pho4 increases the accessibility of the activation domain of Pho 4.** Mol. Gen Genet. 251(3): 358-364
- Springer M, Wykoff D D, Miller N, O'Shea E K. 2003. **Partially phosphorylated pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes.** PLOS Biology 1(2): 261-270
- Stenzel I, Ziethe K, Schurath J, Hertel S C, Bosse D, Köck M. 2003. **Differential expression of the *LePS2* phosphatase gene family in response to phosphate availability, pathogen infection and during development.** Physiol. Plantarum 118: 138-146
- Uhde-Stone C, Zinn K E, Ramirez-Yañez M, Li A, Vance C P, Allan D L. 2003. **Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency.** Plant Physiol. 131: 1064-1079
- Uhtappa T M, Liu C, Varadarajan D K, Raghothama K G. 2001. **Negative regulation of phosphate starvation-induced genes.** Plant Physiol. 127: 1854-1862
- Wilkinson M, Doskow J, Lindsey S. 1990. **RNA blots: Staining procedures and optimization of conditions.** Nuc. Ac. Res. 19(3): 679

- Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, Deng X W. 2003. **Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis roots and leaves.** Plant Physiol. 132: 1260-1271
- Wykoff D, O'Shea E K. 2001. **Phosphate transport and Sensing In *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics 159: 1491-1499
- Yamada M, Makino K, Amemura M, Shinagawa H, Nakata A. 1989. **Regulation of the phosphate Regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes.** J. Bacteriol. 171(10): 5601-5606