



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“La regulación de la interacción entre profilina y
fosfatidil inositol 3 cinasa en *Phaseolus vulgaris*
está mediada por la fosforilación en residuos de
tirosina”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Rosaura Aparicio Fabre

CUERNAVACA, MOR.

ENERO 2007



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Federico Sánchez Rodríguez.

Cuernavaca, Mor. 2007

ÍNDICE GENERAL.

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
Citoesqueleto de actina	6
Dominios de unión a regiones ricas en prolina	9
Profilina	12
Fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K).	13
ANTECEDENTES	18
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL.	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Material biológico	25
Plantas de frijol	25
Crecimiento de <i>Rhizobium etli</i>	25
Péptidos sintéticos	25
Purificación de profilina de frijol	26
Proteínas de membrana asociadas al citoesqueleto	27
Proteínas asociadas al citoesqueleto	27
Purificación de profilina de frijol fosforilada y no fosforilada	28
Extracción de proteínas totales de levadura	29
Purificación de proteínas de fusión expresadas en baculovirus	29
Extracción de núcleos de células de nódulos de frijol	30
Extracción de simbiosomas de nódulos de frijol	31
Preparación de los gradientes de percoll	31
Extracción de membranas plasmáticas de nódulos	32
Extracción de membranas plasmáticas de raíz de frijol	33
Preparación de columna de tiopropil sefarosa	34
Preparación de la columna de poli L-prolina (PLP).	34
Actividad de PI3K in vitro.	34
Preparación de inmunoprecipitados	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	67

CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	75
REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Dominio de unión a PLP de la profilina.	11
Figura 2. Actividad Bioquímica de la PI3K.	14
Figura 3. Motivo ⁷² YMVI está conservado en la secuencia de aminoácidos de la profilina de plantas reportadas.	38
Figura 4. La profilina y la PI3K se encuentran en la misma fracción del citoesqueleto asociado a membranas.	39
Figura 5. La profilina y la PI3k se encuentran en el mismo complejo proteico.	41
Figura 6. Purificación de la PI3K recombinante.....	42
Figura 7. Caracterización de la actividad de cinasa de la His-PI3K.....	43
Figura 8. La His-PI3K es procesada por actividad proteasa de nódulo de frijol.....	45
Figura 9. Caracterización de la actividad de PI3K en los inmunoprecipitados de profilina.	47
Figura 10. Actividad de cinasa en inmunocomplejos de diferentes fracciones membranales de nódulos de frijol.....	48
Figura 11. Actividad de cinasa en inmunocomplejos de fracciones membranales durante el desarrollo del nódulo.....	49
Figura 12. La profilina y la PI3K interaccionan directamente.	52
Figura 13. Orientación de las tirosinas de la secuencia de la profilina de frijol.....	53

Figura 14. Representación gráfica de la superficie de la estructura terciaria de profilina.	53
Figura 15. Análisis de la estructura primaria de las secuencias de profilina de plantas.	54
Figura 16. La PI3K interacciona con la región de la tirosina 72 de la profilina.	57
Figura 17. Dominio de interacción de la profilina con la Poli L-prolina (PLP).	59
Figura 18. Inhibición de la interacción de la región amino y carboxilo Terminal de la profilina y la PI3K.	60
Figura 19. Inhibición de la interacción de la región de la Tyr72 de la profilina y la PI3K.	61
Figura 20. Interacción de las regiones amino y carboxilo terminal de la profilina con la His-PI3K de frijol.	62
Figura 21. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos del motivo ZPPX de la PI3K de frijol (PhavuPI3K) y de las proteínas que participan en tráfico vesicular en células animales.	63
Figura 22. La Profilina interacciona con la PI3K a través de su motivo rico en prolinas del tipo ZPPX.	64
Figura 23. Figura 23. Árbol molecular de la familia de proteínas que comprende a la PI3K tipo III.	66
Tabla 1. Clasificación de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K).	14
Tabla 2. Secuencia de los oligopéptidos utilizados.	26

ABREVIATURAS

ABP	Actin binding protein. Proteína de unión a actina
ADF	Actin depolymerization factor. Factor despolimerizador de actina
ADP	Adenosin difosfato
Arp2/3	Actin related protein. Proteína relacionada a actina 2 y 3
ATP	Adenosin trifosfato
BH	BcR homology domain. Domino homólogo a la proteína BcR
Btk	Bruton's tyrosine kinase. Proteína cinasa de Bruton
C2	Discoidin-like domains, dominios parecidos a discoidina
Cbl	Casitas B cell lymphoma protein.
cDNA	Acido deoxiribonucleico complementario
CDTA	Trans-1,2-diamino ciclohexano- N,N,N',N' tetraacético
DAG	Diacil glicerol
DTT	Di trio teitol
EBD	Endosome binding domain. Domino de unión a endosoma
EDTA	Acido etilen diamino tetra-acético
EVH1	Dominio 1 homólogo a Enabled/VASP
EGFR	receptores del factor de crecimiento epidérmico
GFP	Green fluorescens protein. Proteína verde fluorescente
IP₃	Inositol trifosfato
kDa	Kilo Dalton
NiNTA	ácido níquel nitriloacético
OD	Densidad óptica
PDB	Protein data bases . bases de datos de proteínas
PI	Fosfatidil inositol
PI(3,4)P2	Fosfatidil inositol 3,4 bifosfato
PI(3,4,5)P3	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PI4P	Fosfatidil inositol 4 fosfato
PIP	Fosfatidil inositol fosfato
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLP	Poli L prolina
PMSF	p-metilsulfonato-metanol
pp60^{c-srs}	Proteína de la familia de Src
PS	Fosfatidil serina
PSTPIP	Proteína asociada a actina, que interacciona con la foafatasa, serina-treonina
PTB	phosphotyrosine-binding domain. Domino de unión a fosfotirosina
Rf	Running front. Frente de corrida
Rho, Rac y Cdc42	Proteínas de la familia de las GTPases pequeñas
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH2	Src homology 2. Dominio 2 homólogo a la proteína Src
SH3	Src homology 3. Dominio 3 homólogo a la proteína Src
Sos	Son-of-sevenless protein.
TLC	Cromatografía en placa fina

VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein Fosfoproteína estimulada por un vasodilatador
Vps34p	Vacuolar- protein-sorting 34. proteína 34 de dirección a vacuola
Vsp15p	Vacuolar- protein-sorting 15. proteína 15 de dirección a vacuola
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WW	Dominio rico en triptofanos

RESUMEN

La profilina es una proteína con un peso molecular de 12-15 kDa. Esta proteína puede interactuar con actina, fosfoinosítidos, poli-L-prolina (PLP) y con proteínas que contienen motivos ricos en prolina. Algunas de las proteínas con motivos ricos en prolinas se encuentran formando complejos que están implicados en los procesos de tráfico vesicular y en la regulación de la dinámica del citoesqueleto. Una de las interrogantes que quedan por resolver acerca de la profilina es como esta proteína logra la especificidad para unirse a una gran variedad de proteínas que contienen regiones ricas en prolinas. Se ha demostrado que las isoformas de profilina están sujetas a una regulación diferencial y que cada una de ellas puede jugar un papel distinto dentro de la célula y se sugiere que cada una de las isoformas de profilina tiene afinidades diferentes para los diferentes motivos ricos en prolina. Las profilinas descritas presentan residuos aromáticos altamente conservados en el dominio de interacción a PLP y se cree que este dominio podría estar implicado en la interacción con los motivos ricos en prolina. Previamente demostramos que las isoformas de profilina en *Phaseolus vulgaris* son generadas por la fosforilación de los residuos de tirosina. En este trabajo demostramos que la profilina puede interactuar directamente con la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) tipo III. También demostramos que la PI3K interacciona con una nueva región de la profilina la cual comprende a la Y72 y esta interacción es de una manera similar a la interacción con el dominio de unión a PLP. También señalamos que la interacción de la PI3K con la profilina es dependiente de la fosforilación de los residuos de tirosina.

ABSTRACT

The profilin family consists of a group of ubiquitous highly conserved 12-15 kDa eukaryotic proteins that bind actin, phosphoinositides, poly-L-proline (PLP) and proteins with proline-rich motifs. Some proteins with proline-rich motifs form complexes that have been implicated in actin cytoskeleton dynamics and processes such as vesicular trafficking. A major unanswered question in the field is how profilin achieves the required specificity to bind such an array of proteins. It is now becoming clear that profilin isoforms are subject to differential regulation and that they may play distinct roles within the cell. Considerable evidence suggests that these isoforms have different functional roles in the sorting of diverse proteins with proline-rich motifs. All profilins contain highly conserved aromatic residues involved in PLP-binding, which are presumably implicated in the interaction with proline-rich motif proteins. We have previously shown that profilin is phosphorylated on tyrosine residues. Here, we show that profilin can bind directly to *Phaseolus vulgaris* phosphoinositide 3-kinase (PI3K) type III. We demonstrate that a new region around Y72 of profilin, as well as the N- and C-terminal PLP-binding domain, recognize and bind PLP and PI3K. *In vitro* binding assays indicate that PI3K type III forms a complex with profilin in a manner that depends on the tyrosine phosphorylation status within the proline-rich-binding domain in profilin. Profilin-PI3K type III interaction suggests that profilin may be involved in membrane trafficking and in linking the endocytic pathway with actin reorganization dynamics.

INTRODUCCIÓN

Los organismos están expuestos continuamente a una miríada de estímulos endógenos y del medio ambiente. Sin embargo, tienen la capacidad de responder a estas diferentes señales gracias a que cuentan con un plan de desarrollo relativamente flexible, que les permite activar coordinadamente los cambios que ocurren en su morfología, fisiología y crecimiento. Para los organismos multicelulares es necesario que exista un flujo continuo de información entre las células que lo integran, que les permita coordinar y regular el desarrollo, así como concertar el metabolismo del gran número de células que conforman a los diferentes tejidos y órganos. Este intercambio de información también se necesita para controlar el crecimiento y la diferenciación celular, además de ser importante para responder a las señales químicas y físicas del medio ambiente. La habilidad de la célula para percibir estas señales y traducirlas en cambios fisiológicos y bioquímicos determinará la velocidad de la respuesta y la capacidad de adaptación a los diferentes estímulos a la que esté expuesta.

Actualmente se sabe que el funcionamiento normal de las células requiere de una intrincada red de interacciones entre las proteínas que permiten una correcta integración, amplificación y transducción de las señales. En términos generales la dinámica de la señalización intracelular está dada por la trayectoria de la señal, la cual dependerá de la modificación y/o activación secuencial de los componentes específicos de la vía de señalización, mientras que la velocidad será controlada por la presencia de los segundos mensajeros. La transferencia de la información entre los diferentes componentes de las rutas de señalización es mediada por la presencia de dominios compactos en

las proteínas, que son altamente conservados. La presencia de uno o más de estos dominios en la secuencia de las proteínas permite la interacción con los componentes de diferentes vías de señalización produciendo así la diversificación de las rutas de transducción de señales. Actualmente, se tienen evidencias experimentales, realizadas en células animales, que demuestran que además de los factores de transcripción y componentes de las rutas metabólicas, en muchos de los casos el destino final de la señalización son las proteínas del citoesqueleto (Jiang *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2006; Ten Klooster *et al.*, 2006).

La disponibilidad de la secuencia de nucleótidos de muchos genomas, el volumen de información contenido actualmente en las bases de datos públicas y los ambiciosos proyectos de estudios masivos de interacción entre las proteínas, ha permitido obtener información vital sobre la interacción y la función de muchos complejos proteicos (interactomas). Estos estudios, junto con los resultados obtenidos en la investigación bioquímica, de genética y de biología celular, han proporcionado evidencias que permiten un entendimiento detallado del papel del citoesqueleto en los diferentes eventos celulares.

Citoesqueleto de actina

Durante muchos años se pensó que el citoesqueleto participaba únicamente en la determinación de la forma celular y que era independiente de los mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, hoy se sabe que muchos de los procesos celulares son regulados por la dinámica de una red altamente compleja que está formada por los diferentes componentes del citoesqueleto de la célula (microfilamentos, microtúbulos, filamentos

intermedios y proteínas accesorias). Es importante mencionar que, aunque se les han asignado papeles separados a los microtúbulos y a los microfilamentos, se ha demostrado que en algunas células se requiere de una elevada dinámica de formación de microtúbulos para obtener la distribución polarizada de las protuberancias. Estas estructuras también son dependientes de actina, en los fibroblastos durante la migración celular (Rodríguez *et al.*, 2003) (Pollard and Borisy, 2003). Los resultados obtenidos por Sumoza y colaboradores sugieren fuertemente que la generación de dendritas es dependiente de la polimerización coordinada de actina, tubulina y filamentos intermedios (Sumoza-Toledo and Santos-Argumedo, 2004). Los filamentos intermedios son moléculas importantes que le confieren rigidez a los linfocitos y regulan la resistencia a la deformación (Brown and Song, 2001); por lo tanto, la acción concertada de los tres tipos de estructuras del citoesqueleto culminará en una red dinámica que permitirá las modificaciones morfológicas de los linfocitos B. Por otro lado, se ha visto que el citoesqueleto de actina es mediador central de la organización central y es un elemento clave de la localización subcelular (Tskvitaria-Fuller *et al.*, 2003).

Los estudios realizados en los últimos años sobre el citoesqueleto en células eucariontes han permitido que ahora se maneje un concepto diferente de los microfilamentos; en este nuevo escenario, el citoesqueleto de actina se considera como una red altamente compleja y finamente regulada que participa activamente en los diferentes procesos de celulares. Se sabe que, son importantes para la polaridad celular, la dirección del plano de división celular, la síntesis de la pared celular, la localización de los organelos y proporciona los medios para el movimiento citoplásmico (McCurdy *et al.*, 2001). También

existen evidencias que sugieren que la actina tiene un papel importante en la comunicación célula-célula (Kost and Chua, 2002), Asimismo, en la respuesta al ataque de patógenos (Dantan-Gonzalez *et al.*, 2001), en la regulación de la turgencia de las células guarda y en los cambios de la forma celular. La capacidad del citoesqueleto de actina para responder de una manera rápida y eficaz, en cada uno de los diferentes procesos en los que está involucrado, está dada por la habilidad de los diferentes dominios presentes en la secuencia de la actina globular (actina G) como los que se encuentran en la actina filamentosa (actina F), para interactuar directamente con más de 150 proteínas denominadas proteínas de unión a actina (ABPs; por sus siglas en inglés) (dos Remedios *et al.*, 2003) o indirectamente con otras proteínas para formar complejos proteicos. En muchos de los casos las ABPs, son las moléculas blanco, donde convergen las cascadas de transducción de señales induciendo, en última instancia, los cambios en la dinámica de los filamentos de actina (Hilpela *et al.*, 2004; Samaj *et al.*, 2004). La formación de estos complejos permite muchas formas de regulación que actuarán dependiendo de la composición del complejo, de los tipos de interacciones entre las proteínas y del estado de activación de cada uno de sus componentes. En estos complejos también puede converger la información proveniente de otras rutas de señalización que finalizan en la regulación de la dinámica de actina.

En el contexto de los resultados obtenidos hasta hoy, podemos ver al citoesqueleto de actina como una estructura celular fascinante por la complejidad de sus funciones y por el dinamismo de su estructura. El estudio de las proteínas de unión a actina en diferentes modelos eucariontes ha permitido validar y extender el conocimiento de cómo estas proteínas funcionan

en la organización del citoesqueleto de actina a nivel ultra estructural y de composición molecular. Basados en las diferentes evidencias experimentales, sabemos que las ABPs tienen una participación activa en la población de la actina no ensamblada y que algunas de ellas tales como ADF/cofilina y profilina, regulan tanto en el tiempo como en el espacio la polimerización de los filamentos (Nakano and Mabuchi, 2006). Además, estas proteínas tienen la capacidad de unirse a los extremos del polímero para bloquear el crecimiento de los cables de actina (por ejemplo, la gelsolina). Estas proteínas de unión a actina que incluyen a profilina, al complejo Arp2/3 y cofilina, también participan como sitios iniciadores o plataformas para el ensamble de la actina globular, así como en la fragmentación de los filamentos de actina mediada por ADF/cofilina y gelsolina (Ono *et al.*, 2004). Todos estos datos sugieren que la coordinación precisa en los cambios de la dinámica de los microfilamentos se logra a través de la activación y desactivación secuencial de las proteínas de unión a la actina a través de sus dominios específicos.

Dominios de unión a regiones ricas en prolina

Las ABPs, al igual que la mayoría de las proteínas de las células están organizadas estructuralmente, generando así, regiones que pueden ser motivos o dominios que participan de interacciones moleculares, o bien que formen un dominio de actividad catalítica. La importancia de estas regiones radica en que tienen la capacidad de unirse a los sitios expuestos a la superficie, en la estructura terciaria de otras proteínas provocando un cambio de las propiedades de ambas proteínas (Seet *et al.*, 2006). Además, algunos de estos dominios o motivos tienen también la capacidad de reconocer los

grupos cargados de los segundos mensajeros o de otras macromoléculas como los lípidos o azúcares.

Estos dominios son elementos clave para la formación de los diferentes complejos proteicos que funcionan en la célula. La formación y el desensamblaje específico de estos complejos moleculares son parte de casi todos los procesos biológicos (Sprinzak *et al.*, 2006). Estos complejos se estabilizan por un sinnúmero de interacciones débiles entre los diferentes dominios presentes en las proteínas. En los últimos años se han descrito y caracterizado muchos dominios de interacción proteína-proteína (Pawson and Nash, 2000) entre los que destacan los dominios SH3 (dominio 3 homólogo al encontrado en la proteína Src), los cuales son los dominios más ampliamente distribuidos. Se han identificado más de 1500 dominios SH3 en las proteínas de los organismos de toda la escala evolutiva (Larson and Davidson, 2000; Pawson, 1994). También se ha evidenciado experimentalmente la importancia que éstos tienen en la transmisión precisa de la información en las rutas de transducción de señales en células eucariontes. Estos dominios pertenecen a un grupo particularmente abundante que participa en el reconocimiento de regiones ricas en prolinas. Este grupo incluye a los dominios SH3, WW (llamados así por contener dos Trp altamente conservados) (Zarrinpar *et al.*, 2003), y EVH1 (dominio 1 homólogo a Enabled/VASP, también es conocido como dominio 1 homólogo a WASP o WH1) (Fedorov *et al.*, 1999) y están presentes en muchas de las proteínas que participan en las cascadas de señalización celular (Li, 2005). Los eventos de unión de estos dominios en el interactoma dirigen el ensamble y la localización de los complejos proteicos que están involucrados en el crecimiento celular, la transcripción, la

señalización postsináptica y la regulación de la dinámica del citoesqueleto (Alfarano *et al.*, 2005).



Figura 1. Dominio de unión a PLP de la profilina.

Representación gráfica de la estructura terciaria de la profilina acoplada a PLP (PDB: 1AWI). La estructura fue generada por el programa RasMol en donde se representa a los residuos de Tyr en color verde, Asn en rosa, Pro en azul, Trp en morado y Asp en rojo.

En este grupo de dominios también se encuentra el dominio de unión a poli-L-prolina (PLP) de profilina (figura 1). El cual tiene los amino ácidos aromáticos (Trp3, Tyr6, Trp33 y Tyr125) expuestos estructuralmente de una manera similar a los dominios que interaccionan con regiones ricas en prolina. Además se pueden observar otros residuos que se encuentran en la interfase de la interacción con PLP y que están a una distancia de adecuada para formar enlaces por puente de hidrógeno y que probablemente estarían participando en

la afinidad de este dominio por las regiones ricas en prolina. Este módulo fue descrito como un dominio que interaccionaba con secuencias que contenían un mínimo de 5 prolinas consecutivas (Petrella *et al.*, 1996). En la actualidad, con los resultados de Witke y colaboradores (1998) se evidenció que este dominio también, puede reconocer secuencias con motivos ricos en prolinas del tipo ZPPX (donde Z puede ser Pro, Gly o Ala; y X cualquier aminoácido hidrofóbico) (Witke *et al.*, 1998).

Profilina

Profilina es una proteína multifuncional ya que su estructura contiene varios dominios, un dominio de reconocimiento a regiones ricas en prolinas, otro de interacción con actina y un tercero de interacción con los fosfoinosítidos (Kovar *et al.*, 2001; Lu and Pollard, 2001). La profilina fue una de las primeras proteínas de unión a actina en ser caracterizadas y aunque los primeros estudios sugirieron que su principal función era la de secuestrar a los monómeros de actina en una relación 1:1 [actina:profilina, (Carlsson *et al.*, 1976)], hoy en día se tienen evidencias muy claras que demuestran que también es capaz de acelerar el intercambio de ADP por ATP en la molécula de actina y de esta manera favorecer la polimerización de los microfilamentos (Yarmola and Bubb, 2006). Una región del dominio de reconocimiento a actina empalma con una región del dominio de interacción al fosfatidil 4,5 bifosfato (PIP2) por lo que, la interacción de esta molécula con profilina inhibe la interacción de profilina con actina (Skare and Karlsson, 2002). Además, en sistemas animales se ha visto que la unión de profilina a PIP2 inhibe la generación de segundos mensajeros tales como el inositol trifosfato (IP₃) y el

diacil glicerol (DAG) debido a que profilina tiene mayor afinidad a PIP_2 que la que tiene la fosfolipasa C (PLC) no activada por fosforilación (Sohn *et al.*, 1995). Posiblemente, en células vegetales la profilina podría tener la misma función ya que existen evidencias *in vitro* que demuestran una inhibición de la PLC en presencia de profilina. Desde hace tiempo se determinó que la profilina interacciona con PLP, sin embargo, fue hasta 1995 que se identificó a VASP (proteína que se fosforila en la vaso dilatación) como la primera proteína con una región rica en prolina capaz de unirse a profilina (Reinhard *et al.*, 1995). Posteriormente, se reportaron una variedad de proteínas que reconocían el dominio de unión a PLP en profilina, dentro de las cuales se incluyen: la familia de las forminas (Chang *et al.*, 1997; Evangelista *et al.*, 2003; Manseau *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1997), debrina y gefirina (Mammoto *et al.*, 1998), N-WASP (Suetsugu *et al.*, 1998, 1999), dinamina I (Witke *et al.*, 1998), la subunidad p85 de la fosfatidil Inositol 3 cinasa (PI3K; por sus siglas en inglés). Por lo tanto, en este escenario, parece ser que la profilina es una de las proteínas de unión a actina que podría ser el blanco para la conexión compleja entre los eventos de la señalización celular y el citoesqueleto de actina.

Fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K).

Recientemente, los fosfoinosítidos fosforilados en la posición tres del anillo del inositol han tomado gran importancia debido a que han sido considerados como segundos mensajeros. Se ha visto que hay cambios en los niveles de éstos fosfoinosítidos después de la estimulación de la célula por diferentes factores de crecimiento, hormonas y algunos tipos de estreses. Esto

desencadena varios eventos celulares que le permite a la célula llevar a cabo el crecimiento, la división, la migración, y la sobre vivencia celular.

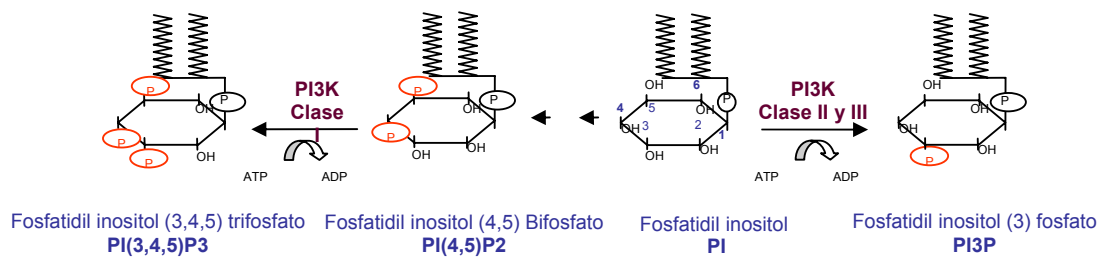


Figura 2. Actividad Bioquímica de la PI3K.

Estructura química de los sustratos y los productos de la actividad de la PI3K. En el sustrato fosfatidil inositol, (PI), se muestran los carbonos numerados, en rojo la posición de los grupos fosfatos.

La fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) es una de las enzimas que regula los niveles de los fosfoinosítido, la cual cataliza la transferencia del fosfato de la posición γ del ATP a la posición tres del anillo del fosfatidil inositol (PI), del fosfatidil inositol 4 fosfato (PI4P) y del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, PI(4,5)P₂, generando así el fosfatidil inositol 3 fosfato (PI₃P), el fosfatidil inositol 3,4 bisfosfato (PI(3,4)P₂) y el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P₃) respectivamente (Wymann and Pirola, 1998)(figura 2). Las PI3Ks han sido clasificadas principalmente en tres clases, basándose en la especificidad por el sustrato, la secuencia de aminoácidos y la subunidad reguladora que la modula: la clase I, que son complejos heterodiméricos y que a su vez se subdivide en las subclases IA y IB dependiendo de la subunidad reguladora; la clase II, que son aquellas que no tienen subunidad reguladora y las PI3K que

pertenece a la clase III que tienen como subunidad reguladora una serina cinasa (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K).

CLASE	ACTIVIDAD CINASA	PROTEÍNA REGULADORA	SUSTRATO	ACTIVACIÓN
I ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) (110-120 kDa)	Lípidos y treonina - serina	IA 50-85 kD (p85 α, β y p55 γ) IB 101 kD	PI(4,5)P2 PI(4)P PI	-Receptor tirosina cinasa -Receptor acoplado a proteínas G
II (170- 210 kDa)	lípidos	No tiene	PI(4,5)P2 (<i>in vitro</i>) PI(4)P (<i>in vitro</i>) PI	-Interacción proteína-proteína -Cinasas de tirosina
III (100-150 kDa) VSP34	lípidos	160 kD (humano) VPS15 (cinasa de serina y treonina (levadura))	PI(4,5)P2 (humano) PI	-Receptor tirosina cinasa -Constitutiva
IIIA (80-120 kDa)	lípidos	No determinada	PI	-No determinada

. La cinasa PI3K de clase I es la más ampliamente estudiada y agrupa a las PI3Ks que forman complejos heterodiméricos de aproximadamente 200 kDa, las cuales están compuestas de una subunidad catalítica de 100 a 129 kDa y una subunidad reguladora de 50 a 100 kDa. Las enzimas de esta clase fosforilan preferencialmente al PI (4,5) P2 *in vivo* como respuesta a la activación por receptores de tirosina cinasa y por receptores acoplados a proteínas G. De acuerdo a la subunidad reguladora a la que se asocian este grupo, puede subdividirse en dos subclases: la IA que agrupa aquellas subunidades catalíticas (p110 α , p110 β y p110 δ) que interaccionan con las subunidades reguladoras p85 α , p55 α , p50 α , p85 β o p55 γ a través de una región llamada inter SH2, localizada en la subunidad reguladora. Otra

característica es que todas las subunidades reguladoras contienen dos dominios SH2 y una región rica en prolina. Las subunidades p85 α y p85 β además presentan en la región amino terminal un dominio SH3 seguido de una región rica en prolina y un dominio similar al dominio BH (dominio presente en la proteína Bcr) (Katso *et al.*, 2001; Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2001; Wymann and Pirola, 1998).

El dominio SH3 de la p85 participa en la interacción con proteínas que son ricas en prolina como el intercambiador de nucleótidos de la GTPasa Ras, Sos (*Son of sevenles*) y la ligasa de ubiquitina Cbl, con estas interacciones se genera un mecanismo de señalización alternativo para reclutar a la p110 en la membrana (Kivens *et al.*, 1998). Contrariamente a esta interacción, la unión entre la p85 y proteínas ricas en prolina como Cbl podrían modular negativamente la señalización (Fang *et al.*, 2001; Gout *et al.*, 2000). El dominio BH comparte homología con el dominio GAP de la proteína Bcr, el cual activa a la GTPasa Rho, la GAP de la Rho interacciona con Rho, Rac y Cdc42 (proteínas de la familia de las GTPasas) y transduce la señal hacia abajo en la cascada. Por lo tanto, el dominio BH de la p85 puede mediar la interacción directa entre la p85 y las GTPasa pequeñas, tales como la Rac y la Cdc42 (Jimenez *et al.*, 2000; Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2001). Por tal motivo, se sugiere que la función de la subunidad p85 no se limita solo a la regulación de la subunidad catalítica, p110, sino que también participa en la modulación de otras moléculas que participan en la señalización intracelular (Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2001).

Las enzimas de la clase IB, a la cual pertenece PI3K γ , se han encontrado en mamíferos y son muy similares a las PI3Ks de la clase IA, sin

embargo en la región amino terminal de éstas se encuentra un dominio PH (dominio semejante a plactrina) y la subunidad reguladora es la p101 (Stoyanov *et al.*, 1995). PI3K γ es activada por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas una vez que la p101 la recluta en la membrana y las subunidades G $\beta\gamma$ unen y activan a la p110 (Krugmann *et al.*, 1999).

Las PI3Ks de la clase II tienen las regiones amino y carboxilo terminal más grandes que las de la clase I, por tal motivo tienen un peso molecular de 170 a 210 kDa (Wymann and Pirola, 1998). Estas enzimas utilizan como sustrato preferido al PI y al PI4P, no se ha descubierto una subunidad reguladora, tienen en la región carboxilo y en el amino terminal un dominio C2 (dominios parecidos a discoidina), un dominio de unión a Ras y un presunto dominio de unión a tirosinas fosforiladas del tipo PTB (dominio de unión a fosfotirosina). La región amino terminal es la más divergente en estas enzimas y evidencias recientes sugieren que ésta región es necesaria y suficiente para reclutar a PI3KC2 α y a PI3KC2 β en la membrana, una vez que los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) han sido activados (Arcaro *et al.*, 1998; Arcaro *et al.*, 2000).

Recientemente, se ha reportado que la proteína clatrina se une y regula a la región amino terminal de PI3KC2 α ; sin embargo, la falta de conservación del dominio del unión a clatrina y la diversidad de la región amino terminal de las isoformas α , β y γ , sugieren la posibilidad de que el reclutamiento de estas enzimas por las moléculas reguladoras puede ser de una manera diferencial (Arcaro *et al.*, 1998). Aunque estas enzimas tienen el dominio de unión a Ras, no son reguladas por Ras y a la fecha no queda claro el papel del dominio PTB putativo, sin embargo hay evidencias que sugieren que éste recluta a la enzima

con receptores tirosina cinasa una vez que éste es activado (Arcaro *et al.*, 1998; Arcaro *et al.*, 2000).

La enzima más representativa de las PI3Ks de la **clase III** es el producto del gene Vps34p (*Vacuolar- protein-sorting*) de *Sacharomyces cerevisiae* (Schu *et al.*, 1993). Homólogos de esta proteína se han encontrados en plantas (Welters *et al.*, 1994), en *D melanogaster* (Linassier *et al.*, 1997), en las algas (Molendijk and Irvine, 1998) y en mamíferos (Stephens *et al.*, 1994). En levaduras, estas enzimas existen como heterodímeros y solo fosforilan al PI. La proteína Vps34 forma un complejo con Vsp15p, que es una serina-treonina cinasa de 170 kDa, la cual activa y recluta a la Vps34p a la membrana. De manera similar PI3K de humano se une a un homólogo de 150 kDa (Stephens *et al.*, 1994).

ANTECEDENTES

Profilina es una proteína de 14 kDa cuya función está conservada durante la evolución y se encuentra en todos organismos eucariota. Aunque esta familia de proteínas comparte propiedades bioquímicas y similitudes estructurales, se ha visto que la identidad de la secuencia de aminoácidos de las profilinas de diferentes especies, así como la de las isoformas de profilina de un mismo organismo, es sorprendentemente baja. Las primeras isoformas de profilina de plantas fueron descritas como uno de los alergenios más potentes del polen de abedul (Valenta *et al.*, 1991) y posteriormente identificadas como una de las proteínas de unión a actina debido a que presentaba una similitud con la secuencia de aminoácidos de las profilinas de vertebrados (Valenta *et al.*, 1991).

ANTECEDENTES

Profilina es una proteína de 14 kDa cuya función está conservada durante la evolución y se encuentra en todos organismos eucariota. Aunque esta familia de proteínas comparte propiedades bioquímicas y similitudes estructurales, se ha visto que la identidad de la secuencia de aminoácidos de las profilinas de diferentes especies, así como la de las isoformas de profilina de un mismo organismo, es sorprendentemente baja. Las primeras isoformas de profilina de plantas fueron descritas como uno de los alérgenos más potentes del polen de abedul (Valenta *et al.*, 1991) y posteriormente identificadas como una de las proteínas de unión a actina debido a que presentaba una similitud con la secuencia de aminoácidos de las profilinas de vertebrados (Valenta *et al.*, 1991).

En las bases de datos de proteínas están depositadas 82 secuencias de aminoácidos de diferentes profilinas las cuales, fueron clonadas y secuenciadas de 40 especies diferentes de plantas (<http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/>). El análisis filogenéticos y los estudios de patrones de expresión del RNA mensajero (RNAm) de las diferentes isoformas de profilina (Yu *et al.*, 1998), así como los resultados obtenidos de plantas transgénicas que expresan genes reporteros regulados por el promotor de diferentes genes de profilina (Swoboda *et al.*, 2001), mostraron que todos los miembros de la familia de profilina son regulados de forma específica. Asimismo, con base al desarrollo de las plantas, están divididas en dos clases de isoformas: las profilinas que se expresan vegetativamente y las específicas de polen, expresadas en los tejidos reproductivos.

Las plantas, a diferencia de los hongos, animales y protistas (Haarer *et al.*, 1993; Haugwitz *et al.*, 1991; Kwiatkowski and Bruns, 1988), tienen varios genes que codifican para familias multigénicas de las isoformas de profilina (Christensen *et al.*, 1996; Gibbon *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996; Staiger *et al.*, 1993). Las isoformas más divergentes de *Arabidopsis thaliana* (las isoformas vegetativas y polen específicas) comparten solamente el 77% de identidad de aminoácidos y únicamente el 26% con las proteínas de los vertebrados (Huang *et al.*, 1996). En maíz, la diversidad de las isoformas de profilina se manifiesta en diferencias en su afinidad por el ATP, la actina y por la PLP (Gibbon *et al.*, 1997; Gibbon *et al.*, 1998).

Las isoformas de profilina de la clase II tienen propiedades bioquímicas que difieren de las profilinas de la clase I. Las de clase II tienen alta afinidad por PLP y secuestran más actina monomérica que las de la clase I. Por el contrario las profilinas de la clase I inhiben en mayor proporción la actividad de la PLC que las de clase II. Estas propiedades bioquímicas correlacionan con los resultados obtenidos *in vivo*, donde las isoformas de profilina de la clase I rompen más rápidamente la arquitectura citoplásmica de la actina que las isoformas de la clase II (Gibbon *et al.*, 1998). En conjunto, estos resultados proporcionan evidencias sólidas que indican que una de las isoformas expresadas diferencialmente podría estar realizando funciones distintas en las células vegetales.

Además de la expresión diferencial de genes que codifican para la profilina, se ha demostrado en diferentes organismos otro nivel de regulación (modificación post-transduccional) en el cual se involucra la fosforilación de los residuos de Ser. En vertebrados, la profilina puede ser fosforilada *in vitro* por la

proteína cinasa C (PKC; (Hansson *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1996) y por la cinasa pp60^{c-srs} (De Corte *et al.*, 1997). Sin embargo, las consecuencias funcionales de la fosforilación de la profilina no han sido determinadas. Recientemente, se demostró que la profilina de *Arabidopsis* también puede ser fosforilada en residuos de Ser; sin embargo, los autores no demuestran la importancia de esta modificación postransducional en las propiedades bioquímicas de esta proteína. La complejidad de la regulación de la profilina se incrementa con los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo, en donde demostramos que las isoformas de profilina generadas en los diferentes órganos de *Phaseolus vulgaris* son el producto de la fosforilación de los residuos de Tyr (Guillen *et al.*, 1999). Aunque esta modificación no ha sido encontrada en otros organismos, es posible que las isoformas generadas en frijol mimeticen las propiedades bioquímicas de las diferentes isoformas expresadas en maíz y *Arabidopsis*, existiendo la posibilidad de que cada una de las isoformas fosforiladas puedan realizar funciones distintas en frijol. Esta hipótesis fue corroborada en este trabajo, en donde demostramos que la fosforilación de los residuos de Tyr en el dominio de interacción a PLP tiene un efecto negativo en la interacción de la profilina con secuencias ricas en prolinas del tipo ZPPX, localizada en el dominio catalítico de la PI3K de frijol.

Las estructuras terciarias de la profilina, de diferentes organismos, se encuentran depositadas en las bases de datos de proteínas, entre las cuales se encuentran las estructuras de la profilina de humano (Mahoney *et al.*, 1997; Mahoney *et al.*, 1999; Metzler *et al.*, 1993), de bovino (Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1994; Schutt *et al.*, 1993), de *Sacharomyces cerevisiae* (Eads *et al.*, 1998), de *Acanthamoeba castellanii* (Fedorov *et al.*, 1994; Vinson *et al.*, 1993),

de *Arabidopsis thaliana* (Thorn *et al.*, 1997) y de polen de abedul (Fedorov *et al.*, 1997). La comparación de estas estructuras reveló que todas tienen un plegamiento común, el cual consiste de siete estructuras β plegadas en el centro, flanqueadas por las α hélices de los extremos amino y carboxilo (Thorn *et al.*, 1997).

También, se ha determinado la estructura cristalográfica de la profilina bovina en su interacción con actina. El análisis de esta estructura reveló que las hélices tres y cuatro junto con las estructuras β plegadas 4, 5 y 6 participan en el reconocimiento del monómero de actina. Por otro lado, la estructura de la profilina humana unida a PLP confirmó que los residuos aromáticos (Trp3, Tyr6, Trp31, His133, Tyr139) expuestos en las alfa hélices de los extremos amino y carboxilo participan en la interacción con PLP (Nodelman *et al.*, 1999). Otro hecho importante, que se mencionó previamente, es que todas las estructuras de profilina son virtualmente idénticas. Los resultados obtenidos de los análisis de interacción *in vitro* han demostrado que la profilina puede reconocer un grupo altamente heterogéneo de proteínas, posiblemente a través de su sitio de unión a PLP el cual comprende a las α hélices de los extremos amino y carboxilo. El requerimiento estructural para la interacción con profilina sugiere que las proteínas contienen en su secuencia un motivo rico en prolina. Algunas de las proteínas reportadas que interaccionan con profilina tienen una región de 5-10 prolina consecutivas (Petrella *et al.*, 1996) y otras presentan motivos que contienen no más de cuatro prolina consecutivas, en las que se ha visto que tienen un consenso del tipo ZPPX (donde Z puede ser Pro, Gly o Ala; y X cualquier aminoácido hidrofóbico). Como se puede ver, el número de proteínas con un motivo eficiente de unión a profilina se incrementa;

y esto aunado a la alta similitud de la secuencia de proflina en las dos α hélices conduce a la siguiente pregunta: ¿cómo puede la proflina lograr la especificidad requerida para seleccionar los diferentes motivos ricos en prolina?

HIPÓTESIS

La profilina es una proteína de 14 kDa que está organizada estructuralmente en tres dominios que le permiten interactuar con actina, PIP2 y regiones ricas en prolina. La profilina interactúa con las regiones ricas en prolina a través de un dominio localizado en el amino y el carboxilo terminal. En *Phaseolus vulgaris* se demostró que las cinco isoformas presentes en los diferentes tejidos son generadas por la fosforilación de los residuos de tirosina. Los residuos de tirosina de la profilina tienen secuencias contiguas que presentan alta similitud a las secuencias que reconocen los dominios SH2 de la subunidad p85 de la PI3K. Por lo tanto, la fosforilación de estos residuos de tirosina podría estar regulando la interacción de la profilina con la PI3K en las células vegetales.

OBJETIVO GENERAL.

- Analizar el papel de la fosforilación de los residuos de tirosina de profilina en la interacción con el motivo rico en prolina del tipo ZPPX de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K).

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la presencia de PI3K en los complejos proteicos en que se localiza la profilina.
- ❖ b) Expresar y purificar la His-PI3K expresada en el sistema de Baculovirus.
- ❖ Caracterizar la interacción de la profilina y la His-PI3K.
- ❖ c) Identificar la región de profilina que participa en la interacción con la región rica en prolina de la fosfatidil inositol 3 cinasa.
- ❖ c) Delimitar la secuencia de PI3K que participa en la interacción con profilina.
- ❖ d) Analizar la interacción entre la PI3K y el dominio de unión a PLP de la profilina fosforilado en residuos de tirosina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Plantas de frijol

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se germinaron en charolas húmedas, en la oscuridad por tres días, se transfirieron a macetas con vermiculita como soporte y se inocularon con la cepa de *Rhizobium etli*, CIATT 899. Las plantulitas se crecieron por 25 días como máximo, y se regaban cada tercer día con solución nutritiva de Hoagland (KNO₃ 1,02 g/l, Ca(NO₃), 4 H₂O 0,492 g/l, NH₄H₂(PO₄) 0,23 g/l, MgSO₄, 7 H₂O 0,49 g/l, H₃BO₃ 2,86 mg/l, MnCl₂, 2 H₂O 1,8 mg/l y de macro nutrientes CuSO₄, 5 H₂O 0,08 mg/l, ZnSO₄, 5 H₂O 0,22 mg/l, Na₂MoO₄, H₂O 0,09 mg/l, FeSO₄, 7 H₂O 0,5 % 0,6 ml), a partir del día 12 del desarrollo, se recolectaron los nódulos formados y se congelaron a -30°C.

Crecimiento de *Rhizobium etli*

La cepa de *Rhizobium etli* se creció en medio PY (7 gr. bacto-peptona, 3 gr. extracto de levadura, 1 gr. glucosa, 3 gr. NaCl, 240 mg. MgSO₄.TH₂O, 10 mg. CaCl₂, 20 mg. Na (HPO₄).2H₂O, pH 7.0) a 28 °C con agitación constante 200 rpm por 72 h. Posteriormente con estos cultivos se inocularon las plantulitas de frijol.

Péptidos sintéticos

Los diferentes péptidos de la profilina se sintetizaron por el método síntesis de fase sólida Fmoc (Fields and Noble, 1990) y los péptidos de la PI3K se

sintetizaron en BIO-SYNTHESIS™ y BIO-WORLD™. Todos los péptidos utilizados en este trabajo tienen como primer residuo (en el extremo amino terminal) una cisteína, que no corresponde a la secuencia de aminoácidos de la profilina o de la PI3K, esto con el fin de poder de inmovilizarlos, para los ensayos de interacción péptido-péptido, Tabla 2:

Tabla 2. Secuencia de los oligopéptidos utilizados.

Nombre del péptido	Origen del péptido	Secuencia del péptido	Ensayo
Y72	Profilina	CPTGLYIGGTKYMVIQGE PGS	Interacción
Y72D	Profilina	CGTKDMVIQGE P	Interacción
Y72F	Profilina	CGTKFMVIQGE P	Interacción
pY72	Profilina	CGTKpYMVIQGE PG	Interacción
Y6	Profilina	CMSWQTYVDDHLLCEIE	Interacción
Y125	Profilina	CNMIVERLGDY LIEQGL	Interacción
Y125,6	Profilina	CNMIVERLGDY LIEQGLGGMSWQTYVDDHLLCEIE	Interacción
PI3KN	PI3K	CALYIDGAPFGLP	Anticuerpos
PI3KC	PI3K	CGRDPKPFPPPMKL	Interacción

Purificación de profilina de frijol

Cinco a ocho gramos de nódulos de frijol de 21 días después de la inoculación con *Rhizobium etli*, se pulverizados en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, se homogenizaron con 5 ml de buffer de extracción [(140 mM NaCl, 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 Na₂HPO₄, pH 7.5 y la mezcla de inhibidores de

proteasas (Complete, Roche™)] a 4°C. La solución se centrifugó a 5,000 x g por 30 min., para eliminar restos celulares, el sobrenadante se centrifugó a 10,000 x g por 15 min., y el sobrenadante recuperado se pasó a través de a columna de poli L-prolina-Sefarosa a un flujo constante de 500 µl por minuto. La columna se lavó dos veces con buffer de extracción, de dos a tres veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.4mM KH₂PO₄, 4.3mM K₂HPO₄) y se hizo el despegado de las isoformas de la profilina con diferentes concentraciones de urea (2, 4 6 y 8 M).

Proteínas de membrana asociadas al citoesqueleto

Cinco a diez gramos de nódulos de frijol de 21 días después de la inoculación con *Rhizobium etli*, se pulverizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, se homogenizaron con 5 ml de buffer de extracción [(140 mM NaCl, 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 Na₂HPO₄, pH 7.5 y en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche™)] a 4°C por 5 min. La solución se centrifugó a 5,000 rpm por 30 min., para eliminar restos celulares, el sobrenadante se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 5 ml de buffer de extracción y se sonicó (1 min. a 20 W con periodos de descanso de 30 s) por 5 periodos manteniendo siempre en hielo y evitando que se forme mucha espuma. Se centrifugó a 30 000 rpm por 30 min. y se recuperó el sobrenadante (Dantan-Gonzalez *et al.*, 2001).

Proteínas asociadas al citoesqueleto

Se pulverizaron 5 gramos de nódulos en un mortero con nitrógeno líquido y se homogenizaron en 50 ml de buffer G (Tris-HCl pH-7.0 5 nM, CaCl₂

0.2 mM, NaN_3 0.01%, ATP 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 100 mM, Ortovanadato 100 mM y la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, RocheTM), se agitó en un baño con hielo por 30 min., se centrifugó a 10 000 rpm por 20 min., se recuperó la fracción soluble y se congeló a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se descongeló la solución en hielo lentamente. A esta fracción se le nombró fracción soluble del citoesqueleto

La fracción insoluble (también se descongela lentamente) se resuspendió en 2 ml de buffer G y se le agregó la solución de octilgucósido (0.5, 1, 1.5%) se agitó a temperatura ambiente por 30 min., se centrifugó a 10000 rpm por 30 min. y se recuperó el sobrenadante. A esta fracción se le nombró fracción insoluble del citoesqueleto.

Purificación de profilina de frijol fosforilada y no fosforilada

Cinco a diez gramos de nódulos se homogenizaron en 25 ml de buffer A (Tris-HCl pH-7.5 10 mM, CaCl_2 0.5 mM, NaN_3 0.01%, ATP 0.4 mM, DTT 0.5 mM, NaPPi 30 mM, PMSF 0.5 mM, Ortovanadato 100 μM y la mezcla de inhibidores de proteasas comerciales) en un mortero con nitrógeno líquido, y se hicieron de 2 a 5 pulsos con el homogenizador, manteniendo siempre a 4°C, se agitó por 15 min. en hielo, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min., se filtró con algodón para eliminar residuos celulares. El homogenizado se agregó a la columna de PLP previamente equilibrada con buffer B (Tris-HCl pH-7.5 10 mM, CaCl_2 0.5 mM, NaN_3 0.01%, ATP 0.4 mM, DTT 0.5 mM, NaPPi 30 mM) a un flujo de 300 $\mu\text{l}/\text{min.}$ y finalmente se lavó con 20 volúmenes de buffer B.

La profilina fosforilada se recuperó con 5 volúmenes de 1M KCl y la profilina no fosforilada con 5 volúmenes de 8 M urea y con 5 volúmenes de SDS 2% caliente. Antes de utilizarse las muestras se dializaron contra buffer B.

Extracción de proteínas totales de levadura

Se creció un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD (Extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, Glucosa 2%) toda la noche a 30 °C con agitación vigorosamente (400 rpm). Se tomó un inóculo de 0.05 U O.D y se incubó aproximadamente por 8 h en medio hasta tener una densidad de 0.5 U OD (2.7 X 10e6 células/ml), a partir de este cultivo se tomaron 1.5 ml y se centrifugó a 10 000 rpms. Se desechó completamente el sobrenadante y agregaron aproximadamente 200 µl de perlas (425-600 micrones). Las células se resuspendieron en 300 ml de 2 mM PMSF (p-metilsulfonato)/metanol. Se agitaron vigorosamente con ayuda de un agitador magnético, en hielo de 5 a 8 min. o hasta que se aclaró la solución. Se utilizó la solución clarificada.

Purificación de proteínas de fusión expresadas en baculovirus

El cultivo de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (60 a 80 ml) que sobreexpresan la proteína recombinante se concentró para eliminar el exceso de medio de cultivo a 1000 rpm por 5 min. Las células se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis [(50 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM βmercapto etanol, 100 mM KCl, 1% Nonidet-40, 1mM PMSF y la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, RocheTM)] y se sonicaron por 5 min., con pulsos de 20 W cada 20 s y descansos de 10 s, por 5 min. Posteriormente se agitaron por inversión por 1 min. y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min. a 4

°C, el sobrenadante se pasó por la columna de afinidad NiNTA (ácido níquel nitrilo acético) previamente equilibrada con buffer D [50 mM buffer de fosfatos pH 6.0, 300 mM KCl, 5 mM βmercaptoetanol, 10 % (v/v) glicerol y la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche™)] a un flujo de 300 μl/min. La columna se lavó con 5 volúmenes de buffer D y posteriormente la proteína recombinante enriquecida se recolectó con buffer E (50 mM buffer de fosfatos pH 6.0, 300 mM KCl, 5 mM βmercaptoetanol, 100 mM imidazol, 10 % (v/v) glicerol). La concentración del imidazol varió dependiendo de la proteína y las concentraciones fueron de 50 mM a 500 mM.

Extracción de núcleos de células de nódulos de frijol

De 10 a 20 gramos de nódulos frescos se presionaron en un mortero, tan solo con la fuerza que se aplica con la mano (se intenta presionar de tal manera que se observe que todos los nódulos se abrieron), se agregaron 5 ml del buffer de homogenización (15 mM Hepes pH 7.6, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espererimidina, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.34 M sacarosa, mezcla de inhibidores de proteasas comerciales). Se filtró el homogenizado utilizando “nytrex” 100 micras y se presionó con las manos para que salieran la mayor cantidad de núcleos, se agregaron sobre los nódulos otro mililitro de buffer homogenizador para arrastrar lo que haya quedado sin pasar. Se centrifugó a 4 000 g por 10 min. y resuspendieron el precipitado en el mismo buffer (4 ml/g). Se centrifugó nuevamente, pero ahora sobre 5 ml de sacarosa 0.8M en el mismo buffer por 15 min. a 4 000 g y se recuperaron con mucho cuidado los núcleos que se encontraron precipitados hasta el fondo.

Extracción de simbiosomas de nódulos de frijol

De 2 a 4 gramos de nódulos frescos se presionaron ligeramente en el mortero y se agregó 1 ml de buffer homogenizador (15 mM Hepes pH 7.6, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espererimidina, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.34 M sacarosa y la mezcla de inhibidores de proteasas comerciales) y se filtraron utilizando una membrana de nylon, la membrana se exprimió con la fuerza ligera de la mano para que salgan todos los simbiosomas posibles, se agregó 1 ml más de buffer para liberar un poco más, agregar a un tubo (corex 50 ml) que previamente tiene el gradiente de percoll (1.5 ml de 80% percoll, 2.5 ml de 60% percoll y 2.0 ml de 30% de percoll) y se centrifugó a 3 800 g por 15 sin el freno de paro de la centrífuga y se recuperaron los simbiosomas de que se encontraron encima de la fracción de 80% de percoll.

Preparación de los gradientes de percoll

Prepara una solución al 80% de percoll con buffer de lavado

Para hacer percoll al 30%

Num. de tubos requeridos para el gradiente	Mililitros de percoll al 80%	Mililitros de buffer de lavado
1	0.75	1.25
2	1.5	2.5

Para hacer percoll al 60%

Num. de tubos requeridos para el gradiente	Mililitros de percoll al 80%	Mililitros de buffer de lavado
1	1.88	0.63
2	3.75	1.25

Extracción de membranas plasmáticas de nódulos

De 15 a 20 gramos de nódulos frescos se presionaron ligeramente en el mortero y filtrar utilizando una membrana de nylon, exprimir con la fuerza ligera de la mano la membrana para salgan todos los simbiosomas posibles, agregar 5 ml de buffer homogenizador (15 mM Hepes pH 7.6, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espererimidina, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.34 M sacarosa y la mezcla de inhibidores de proteasas comerciales) para liberar un poco más, se centrifugó a 2 400 rpm por 20 min., para remover los restos celulares y se resuspendió el precipitado en 5 ml de buffer de choque osmótico, se agitó vigorosamente con ayuda del agitador por 2 min. para romper los simbiosomas y se centrifugó a 5 000 rpm por 15 min., para remover los bacteroides. De esto se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 35 000 rpm por 45 min. Se resuspendió el precipitado en buffer de suspensión (que sean 9 g, aproximadamente) y se adicionaron a la mezcla de 2 fases (27 g), se centrifugó a 2 500 rpm por 15 min., utilizando un rotor de ángulo variable. Se

recuperó la fase superior y se adicionó a un tubo con fase inferior nueva, se mezcló suavemente por inversión (30 veces aprox.) y se centrifugó a 2 500 rpm por 15 min., nuevamente se pasó la fase superior a una nueva fase inferior y se repitió el paso de centrifugación. Al recuperar la fase superior se diluyó con buffer de suspensión, se centrifugó a 45 000 rpm por 45 min., y se resuspendió el precipitado en buffer de suspensión (la menor cantidad posible) y se cuantificó la proteína recuperada.

Extracción de membranas plasmáticas de raíz de frijol

Se cortaron las raíces primarias y secundarias de plantas de frijol hasta tener 20 g se colocaron en la licuadora y se agregaron 10 ml de buffer de homogenización (15 mM Hepes pH 7.6, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espererimidina, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.34 M sacarosa y la mezcla de inhibidores de proteasas comerciales) y se homogenizó por 5 min., por periodos de 15 s y descansos de 20 s, se pasaron a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a 5 000 rpm por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 45 000 rpm por 1 h. El precipitado se resuspendió en buffer de suspensión [9 g (m/m), aproximadamente] y se adicionó a la mezcla de 2 fases (27 g), se centrifugó a 2 500 rpm por 15 min., utilizando un rotor de ángulo variable. Se recuperó la fase superior y se adicionó a un tubo con fase inferior nueva, se mezcló suavemente por inversión (30 veces aprox.) y se centrifugó a 2 500 rpm por 15 min., la fase superior se pasó nuevamente a una nueva fase inferior y se repitió el paso de centrifugación. Se recuperó la fase superior y se diluyó con buffer de suspensión, se centrifugó a 45 000 rpm por 45 min., y el precipitado se

resuspendió en el buffer de suspensión (la menor cantidad posible) y se cuantificó la proteína recuperada.

Preparación de columna de tiopropil sefarosa

Pesar la resina necesaria (1g de resina seca, para 3 ml de resina hidratada) (1 ml de resina pega 12 μ moles de péptido) 67 mg y agregarle 1 ml del buffer de hidratación (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) durante 20 min., haciendo cambios cada 5 min. Pesar 7 μ g del péptido y se resuspendió en el buffer de hidratación. El péptido se incubó con la resina toda la noche con agitación y a 4 °C. La resina se montó en una columna y se bloqueó con 20 volúmenes de solución bloqueadora (Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,5 mM cisteína). Mantener la columna siempre húmeda y a 4°C.

Preparación de la columna de poli L-prolina (PLP).

Se tomaron 2 ml de resina asentada (afigel), y se pasaron a un embudo Bughner con papel Whatman y se lavó con 100 ml de buffer de fosfatos (PBS), pero manteniendo siempre la resina húmeda. Simultáneamente se disolvieron 60 mg de PLP. La resina lavada se mezcló con la solución de PLP y se dejó en agitación suave toda la noche a 4 °C. La resina se montó en la columna y se bloqueó con 40 volúmenes de Tris-HCl pH 8.0.

Actividad de PI3K *in vitro*.

Los ensayos de actividad de cinasa se realizaron en un volumen final de 50 ml del buffer de reacción que contenía 100 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 5mM MgCl₂, y 10 μ M ATP. Para cada reacción se utilizaron aproximadamente 100

μg de proteína o los inmunoprecipitados lavados, se les agregaron inhibidores de proteasas comerciales, se mezclaron con las micelas de 100 μg de fosfatidil serina (PS) y 100 μg de fosfatidil inositol (PI) (Sigma Aldrich), y también en este momento se agregaron los inhibidores o activadores de la actividad de cinasa, esta mezcla se incubó por 10 min. a 4° C por 10 min. La reacción se inició al agregar 10 μCi de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (DuPont NEN^R Research Products) e incubar por 10 min. a 30° C, posteriormente la reacción se detuvo al agregar 400 μl de 1M HCl. Para la extracción de los lípidos se adicionaron 800 μl de cloroformo:metanol (1:1 v/v), y se agitó vigorosamente por 30 s. Para facilitar la separación de las fases se centrifugó por 2 min. a 2000 rpm. La fase superior fue removida y la fase de cloroformo se lavó con 320 μl de 1M HCl: metanol (1:1 v/v). La fase de cloroformo lavada se secó en una atmósfera de nitrógeno y los lípidos se resuspendieron en 30 μl de cloroformo. El producto de la actividad de cinasa se separó por cromatografía en capa fina, las placas de sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemania) previamente tratadas con ácido trans-1,2-diamino ciclohexano- N,N,N',N' tetraacético (CDTA), se cargaron con los 30 μl de fosfolípidos de cada reacción y se corrieron utilizando el sistema de solventes cloroformo:metanol:hidróxido de amonio:agua (45:45:4:11) o alternativamente con el sistema de boratos (metanol 75 ml, cloroformo 60 ml, piridina 45 ml, ácido bórico 12 g, agua 7.5 ml, ácido fórmico 88% (v/v) 3 ml, BHT 0.375 g, etoxiquina 75 μl) (Walsh *et al.*, 1991). Las placas se observaron utilizando un detector de imágenes "Phosphor imager" (Molecular Dynamics, Chesham, Reino Unido). Los fosfolípidos comerciales utilizados como controles se corrieron en las mismas placas de TLC y se visualizaron al rociar la placa

con 1.3% de óxido de molibdeno en 4.2 M de ácido sulfúrico o bien con vapores de yodo.

Preparación de inmunoprecipitados

Aproximadamente a 100 µg de extractos proteicos se les agregaron 5 µg de anticuerpo en un volumen de 500 µl, se incubaron por 18 h a 4° C con agitación constante y suave, los complejos se recuperaron al agregar 30 µl de la proteína A-agarosa (Pierce Biotechnology, USA) se incubaron por 2 h a 4° C con agitación suave. Los inmunoprecipitados se lavaron una vez con buffer PBS frío para eliminar el exceso de anticuerpo, tres veces con buffer de alta concentración de sales (50 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% IGEPAL A-630 y tres veces con buffer de baja concentración de sales (50 mM Tris pH 7.5, 0.1% IGEPAL A-630, 0.05% deoxicolato de sodio). Adicionalmente los inmunoprecipitados utilizados para actividad de cinasa se lavaron dos veces con 100 mM Tris pH 6.8, 0.5 M LiCl 1 mM ortovanadato, 200 mM NaF y 1mM EDTA.

Las concentraciones utilizadas se especifican en la siguiente tabla:

Anticuerpo utilizado	Concentración
Anti-profilina (Guillen et al, 1999)	1:5000
Anti-PI3K (Drobak, et al)	1:100
Anti-PI3K (este trabajo)	1:100
Anti-His (Qiagen)	1:2000

RESULTADOS

La PI3K y la profilina están presentes en las fracciones de citoesqueleto asociadas a la membrana.

En 1999, Guillén y colaboradores demostraron la presencia de cinco isoformas de la profilina en los nódulos de frijol y determinaron que las diferentes isoformas eran el producto de la fosforilación en residuos de tirosina. Para determinar el posible papel de la fosforilación de los residuos de tirosina en la profilina se decidió realizar un análisis de comparación de la secuencia de aminoácidos de la profilina con los diferentes motivos estructurales que reconocen los dominios SH2. Este alineamiento nos reveló que el motivo ⁷²YMVI de la profilina de frijol tiene una alta similitud con el motivo YMVM. Este motivo se encuentra presente en las proteínas que tienen afinidad por el dominio SH2, el cual se localiza en la subunidad reguladora de la PI3K IA (p85) (Songyang *et al.*, 1993). Además, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la familia de profilina demostró que este motivo (YMVI) se encuentra presente en todas las profilinas de plantas reportadas en las bases de datos de proteínas (figura 3). Estos resultados en conjunto con los obtenidos en células animales en donde se demuestra que la profilina interactúa con la subunidad p85 (Bhargavi *et al.*, 1998), nos sugerían que en células vegetales la PI3K podría ser un ligando de la profilina y que podría ser el primer dominio SH2 y su contraparte descritos en plantas.

Para confirmar esta hipótesis se realizó inicialmente un análisis tipo “western blot” con los anticuerpos anti-PI3K y anti-profilina en las proteínas totales de las fracciones de citoesqueleto asociadas a la membrana y de la

fracción soluble. El anticuerpo anti-profilina detectó una proteína de ~14 kDa en la fracción soluble (figura 4a, carril 1) y en la fracción del citoesqueleto asociado a membrana (Dantán et al., 2001) (figura 4a, carril 2). Por otro lado, en la figura 4b (carril 1) se muestra que el anticuerpo anti-PI3K reconoce una banda de ~93 kDa y una de 60 kDa solamente en la fracción del citoesqueleto asociado a la membrana, la cual corresponde al peso molecular de la PI3K. Posiblemente la banda de menor tamaño que reconoce el anticuerpo anti-PI3K sea un producto de degradación de la proteína completa de ~93 kDa.

Nicta	65	PTGLFLGGAK	YMVI	QGEPGA	85
Lices	64	PTGLFLAGTK	YMVI	QGEPGA	84
Ath PRF3	65	PTGLFMAGAK	YMVI	QGEPGA	85
Betula	64	PTGLHLGGIK	YMVI	QGEAGA	84
Zma1	62	PTGLIILGGTK	YMVI	QGEPGA	82
Zma2	68	PTGLFLGPTK	YMVI	QGEPGA	88
Phleum 2	62	PTGMFVAGAK	YMVI	QGEPGA	82
Zma3	62	PIGLFLGPTK	YMVI	QGEPGA	82
Zma4	62	PTGLFVGGTK	YMVI	QGE PGV	82
Glim 1	62	PTGLYLGGTK	YMVI	QGEPGA	82
Glim 2	62	PTGLYLGGTK	YMVI	QGEPGA	82
Phavu	62	PTGLYIGGTK	YMVI	QGE PGS	82
Ath PRF1	62	PTGLFLGGEK	YMVI	QGEQGA	82

Figura 3. Motivo ⁷²YMVI está conservado en la secuencia de aminoácidos de la profilina de plantas reportadas.

Alineamiento de la región de la secuencia de aminoácidos de la profilina que comprende a la tirosina 72 de la secuencia de frijol. En morado se muestra el motivo YMVI de la profilina de tabaco (Nicta), tomate (Lices), isoforma 3 de Arabidopsis (Ath PROF3), Betuna (betuna), isoforma 1 de Maíz (Zma1), isoforma 2 de maíz (Zma2), isoforma 2 de Phleum (Phleum 2), isoforma 3 de maíz (Zma3), isoforma 1 de soya (Glim 1), isoforma 2 de soya (Glim2), frijol (Phavu) y isoforma 1 de Arabidopsis (Ath PROF1).

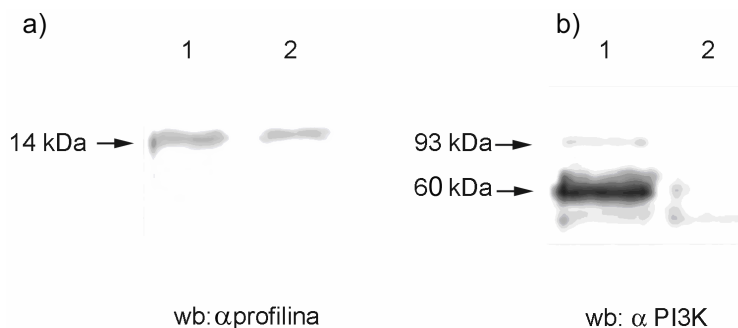


Figura 4. La profilina y la PI3K se encuentran en la misma fracción del citoesqueleto asociado a membranas.

Extractos proteicos separados en un gel de acrilamida y transferidos a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectados con el anticuerpo anti-profilina (a) y anti-PI3K (b). **a)** Fracciones de proteínas solubles (carril 1) y del citoesqueleto asociada a membrana (carril 2) de nódulos de frijol de 18 días de edad. **b)** Fracciones de proteínas solubles (carril 2) y del citoesqueleto asociada a membrana (carril 1) de nódulos de frijol de 18 días de edad. Con las flechas se indican los pesos moleculares aproximados para las bandas reconocidas por los anticuerpos.

La profilina y la PI3K se encuentran en el mismo complejo proteico.

Las proteínas totales de las fracciones del citoesqueleto asociados a la membrana se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-profilina y este complejo proteico se separó en un gel de acrilamida y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Después de realizar la inmunotinción con los anticuerpos anti-PI3K y anti-profilina se observó que el anticuerpo anti-PI3K reconocía una banda de 93 kDa y una banda de 60 kDa en los inmunocomplejos de la profilina (figura 5a, carril 1). En la figura 5b carril 1 se muestra que el anticuerpo anti-profilina reconoce una banda de 14 kDa en las proteínas del inmunoprecipitado de anti-profilina. Para demostrar que la enzima PI3K se encontraba específicamente en los complejos proteicos de la profilina

se analizó la presencia de la PI3K en los inmunocomplejos obtenidos con los anticuerpos anti-nodulina 30 y anti-IgG de conejo. El anticuerpo anti-PI3K no detectó las proteínas de 93 y 60 kDa en estos dos complejos proteicos (figura 5a, carril 2 y 3, respectivamente). La especificidad de la reacción de inmunoprecipitación también se comprobó en inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-profilina de la fracción del citoesqueleto asociada a la membrana que fueron calentadas previamente a 95°C en presencia de 2% de SDS para romper los complejos proteicos. El anticuerpo anti-profilina reconoció una proteína de 14 kDa en las proteínas inmunoprecipitadas de fracciones sin calentar y calentadas (figura 5c, carril 1 y 2 respectivamente); sin embargo el anticuerpo anti-PI3K no detectó la proteína de 60 y 93 kDa en el inmunoprecipitado de profilina de la fracción que se calentó a 95°C en presencia de SDS (figura 5c, carril 4). Estos resultados demuestran que la presencia de la PI3K en los inmunoprecipitados de profilina es debida a la interacción específica de la PI3K con la profilina y sugería una interacción directa.

Caracterización de la actividad de cinasa de la His-PI3K recombinante expresada en el sistema de Baculovirus.

El cDNA de la PI3K se insertó en un vector del sistema de Baculovirus el cual, nos permite obtener una proteína de fusión con seis histidinas en el extremo amino de la PI3K. Posteriormente, este vector se transfectó a las células de insecto y se determinaron las condiciones optimas de expresión de la proteína recombinante (figura 6). Las proteínas de un extracto soluble de las células Sf9 de insecto se pasaron a través de una columna de Ni-NTA y

después de lavar la resina exhaustivamente, se desprendió la His-PI3K con un gradiente de concentración de Imidazol (0 a 500 mM) (figura 6; carriles 2-13).

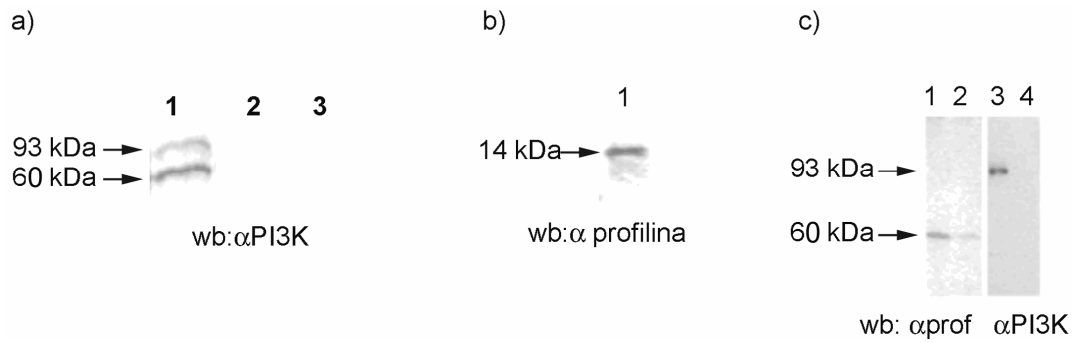


Figura 5. La profilina y la PI3k se encuentran en el mismo complejo proteico.

a) Análisis tipo “western blot” de las fracciones de citoesqueleto asociadas a membrana, inmutprecipitadas con el anticuerpo anti-profilina (carril 1), con el anticuerpo anti-nodulina 30 (carril 2) y con el anticuerpo anti-IgG conejo (carril 3) e inmunodetectadas con el anticuerpo anti-PI3K. **b)** Análisis tipo “western blot” de las fracciones de citoesqueleto asociadas a membrana inmutprecipitadas con el anticuerpo anti-PI3K (carril 1) e inmunodetectadas con el anticuerpo anti-profilina. **c)** Análisis tipo “western blot” de las fracciones de citoesqueleto asociadas a membrana inmutprecipitadas con el anticuerpo anti-profilina en ausencia (carriles 1 y 3) o la presencia de 2% SDS (carriles 2 y 4). Con las flechas se indican los pesos moleculares aproximados para las bandas inmunodetectadas por los anticuerpos.

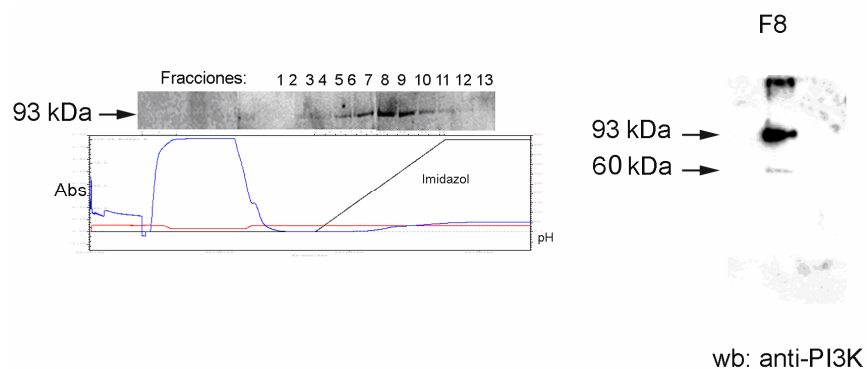


Figura 6. Purificación de la PI3K recombinante.

a) Los extractos proteicos de células *Sf9* sobre expresando la His-PI3K se pasaron por una columna de Ni-NTA en el HPLC, y se eluyeron con un gradiente de Imidazol (0 a 500 mM), en el gel teñido con SyPro se observa una proteína con un peso de 93 kDa. El cromatograma muestra los cambios en la absorbancia (azul) durante el proceso de elusión y al aumento del porcentaje de imidazol (negro). **b)** análisis tipo “western blot” de la fracción 8 de la elusión en el HPLC con el anticuerpo anti-PI3K. La flecha indica la banda de aproximadamente 93 kDa que detectó el anticuerpo anti-PI3K.

La especificidad catalítica de la His-PI3K recombinante fue determinada a través de la inhibición farmacológica y por la fosforilación específica de fosfoinosítidos. La His-PI3K exhibió una fosforilación selectiva hacia el fosfatidil inositol (PI) (figura 7; carril 1), ya que no se observó un producto fosforilado con un R_f similar al fosfatidil inositol 3,4-bifosfato (PI3,4P2) cuando se utilizó el fosfatidil inositol 4-fosfato (PI4P) como sustrato (figura 7; carril 2). Sin embargo, en esta carril se detectó una señal débil con un R_f similar al PI3P aunque esto puede ser debido a la contaminación de pequeñas cantidades de PI en la preparación comercial del PI4P (figura 7; carril 2), ya que no se detecta ninguna señal cuando se realiza la actividad de cinasa de la PI3K en ausencia de sustrato (dato no mostrado). Por otro lado, también se determinó el efecto de

los inhibidores: la wortmanina y el LY294002 en la actividad de cinasa de la His-PI3K recombinante ya que estos fármacos han sido reportados como dos inhibidores específicos de la PI3K de levaduras. La actividad de la His-PI3K disminuyó significativamente en presencia de 200 μ M de LY294002 (figura 7; carril 3) y 30 μ M de wortmanina (dato no mostrado) comparada con la actividad obtenida en ausencia de los fármacos (figura 7; carril 1). Este análisis bioquímico demostró que la proteína recombinante tiene una actividad de fosforilación específica para PI; además de que presenta las propiedades de inhibición farmacológicas similares a las PI3K tipo III reportadas previamente.

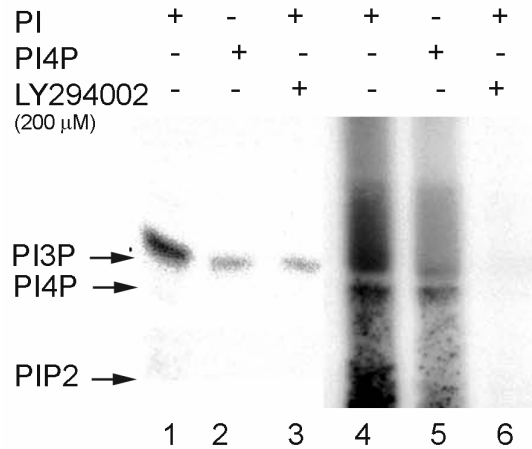


Figura 7. Caracterización de la actividad de cinasa de la His-PI3K.

Actividad de la actividad de la PI3K recombinante, expresada en células de insecto (carriles 1, 2, 3) y de la fracción de proteínas de levadura (carriles 4, 5, 6), en ausencia (-) y presencia (+) fosfatidil inositol (PI) y/o fosfatidil inositol 4 fosfato (PI4P) como sustratos o 200 μ M del inhibidor LY294009. Los fosfolípidos marcados radiactivamente se observaron en un visualizador de imágenes (Phosphor Imager). La flecha indica la señal que corresponde al Rf del fosfatidil inositol 3- fosfato (PI3P) y del fosfatidil inositol 4- fosfato (PI4P).

La PI3K es procesada por las proteasas solubles de los nódulos de frijol

De manera consistente, el anticuerpo anti-PI3K reconoció una proteína de 60 kDa en la fracción del citoesqueleto asociado a membranas y en los inmunocomplejos donde se encuentra la profilina. Cuando este anticuerpo se utilizó para analizar la expresión y la purificación de la His-PI3K recombinante de las células de insecto, se observó que el anticuerpo anti-PI3K reconoció la proteína de 60 kDa (figura 8, carril 3). Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo anti-PI3K proporcionado por el Dr. B. J. Drobach del Instituto John Innes, Reino Unido (dato no mostrado), lo que ratificaba la hipótesis de que esta proteína podría ser el producto de la degradación de la proteína de 93 kDa que es el peso molecular esperado de la His-PI3K. Para confirmar esto, la His-PI3K recombinante expresada en células de insecto se acopló a la resina de Ni-NTA y se incubó con los extractos totales de proteínas de nódulos de frijol. Después de lavar exhaustivamente la resina, las proteínas acopladas a la resina se despegaron a 95°C con la solución de Laemmli y se separaron en un gel de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo anti-PI3K. El anticuerpo detectó una proteína de 93 kDa y 60 kDa en la His-PI3K recombinante que no se incubó con los extractos totales de nódulos de frijol (figura 8, carril 1).

Sin embargo el anticuerpo detectó solamente una banda de 60 kDa cuando se incubó a la His-PI3K con los extractos de nódulos de frijol (figura 8, carril 2). Esto resultados sugerían que en los extractos proteicos de frijol hay actividad enzimática que procesa a la PI3K, que no es sensible a los inhibidores de proteasas utilizados, resultando en la observación de la banda

de 93 kDa acompañada de la de 60 kDa la mayoría de las veces en mayor cantidad.

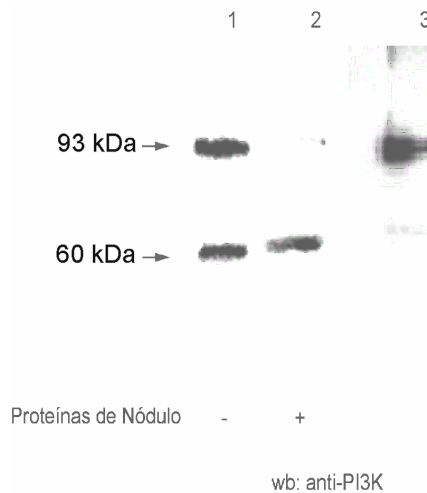


Figura 8. La His-PI3K es procesada por actividad proteasa de nódulo de frijol.

Análisis tipo “western blot”, con el anticuerpo anti-PI3K, de la PI3K recombinante expresada en células de insecto, en la ausencia (carril 1) o la presencia (carril 2) de extractos proteicos de nódulos de 18 días. La carril 3 corresponde a la His-PI3K recientemente, purificada por una columna de afinidad utilizada como control de carga. Las flechas indican las bandas de aproximadamente 93 y de 60 kDa.

La actividad de cinasa de la PI3K está presente en los inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-profilina.

En el complejo inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-profilina se encuentra una proteína de 93 kDa, la cual corresponde al peso molecular de la PI3K deducido de su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, el anticuerpo también reconoce una banda de 60 kDa la cuál, posteriormente se identificó

como una proteína que está relacionada antigénicamente a la PI3K y que probablemente se forma por la degradación de la proteína de 93 kDa durante el proceso de inmunoprecipitación. Por lo que, para ratificar la presencia de la PI3K en los inmunocomplejos de la profilina se llevó a cabo un análisis de la actividad de la PI3K en los inmunoprecipitados de los anticuerpos anti-profilina. Las proteínas en los inmunocomplejos de profilina de las fracciones de citoesqueleto asociadas a membrana se resuspendieron en una solución apropiada para la actividad de PI3K. La actividad se realizó en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, con y sin inhibidores o activadores de la actividad de las cinasas de fosfoinosítidos (LY294002, Tritón X100, adenosina). La actividad de cinasa que se inmunoprecipita con los anticuerpos anti-profilina fosforila específicamente al fosfatidil inositol fosfato (PIP) (figura 10) ya que se obtiene un producto fosforilado con un Rf similar al del producto de la actividad de cinasa presente en las fracciones membranales de levadura (figura 9). También, se observó que la fosforilación del fosfatidil inositol fosfato disminuye considerablemente cuando se determinó la actividad de cinasa en presencia de LY294002, inhibidor específico de la PI3K (figura 9). Además, no se obtuvo una disminución de los productos fosforilados cuando se analizó la actividad de cinasa en la presencia de los inhibidores de la actividad de la PI4K (figura 9; adenosina). Estos resultados mostraron que la actividad de cinasa de fosfoinosítidos que se inmunoprecipita con el anticuerpo anti-profilina, es el producto enzimático de la actividad de la PI3K y se confirma que la PI3K se encuentra localizada en el complejo proteico que incluye a la profilina. Posteriormente, demostramos que la profilina y la PI3K forman parte del mismo complejo proteico en las fracciones del citoesqueleto asociada a membranas

de raíces y de nódulos de frijol. En la figura 10, se muestra a los fosfoinosítidos fosforilados producidos por la actividad de cinasa de lípidos que está presente en los inmunoprecipitados de diferentes fracciones membranales obtenidos con el anticuerpo anti-profilina. Se inmunoprecipitaron de la membrana plasmática de nódulos, membrana plasmática de raíces y membrana peribacteroidal, así como también en extractos de membrana nuclear de nódulos. La especificidad de la actividad se determinó con una mezcla de reacción de fosforilación a la que se adicionó inhibidores específicos de cinasas de fosfolípidos y se encontró que esta actividad era sensible a la presencia de estos inhibidores de la actividad de PI3K.

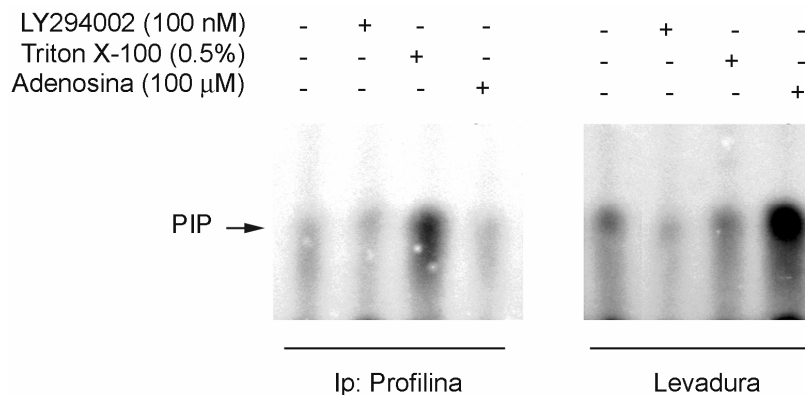


Figura 9. Caracterización de la actividad de PI3K en los inmunoprecipitados de profilina.

Actividad de cinasa en inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-profilina de la fracción del citoesqueleto asociada a membrana de nódulos de 18 días y de la fracción membranal de proteínas de levadura, utilizadas como control. Los fosfolípidos marcados con γ - ^{32}P se separaron en una TLC con el sistema de solventes cloroformo:metanol:hidróxido de amino:agua (45:45:4:11). La actividad de cinasa se realizó en ausencia (-) o presencia (+) de 100 nM LY294002, 0.5% triton X-100 o 100 μM 2-desoxi-adenosina. Los fosfolípidos marcados radiactivamente se observaron en un visualizador de imágenes (Phosphor Imager). La flecha indica la mancha que corresponde al Rf del fosfatidil inositol fosfato (PIP).

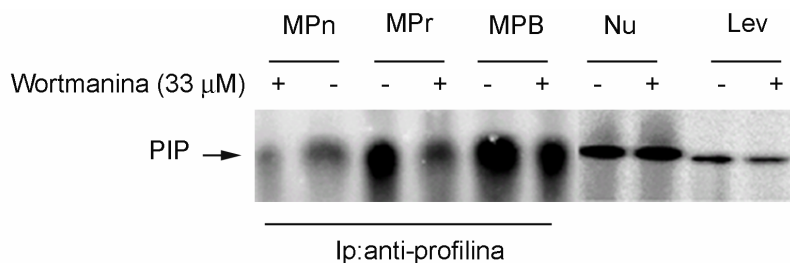


Figura 10. Actividad de cinasa en inmunocomplejos de diferentes fracciones membranales de nódulos de frijol.

Actividad de cinasa en inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-profilina de la fracción de membrana plasmática de nódulos (MPn), membrana plasmática de raíz (MPr), membrana peribacteroidal (MPB) y fracciones de proteínas totales de núcleos (Nu) de nódulos de 18 días y de la fracción membranal de proteínas de levadura. Los fosfolípidos marcados con γ - 32 P se separaron en una TLC con el sistema de solventes cloroformo:metanol:hidróxido de amino:agua (45:45:4:11). La actividad de cinasa se realizó en ausencia (-) o presencia (+) de 33 μ M de wortmanina. Los fosfolípidos marcados radiactivamente se observaron en un visualizador de imágenes (Phosphor Imager). La flecha indica la señal que corresponde al Rf del fosfatidil inositol fosfato (PIP).

Dado que estos resultados mostraron que la profilina y la PI3K están localizadas en el mismo complejo proteico en las fracciones del citoesqueleto preferentemente asociado a membrana peribacteroidal de los nódulos de frijol, se procedió a realizar un análisis de la actividad de la PI3K en los inmunoprecipitados del anticuerpo anti-profilina de las fracciones del citoesqueleto asociadas a membrana de los nódulos de frijol en diferentes etapas de desarrollo. Las fracciones del citoesqueleto asociadas a membrana de los nódulos de 12, 14, 16, 18, 22, 25 y 30 días después de la inoculación, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-profilina y se resuspendieron en solución para reacción de fosforilación.

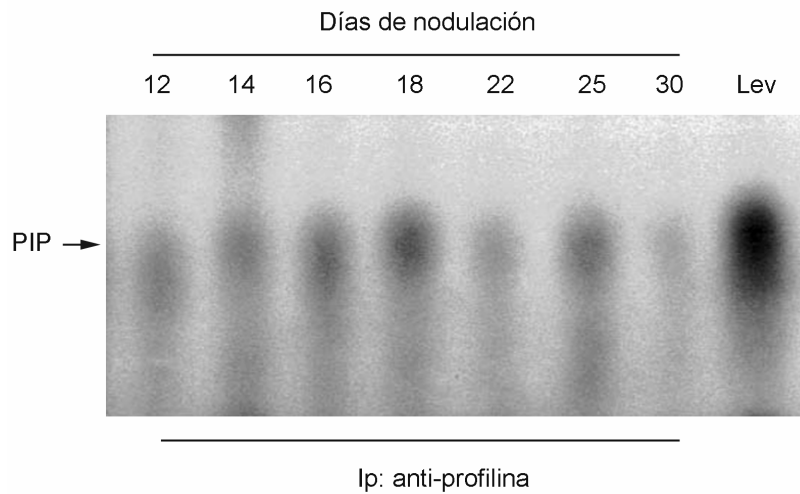


Figura 11. Actividad de cinasa en inmunocomplejos de fracciones membranales durante el desarrollo del nódulo.

Actividad de cinasa en inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-profilina de las fracciones de membranales de nódulos de diferentes etapas de desarrollo (12, 14, 16, 18, 22, 25, 30 días después de la inoculación). Los extractos de proteínas de levadura se utilizaron como control (Lev). Los fosfolípidos marcados con γ - ^{32}P se separaron en una TLC con el sistema de solventes cloroformo:metanol:hidróxido de amonio:agua (45:45:4:11). Los fosfolípidos marcados radiactivamente se observaron en un visualizador de imágenes (Phosphor Imager). La flecha indica la señal que corresponde al R_f del fosfatidil inositol fosfato (PIP).

En la figura 11 se muestra la autoradiografía de los fosfoinosítidos separados por cromatografía en capa fina con un sistema de solventes de boratos. En todos los inmunocomplejos analizados, se observó una sola banda de fosfoinosítidos marcados con ^{32}P con un R_f similar al reportado para el fosfatidil inositol fosfato (PIP) (Walsh *et al.*, 1991). Además, esta banda tiene un R_f similar al PIP obtenido con los extractos totales de levadura (Figura 11, Lev). Interesantemente, observamos un incremento de la actividad de fosforilación

de la PI3K en los inmunocomplejos proteicos de la fracción de citoesqueleto asociado a membrana de los nódulos de 18 y 25 días de frijol.

La PI3K y la profilina interactúan directamente

Los ensayos de actividad de cinasa de fosfoinosítidos y el análisis tipo “western blot” de los inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-profilina mostraron que la profilina y la PI3K se encuentran en los mismos complejos proteicos obtenidos de las diferentes fracciones de membrana; sin embargo, estos resultados no permiten discernir entre una interacción indirecta y una directa entre la profilina y la PI3K. Para descartar una de estas posibilidades, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-profilina de extractos de células de insecto que expresan la His-PI3K recombinante, que fueron incubados previamente con la profilina purificada en una columna de Sefarosa-PLP (figura 12a, carril 2). El anticuerpo anti-PI3K detectó únicamente la proteína de 93 kDa en el inmunocomplejo de los anticuerpos anti-profilina (figura 12a; carril 2). La especificidad de los inmunoprecipitados se confirmó con los inmunoprecipitados de los extractos de proteínas de las células *Sf9* que expresan la His-PI3K recombinante que no se le adicionó la profilina purificada. La figura 12a (carril 1) muestra que el anticuerpo anti-profilina no inmunoprecipita a la proteína de 93 kDa en ausencia de la profilina debido a que estas dos proteínas no están relacionadas antígenicamente y por lo tanto confirma que el suero donde se encuentra el anticuerpo anti-profilina no tiene anticuerpos contaminantes que reconozcan a la PI3K. Estos datos indican que la presencia de la PI3K en los inmunocomplejos de la profilina se debe a la interacción directa que existe

entre la profilina y la PI3K. Para ratificar este resultado, se efectuó simultáneamente una inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-His de los extractos de las células Sf9 de insecto y de extractos preincubados con extractos de nódulo. El análisis tipo “western blot” de los complejos proteicos obtenidos con el anticuerpo anti-His reveló la presencia de una proteína de 14 kDa, la cual era reconocida por el anticuerpo anti-profilina, en los extractos que fueron incubados con las proteínas solubles de nódulos (Figura 12b, carril 3). Como se puede ver, estos resultados muestran que en células vegetales la profilina no requiere de una proteína intermediaria para unirse a la PI3K. Por lo tanto, estos experimentos apoyan fuertemente la hipótesis que plantea que la profilina y la PI3K interaccionan directamente entre sí.

Análisis de las estructuras de la Profilina y la PI3K

La profilina es una proteína de 14 kDa que está organizada estructuralmente en tres dominios perfectamente caracterizados los cuales participan en la interacción de la profilina con la actina, PIP2 y proteínas con regiones ricas en prolinas. Dadas las evidencias que demuestran que la profilina está modificada postraduccionalmente por fosforilación de los residuos de Tyr en los diferentes tejidos de frijol (Guillen *et al.*, 1999), y a que se ha demostrado ampliamente que la presencia de la fosfotirosina es importante para la interacción con los dominios SH2, se supuso que la profilina podría tener un motivo, no descrito, que le permitiera ser reconocida por dominios SH2 de proteínas de plantas.

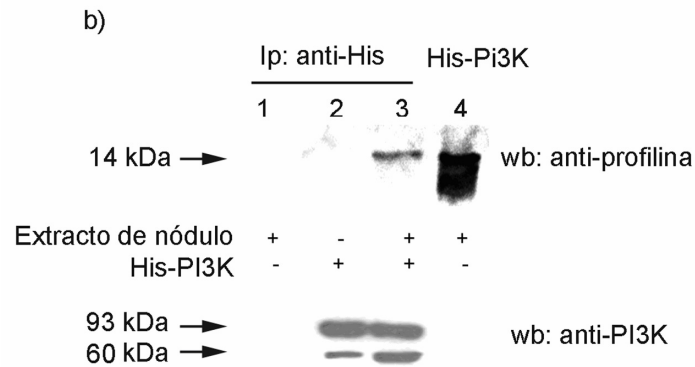
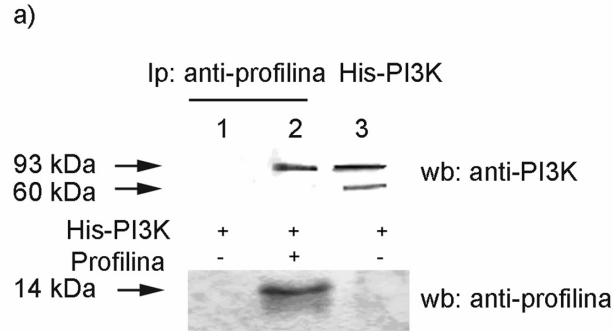


Figura 12. La profilina y la PI3K interaccionan directamente.

a) Análisis tipo “western blot” con el anticuerpo anti PI3K. La His-PI3K se incubó en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de profilina purificada de nódulos de frijol y se inmunoprecipitó (Ip) con el anticuerpo anti profilina. La carril 3 es el control de la His-PI3K utilizada. El recuadro inferior es un ensayo tipo “western blot” con el anticuerpo anti profilina utilizado. b) Análisis tipo “western blot” con el anticuerpo antiprofilina. Extractos de proteicos de nódulos de frijol se incubaron en ausencia (carriles 1, 4) o presencia (carril 3) de His-PI3K purificada de células de insecto y posteriormente se inmunoprecipitaron (Ip) con el anticuerpo anti-Histidinas (anti-His). Control (carril 3) His-PI3K purificada de células de insecto. El recuadro inferior es un ensayo tipo “western blot” con el anti PI3K, utilizado. Las flechas indican las bandas detectadas de aproximadamente 93 y de 60 kDa .



Figura 13. Orientación de las tirosinas de la secuencia de la profilina de frijol.

Representación en tubo de los carbonos α de la estructura terciaria de la profilina de frijol, la estructura de la cadena lateral de las tirosinas se representa en rojo e igualmente se indica la posición de cada uno de estos residuos. La estructura fue generada por el programa GRASP (ver materiales y métodos).

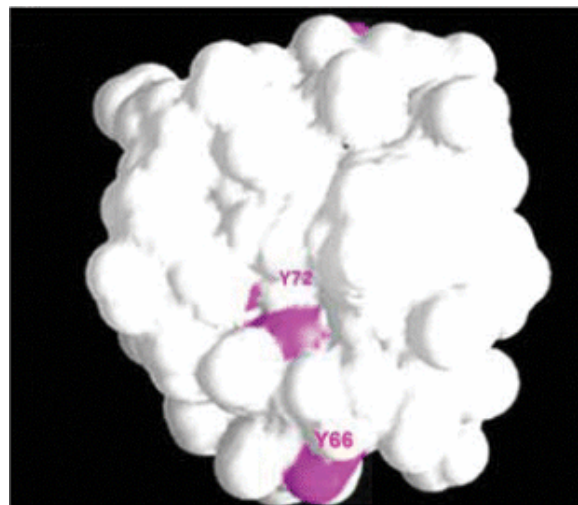


Figura 14. Representación gráfica de la superficie de la estructura terciaria de profilina.

La Tyr72 (pY72) y la Tyr66 (pY66) están señaladas con el color rosa. El diagrama de superficie se generó con el programa GRASP (ver materiales y métodos). La orientación de la estructura de profilina es igual a la que se observa en la figura 13.

Tabacco	-----MSWQ	TYVDDHLMAD	IEGQQGHHLA	AAAILGHDGS	VWAQSSTFPK	FKPEEITNIM	KDFDEPGHLA	64
Tomato	-----MSWQ	TYVDDHLMCD	IEG-TGHHLS	SAAILGFDGS	VWAQSPNFPK	FKAEEITNIM	KDFDEPGHLA	63
Ath PRF3	-----MSWQ	TYVDEHLMCD	VG DGQGHHLT	AAAI VGH DGS	VWAQSANFPQ	FKGQEFSDIM	KDFDEPGHLA	64
Betula	-----MSWQ	TYVDEHLMCD	IDGQASNSLA	S-AIVGH DGS	VWAQSSSFPQ	FKPQEITGIM	KDFEEPGHLA	63
Zma1	-----MSWQ	TYVDEHLMCE	IE---GHHLT	SAAIVGH DGA	TWAQSTAFPE	FKPEEMAAIM	KDFDEPGHLA	61
Zma2	MSDRAKMSWQ	AYVDEHLMCE	IE---GHHLA	AAAI VGH DGA	AWAQSTAFPE	FKTEDMANIM	KDFDEPGHLA	67
Phleum 2	-----MSWQ	TYVDEHLMCE	IE---GHHLA	SAAILGH DGT	VWAQSADFPO	FKPEEITGIM	KDFDEPGHLA	61
Zma3	-----MSWQ	TYVDEHLMCE	IE---GHHLA	SAAIVGH DGA	VWAQSTAFPO	FKPEEMTNI I	KDFDEPGFLA	61
Zma4	-----MSWQ	AYVDEHLMCE	IE---GQHLS	AAAI VGH DGS	VWAQSESFP E	LKPEEVAGI I	KDFDEPGTLA	61
Soybean	-----MSWQ	AYVDDHLLCD	IE---GNHLT	HAAIIGQ DGS	VWAQSTDFPO	FKPEEITAIM	NDFNEPGSLA	61
Soybean	-----MSWQ	AYVDDHLLCG	IE---GNHLT	HAAIIGQ DGS	VWLQSTDFPO	FKPEEITAIM	NDFNEPGSLA	61
Bean	-----MSWQ	TYVDDHLLCE	IE---GNHLT	HAAILGQ DGS	VWAKSASFPQ	FKPEEITGIM	NDFNEPGTLA	61
Ath PRF1	-----MSWQ	SYVDDHLMCD	VE---GNHLT	AAAILGQ DGS	VWAQSAKFPQ	LKPQEIDGIK	KDFEEPGFLA	61
		PLC SH2	YVDD					
Tabacco	PTGLFLGGAK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGSGG	ITIKKTQNAL	IFGIYEEPV T	PGQCNMVEK	IRDYLV DQGY	134
tomato	PTGLFLAGTK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGPGG	ITIKKTQNAL	IFGVYEEPV T	PGQCNMVEK	IGDYLV DQGY	133
Ath PRF3	PTGLFMAGAK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGAGG	ITIKKTGQSC	VFGIYEEPV T	PGQCNMVVER	LG DY LLEQGL	134
Betula	PTGLHLGGIK	YMVIQGEAGA	VIRGKKGSGG	ITIKKTGQAL	VFGIYEEPV T	PGQCNMVVER	LG DY LLDQGL	133
				Abl SH2	YEEP			
Zma1	PTGLIIGGTK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGSGG	ITVKKTGQSL	IIGIYDEPMT	PGQCNLVVER	LG DY LLEQGM	131
Zma2	PTGLFLGPTK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGSGG	ITVKKTGQAL	VVGIYDEPMT	PGQCNMVVER	LG DY LLEQGM	137
Phleum 2	PTGMFVAGAK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGAGG	ITIKKTGQAL	VVGIYDEPMT	PGQCNMVVER	LG DY LVEQGM	131
Zma3	PIGLFLGPTK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGSGG	ITVKKTGQAL	VIGIYDEPMT	PGQCNMVVER	LG DY LVEQGL	131
Zma4	PTGLFVGGTK	YMVIQGEPGV	VIRGKKGTGG	ITIKKTGMSL	IIGVYDEPMT	PGQCNMVVER	LG DY LIEQGF	131
Soybean	PTGLYIIGGTK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGPGG	VTVKKTGAAL	IIGIYDEPMT	PGQCNMVVER	PG DY LLDQGY	131
Soybean	PTGLYIIGGTK	YMVIQGEPGA	VIRGKKGPGG	VTVKKTGAAL	IIGIYDEPMT	PGQCNMVVER	LG DY LLDQGY	131
Bean	PTGLYIIGGTK	YMVIQGEPGS	VIRGKKGPGG	VTVKKTNLAL	VIGIYDEPMT	PGQCNMIVER	LG DY LIEQGL	131
Ath PRF1	PTGLFLGG EK	YMVIQGEQGA	VIRGKKGPGG	VTIKKTQNAL	VFGFYDEPMT	GGQCNLVVER	LG DY LIESEL	131
		p85 SH2	YMVI		Nck SH2	YDEP	PLC SH2	YLIE

Figura 15. Análisis de la estructura primaria de las secuencias de profilina de plantas.

Alineamiento de las profilinas de tabaco (Tabacco), tomate (tomato), isoforma 3 de Arabidopsis (Ath PRF 3), betula (Betula), isoforma 1 de maíz (Zma 1), isoforma 2 de maíz (Zma 2). Xx (Phleum 2), isoforma 3 de maíz (Zma 3), isoforma 4 de maíz (Zma 4), isoforma 1 de soya (soybean), isoforma 2 de soya (soybean), frijol (bean) e isoforma 1 de Arabidopsis (Ath PROF 1). Se comparan los aminoácidos consensos para el reconocimiento de los dominios SH2 de las proteínas Fosfolipasa C (PLC SH2), la cinasa Abl (Abl SH2), subunidad reguladora, p 85, de la PI3K (p85 SH2), la proteína adaptadora Nck (Nck SH2) y la fosfolipasa C (PLC SH2). El recuadro en rojo indica los aminoácidos adyacentes a la tirosina 72 de la secuencia de la profilina de frijol.

Para determinar si esta hipótesis era correcta, primeramente se hizo un análisis de bioinformática de la secuencia de aminoácidos de la PI3K y se encontró una secuencia de aminoácidos que tenía una similitud con los dominios SH2. Estas

evidencias, apoyaban fuertemente la posibilidad de que la profilina y la PI3K pudieran interactuar a través de la fosfotirosina de la profilina (figura 15) y de un dominio SH2 de la PI3K (figura 16). Posteriormente, se generó el modelo estructural de la profilina de frijol en el programa SWISS-MODEL” en el que se utilizó como molde las coordenadas de la estructura atómica de la profilina de Arabidopsis (PDB ID: 1A0K). A esta estructura se le aplicó un recocido y una minimización en la paquetería de CNS, se visualizó en el programa “GRASP” y se localizaron los cinco residuos de tirosinas que están en la secuencia de aminoácidos de la profilina (figura 13). La representación gráfica de la superficie del modelo molecular de la profilina mostró que los cinco residuos de la profilina se encontraban estructuralmente expuestas (figura 14).

Posteriormente, se analizaron los residuos de aminoácidos adyacentes los residuos de Tyr y se compararon con las secuencias de aminoácidos reportadas en los motivos de profilinas de plantas que tienen los dominios SH2. Esta comparación evidenció la presencia de un consenso de aminoácidos alrededor del residuo Tyr 72 muy similar al encontrado en los motivos que participan en la interacción con el dominio SH2 de la subunidad reguladora (p85) de la PI3K tipo I (figura 15, recuadro). Este análisis también se realizó en la estructura primaria de la PI3K mostrando que la PI3K contenía una secuencia de aminoácidos con una alta similitud a la secuencia de los dominios SH2 de la PI3K tipo III. Estos resultados apoyaban fuertemente una interacción directa entre la profilina y la PI3K de plantas. Esta suposición se comprobó experimentalmente con ensayos de interacción *in vitro* en donde se utilizó una batería de péptidos sintéticos que simulaban al motivo en sus diferentes estados de fosforilación; un péptido sin fosforilar (Y72), otro que simula el

estado fosforilado (Y72D) y uno que no puede ser fosforilado (Y72F); además se sintetizó un péptido que tiene la fosfotirosina (pY72). Estos péptidos se diseñaron de tal manera que se pudieran inmovilizar en una resina de tiopropil sefarosa ya que se les adicionó un residuo de Cys en el amino terminal (Tabla 2). Los péptidos inmovilizados en la resina se incubaron con las proteínas solubles de los extractos obtenidos de la lisis de las células de insecto *Sf9* que expresan la His-PI3K recombinante.

Después de un lavado exhaustivo, se despegaron las proteínas acopladas a cada uno de los péptidos, las cuales se separaron en un gel de acrilamida y se analizó la presencia de la PI3K con el anticuerpo anti-PI3K. Este anticuerpo reconoció una banda de 60 y 93 kDa en las proteínas que se pegaron a los péptidos que simulan un estado no fosforilado de la Tyr de la posición 72 (Y72, Y72F) (figura 16). Contrario a lo esperado, el anticuerpo anti-PI3K no detectó a la His-PI3K recombinante en las proteínas que se despegaron del péptido pY72 y Y72D que simulan el estado fosforilado de la tirosina (figura 16). Esto sugiere que la interacción entre la profilina y la PI3K es a través de un mecanismo diferente al que se da entre el dominio SH2 y los motivos con fosfotirosina.

Hasta este momento se tenían las evidencias experimentales que demostraban que la profilina es una proteína que está organizada estructuralmente en tres dominios, los cuales participan en el reconocimiento e interacción de la actina, del PIP2 y de regiones ricas en prolina.

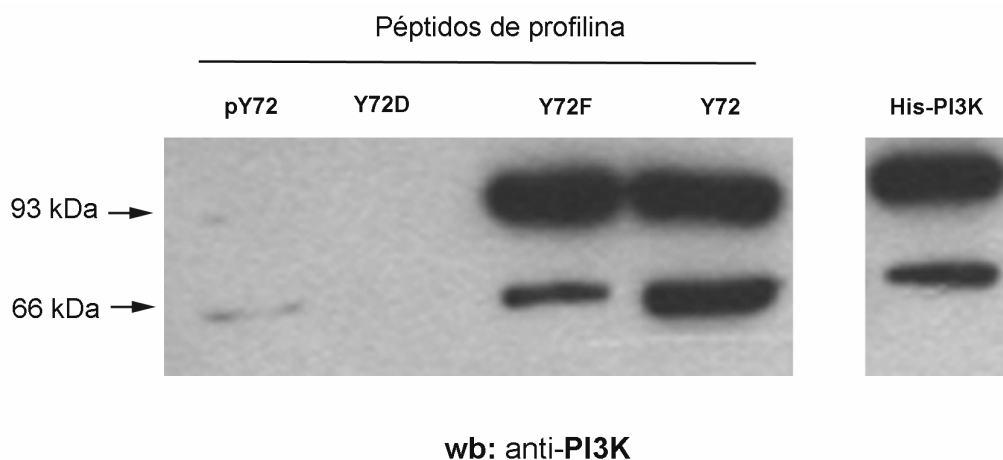


Figura 16. La PI3K interacciona con la región de la tirosina 72 de la profilina.

Análisis tipo “western blot” (wb) con el anticuerpo anti PI3K de los péptidos de profilina pY72 (tirosina 72 fosforilada), Y72D (cambio de tirosina 72 por un ácido aspártico), Y72D (cambio de la tirosina 72 por una fenilalanina) y Y72 (tirosina sin cambio). En el recuadro de la derecha se muestra la His-PI3K utilizada como control de carga. Las flechas indican las bandas de aproximadamente 93 y de 60 kDa detectadas por el anticuerpo anti-PI3K.

La conformación estructural de la profilina de frijol es muy similar a la estructura terciaria de las isoformas de profilina que ya se han cristalizado (Thorn *et al.*, 1997). Esta estructura presenta una alfa hélice en el carboxilo y amino terminal las cuales forman una cavidad que le permite acomodar las secuencias ricas en prolinas y dentro de esta hendidura se encuentran los aminoácidos aromáticos (Trp³, Trp³³, Tyr⁶, Tyr¹²⁵) que participan en la interacción con las regiones ricas en prolinas (Thorn *et al.*, 1997).

Los análisis de comparación de secuencias de aminoácidos entre los miembros de la familia de la profilina demuestran que existe muy poca identidad (17-60%) entre las isoformas de la profilina de organismos de diferentes reinos (Flores-Bustos; tesis de licenciatura). La poca identidad que

presentan las diferentes isoformas de profilina está dada porque se conservan los aminoácidos que participan en la interacción con la actina, el PIP2 y la PLP (referencia). También es importante recalcar, que a pesar de que estas isoformas tienen una baja identidad en su secuencia de aminoácidos; todas las isoformas de profilina presentan una alta similitud estructural (Thorn *et al.*, 1997) y se ha visto que los aminoácidos aromáticos que participan en la interacción con la PLP se localizan en los extremos amino y en el carboxilo terminales (figura 17). La presencia de residuos de tirosina en el dominio de interacción a PLP planteaba la posibilidad de que la interacción entre la PI3K y la profilina se pueda llevar a cabo a través de un motivo rico en prolina presente en la PI3K y el dominio de unión a PLP de la profilina.

Para confirmar esta hipótesis se diseñó un péptido quimérico que contenía la alfa hélice del carboxilo terminal separado por seis residuos de glicina de la alfa hélice del amino terminal (C+N) (figura 17). Este péptido también, se le adicionó un residuo de Cys en el amino terminal (Tabla 2) y se inmovilizó en una resina de tiopropil sefarosa. Posteriormente, se incubó con diferentes concentraciones de PLP (10, 100 y 1000 μM), se lavó exhaustivamente para eliminar la PLP no pegada al péptido y después cada uno de los complejos se incubaron con las proteínas solubles obtenidas de la lisis de las células de insecto *Sf9* que expresan la His-PI3K. Los complejos proteicos se separaron en un gel de acrilamida y se determinó la presencia de la His-PI3K con el anticuerpo anti-PI3K (figura 18). El anticuerpo detectó bandas de 60 y 93 kDa en el complejo proteico que se formó en ausencia de PLP. La proteína de 60 y 93 kDa disminuyó significativamente cuando el péptido se incubó previamente con las tres concentraciones de PLP utilizadas

(figura 18). En esta figura observamos que la banda de 60 kDa es más susceptible de ser desplazada por la PLP que la de 93 kDa ya que a una concentración de 1000 mM no se observa, en contraste la banda de 93 kDa aún puede pegarse al péptido a esta concentración de PLP. Resultados similares se obtuvieron cuando se realizaron los ensayos de competencia entre el péptido de la región de la Y72 y PLP (figura 19).

		C-Terminal		+		N-Terminal					
pfPhavu	118	NMIVERLGD	Y	LIEQGL	-GGG-	MS	W	QT	Y	VDDHLLCEI	15
pfArath1	118	NLVVERLGD	Y	LIESGL		MS	W	QT	Y	VDDHLMCDV	15
pfGlyma1	118	NMIVERPGD	Y	LIDQGY		MS	W	QT	Y	VDDHLLCDI	15
pfHevbr2	118	NMIVERLGD	Y	LIEQGY		MS	W	QT	Y	VDDHLMCEI	15
pfHevbr1	118	NMIVERLGD	Y	LIEQGM		MS	W	QT	Y	VDDHLLCEI	15
pfOrisa	118	NMVVERLGD	Y	LVEQGL		MS	W	QT	Y	VDDHLLCEI	15
pfZeama1	118	NMIVERLGD	Y	LLEQGL		MS	W	QT	Y	VDDHLLCEI	15
pfZeama4	118	NMIVERLGD	Y	LIEQGM		MS	W	QT	Y	VDDHLLCEI	15
pfArahy	118	NMIVERLGD	Y	LIDTGL		MS	W	QT	Y	VDDHLLCEI	15
pfLillo2	118	NMVVERLGD	Y	LYDQGF		MS	W	QT	Y	VDDHLMCEI	15
pfNicta	118	NMVVERIRD	Y	LVDQGL		MS	W	QT	Y	VDDHLMADI	15
Unión a PLP			Y				W		Y		

Figura 17. Dominio de interacción de la profilina con la Poli L-prolina (PLP).

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio de interacción con la PLP de la profilina de frijol (pfPhavu), isoforma 1 de arabidopsis (pfArath1), soya isoforma 1 (pfGlyma1), *Hervea braslenses*, isoforma 1 (pfHevbr2), *Hervea braslenses*, isoforma (pfHevbr1), arroz (pfOrisa), isoforma 1 de maíz (pfZeama1), isoforma 4 de maíz (pfZeama4), *Arachis hypogaea* (pfArahy), *Lilium longiflorum* (pfLillo2) y tabaco (pfNicta). Los residuos aromáticos involucrados en la unión a la PLP se indican en rojo. Esta secuencia es el péptido sintético que abarca del residuo 118 al 134 (C-terminal) unido por tres Gly y del residuo 1 al 15 (N-terminal).

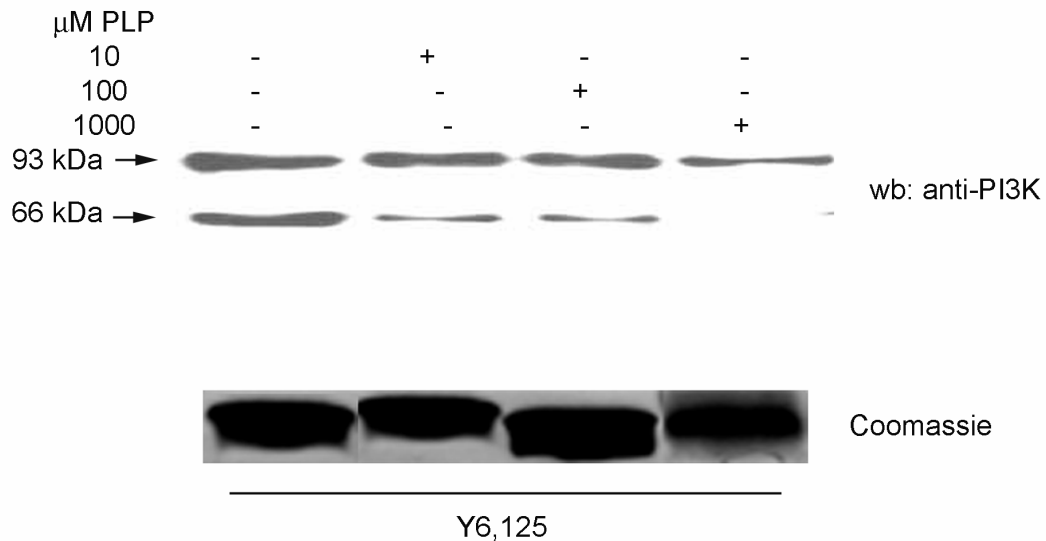


Figura 18. Inhibición de la interacción de la región amino y carboxilo Terminal de la profilina y la PI3K.

Análisis tipo “western blot” (wb) con el anticuerpo anti PI3K de las proteínas que se pegaron al péptido quimérico de profilina (Y6,125Y72). Los extractos totales de células de insecto se incubaron con el péptido en ausencia de PLP (-) o preincubados previamente con diferentes concentraciones de PLP (+). Las flechas indican las bandas de ≈93 y de 60 kDa detectadas por el anticuerpo anti-PI3K.

A continuación, se determinó la importancia que tiene cada una de las tirosinas en la interacción con la PI3K. Para detallar esta interacción se diseñaron péptidos que contenían la alfa hélice del amino que incluye el residuo de Y6 o del carboxilo terminal con el residuo Y125 y se comparó con los resultados obtenidos de la interacción con el péptido quimérico (C+N, Y6,125). Los péptidos inmovilizados se incubaron con los extractos totales obtenidos de la lisis de las células *Sf9* que expresan la His-P3K, las proteínas de los complejos proteicos se separaron en un gel de acrilamida y se determinó la presencia de la His-PI3K con los anticuerpos anti-PI3K en ensayos tipo

“western blot”. En la figura 20 podemos observar que la alfa hélice del amino terminal (Y6) no interacciona con la banda de 93 kDa y tienen muy poca afinidad por la banda de 60 kDa; por otro lado, la alfa hélice del carboxilo terminal presentó mayor afinidad que el amino terminal en el pegado a las dos bandas. Cuando se utilizó el péptido quimérico (C+N, Y6,125) se observó un incremento significativo en la afinidad por las dos bandas; sin embargo, la presencia de las dos tirosinas tiene un mayor efecto en la afinidad por la banda de 93 kDa. Estos resultados indican que la Tyr72 y el dominio de unión a PLP de la profilina interaccionan con la PI3K.

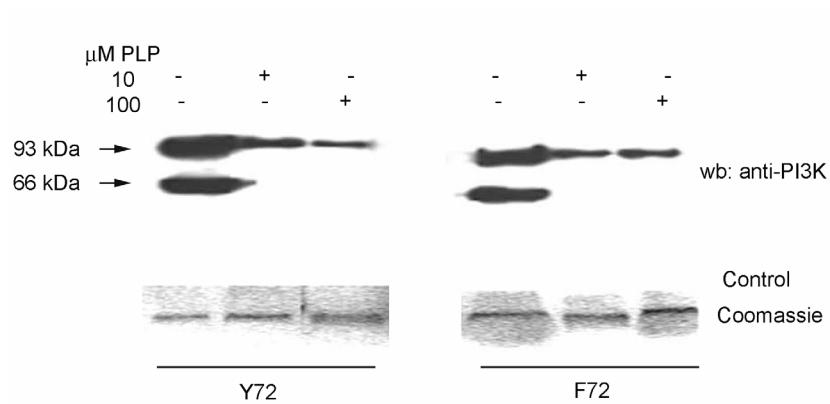


Figura 19. Inhibición de la interacción de la región de la Tyr72 de la profilina y la PI3K.

Análisis tipo “western blot” (wb) con el anticuerpo anti PI3K de las proteínas que se pegaron al péptido Y72 de profilina. Los extractos totales de células de insecto se incubaron con los péptidos en ausencia de PLP (-) o preincubados previamente con diferentes concentraciones de PLP (+). El recuadro inferior muestra la tinción con Coomassie del péptido utilizado en cada caso. Las flechas indican las bandas de ≈93 y de 60 kDa detectadas por el anticuerpo anti-PI3K.

Los resultados de competencia obtenidos en la interacción *in vitro* de la profilina y la PI3K mostraron que la interacción entre estas dos proteínas podría ser similar a la interacción que se da entre la profilina y la PLP; por lo que, la PI3K posiblemente presenta una secuencia rica en prolina. Esto se demostró posteriormente con un análisis de la secuencia de aminoácidos de la PI3K en donde se encontró que esta proteína tiene una secuencia rica en prolinas similar a la que se reporta en otras proteínas que interaccionan con la profilina y que son del tipo ZPPX (donde Z puede ser Pro, Gly o Ala; y X cualquier aminoácido hidrofóbico) (figura 21).

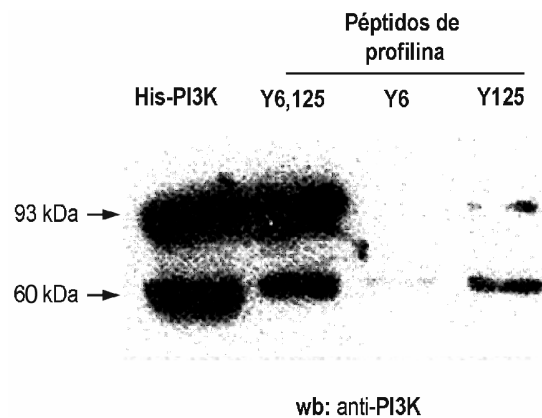


Figura 20. Interacción de las regiones amino y carboxilo terminal de la profilina con la His-PI3K de frijol.

Análisis tipo “western blot” (wb) con el anticuerpo anti PI3K de las proteínas pegadas a Iso péptidos Y6,125 (tirosina 6 mas tirosina 125, C+N), Y6 (tirosina 6), Y125 (tirosina 125) de la región del amino y carboxilo de profilina. Los extractos totales de las células de insecto que expresan la His-PI3K se incubaron con los diferentes péptidos. Las flechas indican las bandas de aproximadamente 93 y de 60 kDa que detecta el anticuerpo anti-PI3K.

POP	1229	DGEGTPVEHVRCF	QPPI	HQSLASS	1253
ROCK	1273	CEACMKPLWHMFK	PPPA	LECRRCHIKCHKD	1303
ROCK	1337	QKWVSRLVKKIPK	KPPA	PDPFARSSPRTSM	1367
Synapsin I	439	ALPLGRQTSQQPA	GPPA	QQRPPPQGGPPQP	469
Synapsin I	463	GGPPQPGPGPQRQ	GPPL	QQRPPPQGGQHL	493
Synapsin I	482	RPPPQGGQHL	GPPA	GSPLPQRLPSPTA	512
Synapsin I	527	QGRQSRPVAGGPG	APPA	ARPPASPSPPQQA	557
Synapsin I	532	RPVAGGPGAPPAA	RPPA	SPSPQRQAGPPQA	562
Synapsin I	631	TKPQLAQKPSQDV	PPPI	IAAAGGPPHPQLN	661
Dynamin-1	742	IGDINTTTVSTPM	PPPV	DDSWLQVQSVFAG	772
Dynamin-1	788	PPARPGSRGPAPG	PPPA	GSALGGAPPVPSR	818
Dynamin-1	799	APGPPAGSALGG	APPV	PSRPGASDPDFGP	829
PhavuPI3K	62	PFGLPTRRLEST	GPPF	CWNELITLTKYR	9
PhavuPI3K	686	DFGFILGRDPKPF	PPPM	KLCKEMVEAMGGA	716
			ZPPX		

Figura 21. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos del motivo ZPPX de la PI3K de frijol (PhavuPI3K) y de las proteínas que participan en tráfico vesicular en células animales.

Comparación las secuencias de aminoácidos de la PI3K de frijol (PhavuPI3K 1, PhavuPI3K 2) con las proteínas POP, ROCK, Sinapsina I y Dinamina, que participan en el tráfico vesicular. El recuadro rojo indica los dominios ZPPX, y el recuadro negro de la secuencia de PhavuPI3K indica la secuencia del péptido sintético utilizado para los ensayos de interacción.

Para demostrar que estos dos motivos participan en la interacción entre estas dos proteínas, se diseñó un péptido que contenía la secuencia rica en prolina de la PI3K y se realizó la interacción *in vitro* con la batería de péptidos que simulan los diferentes estados de fosforilación de la tirosina de la posición 72. Los péptidos Y72D, Y72F y Y72 se inmovilizaron en la resina de tiopropil sefarosa o en una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el péptido rico en prolina de la PI3K que previamente se marcó con biotina. La

interacción del péptido rico en prolina se determinó con la avidina acoplada a fosfatasa alcalina. La estreptavidina se ligó específicamente en los carriles que contenían a los péptidos Y72 y Y72F (Figura 22). Por lo tanto, la profilina interactúa con los motivos ricos en prolina, del tipo ZPPX, que se encuentran en la secuencia de aminoácidos de la PI3K.

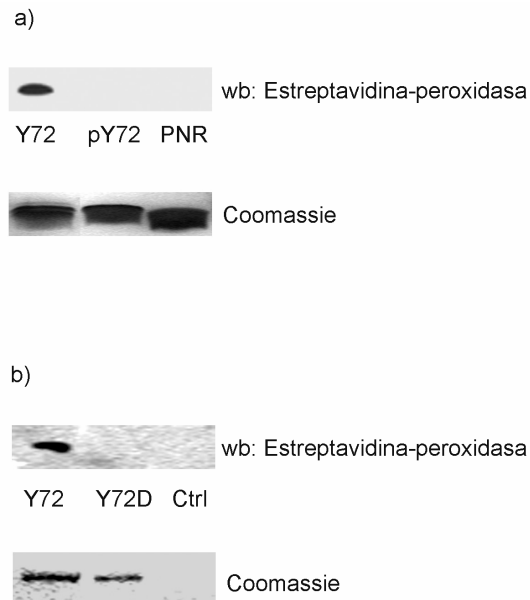


Figura 22. La Profilina interactúa con la PI3K a través de su motivo rico en prolina del tipo ZPPX.

a) A los péptidos sintéticos Y72, pY72 y PNR (péptido no relacionado) se fijaron a la resina de tiopropil sefarosa y se les adicionó el péptido rico en prolina de la PI3K que previamente se biotiniló. Este complejo se separó en un gel de acrilamida, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se reveló con estreptavidina acoplada a peroxidasa. En el panel inferior se observa la concentración de péptido utilizado en la interacción. **b)** Los péptidos de profilina de la región de la Tyr72 silvestre (Y72) y el péptido que se le cambió la Tyr72 por un aspártico (D72) se separaron en un gel de acrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con el péptido rico en prolina de PI3K previamente biotinilado. En el panel inferior se observa la concentración de péptido utilizado en la interacción.

Conservación del motivo ZPPX en las PI3K tipo III.

Se realizó la búsqueda de la familia de proteínas de la PI3K tipo III depositadas en la base de datos de proteínas de la SRS (<http://srs.ebi.ac.uk>). Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de todas las PI3K que se han secuenciado completamente y este alineamiento fue usado para generar el árbol molecular que se muestra en la figura 23 (Lim and Zhang, 1999); Thompson et al., 1997). Como podemos observar las secuencias de aminoácidos analizadas se agruparon de acuerdo a su orden taxonómico. Para determinar el grado de similitud de las cuatro subfamilias de la PI3K (plantas, animales, insecto/levadura y nematodos) se sacó del alineamiento de aminoácidos la región que comprendía al motivo ZPPX, la cual se representa adentro de los recuadros de la figura 23. El árbol molecular obtenido está compuesto por tres ramas las cuales reflejan exactamente la relación que existe entre la filogenia y la distribución del motivo ZPPX en las diferentes subfamilias analizadas. Los residuos P2 y P3 del motivo ZPPX están conservados en todas las secuencias de la PI3K analizadas; el residuo hidrofóbico (X) también está conservado en la secuencia de aminoácidos de las cuatro subfamilias aunque existe un cambio conservativo de una metionina por una leucina en la subfamilia de las PI3K de la levadura. El residuo de la posición Z es ocupado por un residuo de prolina en tres de las cuatro subfamilias analizadas y en la rama de las levaduras este residuo está cambiado por un residuo de fenilalanina, el cual es un aminoácido hidrofóbico y en esta posición se puede encontrar una Gly, Ala, Pro o un aminoácido cargado.

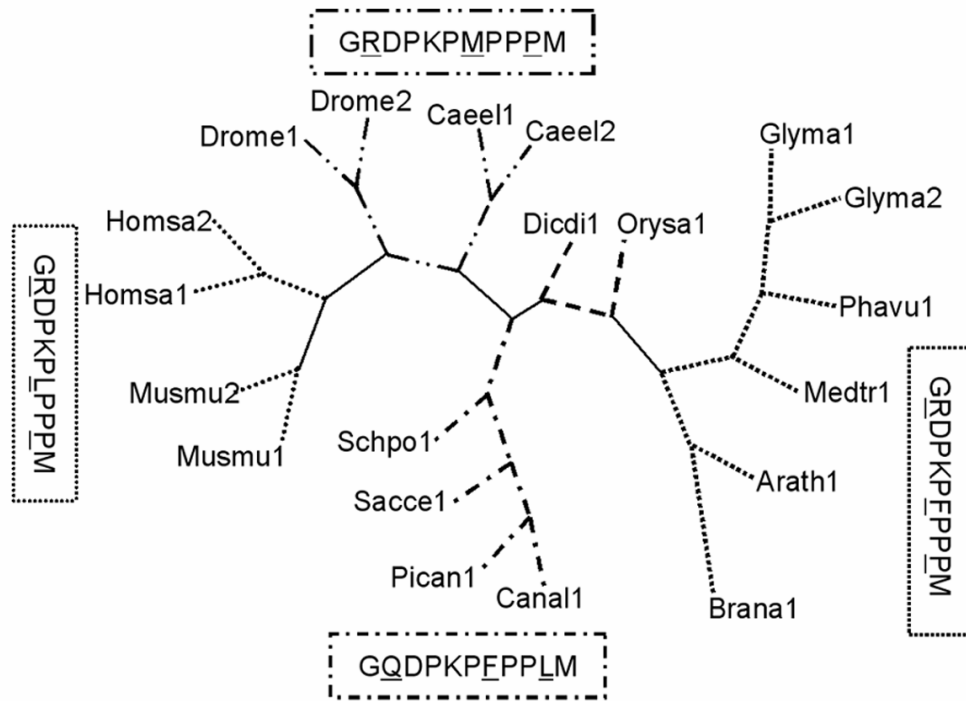


Figura 23. Árbol molecular de la familia de proteínas que comprende a la PI3K tipo III.

El árbol molecular se construyó con las secuencias de PI3K tipo III reportadas en las bases de datos (ver materiales y métodos). En los recuadros se indican las secuencias de los dominios ZPPX que se encuentra en las secuencias de amino ácidos de las PI3Ks de cada rama. Los residuos que son característicos de cada rama se indican con letras subrayadas. Este árbol filogenético se generó utilizando el programa PHYLIP.

DISCUSIÓN

La profilina es una proteína de 14 kDa que está organizada estructuralmente en tres dominios que le permiten la interacción con varias moléculas entre las cuales se encuentran la actina, el PIP2 y las proteínas que contienen regiones ricas en prolina. Desde hace muchos años se describió el papel que tiene la profilina en la regulación de la dinámica del citoesqueleto. Sin embargo, recientemente se ha visto que esta proteína también participa activamente en las rutas de señalización intracelular debido a que puede interaccionar con proteínas ricas en prolina (Drøbak, 2004). Los estudios de bioquímicos, de biología molecular y los ensayos de interacción *in vitro* han demostrado que la profilina se encuentra en los complejos proteicos que participan en la endocitosis y en el reciclaje sináptico (Birbach *et al.*, 2006), también se ha visto que está formando complejos con las proteínas que participan en la rutas de señalización de Rac y Rho (Gareus *et al.*, 2006). En plantas recientemente se demostró que profilina participa con moléculas como Rop (la Rac de plantas) en las reorganizaciones polares del citoesqueleto de actina, tales como el crecimiento del tubo polínico (Schutz *et al.*, 2006; Witke, 2004). Además la profilina se ha visto formando complejos en los sitios de adhesión focal y en el núcleo (Witke, 2004).

En plantas, se ha visto que la actividad de la PI3K está presente tanto en las fracciones solubles como en las fracciones insolubles, aunque se observa una mayor actividad en las fracciones membranales (Hong and Verma, 1994). A pesar de que el análisis de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA de la PI3K no revela la presencia de dominios transmembranales o secuencias consenso para la prenilación, miristilación o sitios de unión a

lípidos, y de que la PI3K de soya se detecta en la fracción soluble cuando se expresa en *E. coli* (Hong and Verma, 1994); en los nódulos de frijol la PI3K también se encuentra localizada en las fracciones de membrana asociadas al citoesqueleto (figura 4). Interesantemente, en estas fracciones la PI3K se encontró en un complejo proteico en donde la profilina está presente (figura 5).

En los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-profilina se demostró la presencia de la PI3K ya que el anticuerpo anti-PI3K reconoce una banda de 93 kDa la cual corresponde con el peso molecular de la proteína deducida de la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, los anticuerpos anti-PI3K (figura 5) utilizados en este estudio también reconocieron una banda de 60 kDa en los inmunocomplejos de profilina. El anticuerpo reconoció específicamente esta proteína de menor peso molecular y en mayor proporción que la proteína de 93 kDa. Estos resultados sugieren que la PI3K en nódulos de frijol es procesada, por una molécula que no es sensible a los inhibidores de proteasas empleados en todos los ensayos, ya que la presencia de la banda de 60 kDa fue consistente en todos los estudios realizados. En un estudio previo realizado en *Glycine max*, se demostró que la PI3K tenía actividad enzimática aún cuando se le escindiera un fragmento de 250 aminoácidos del extremo amino terminal. La falta de este fragmento da como resultado una proteína de ≈ 60 kDa la cual todavía mantiene la actividad catalítica de la enzima (Hong and Verma, 1994). Esto podría ser un mecanismo de regulación de la actividad de la PI3K de frijol sin embargo con estos experimentos no podemos concluir nada acerca de esto.

La ruta de transporte vesicular es un proceso complejo que requiere de etapas que dependen de la acción coordinada de muchas proteínas las cuales

se han visto que son altamente conservadas en todos los sistemas eucariota. Los estudios de proteómica realizados en *Sacharomyces cerevisiae* ha permitido la identificación de más de 40 proteínas que participan en transporte vesicular (VPS: yacuolar protein sorting) (Rothman *et al.*, 1989). Los estudios bioquímicos y de genética han establecido que la Vps15 que es una cinasa de Ser/Thr que recluta y activa a la proteína Vps34 (PI3K tipo III) en la membrana del aparato de Golgi durante el tráfico vesicular (Volinia *et al.*, 1995).

Se han descrito diferentes isoformas de PI3K en las células eucarióticas; sin embargo, en plantas solamente se ha descrito la cinasa de clase III la cual es homóloga a la arquetipo Vps34 que ha sido descrita en *Saccharomyces cerivisae*, la cual fosforila específicamente al fosfatidil inositol (PI) en la posición tres. La caracterización de la isoforma de la PI3K de las células vegetales indica que tienen una similitud estructural y de especificidad de sustrato de la Vps34 de levaduras (Hong and Verma, 1994). No obstante, no se conoce los mecanismos moleculares que participan en la activación de la PI3K en células vegetales.

Uno de los principales eventos que sucede durante la órgano génesis del nódulo es la proliferación de los sistemas de membrana, el cual es esencial para el establecimiento de la simbiosis que se da entre *Rhizobium* y las leguminosas (Hong and Verma, 1994). Para determinar el patrón de localización de la actividad de la PI3K en las diferentes membranas celulares se determinó la actividad de la PI3K en diferentes fracciones de membrana de los nódulos y de raíces de frijol así como en los núcleos. Se observó la actividad de la PI3K en todas los inmunocomplejos de profilina de las fracciones de membrana analizadas (Figura 10); esto sugiere que el complejo

de la profilina y la PI3K pueden tener un papel importante en la proliferación celular durante la biogénesis de las células del nódulo de frijol. En el proceso de infección de *Rhizobium* en las raíces de las plantas de frijol la síntesis de membrana, plasmática y peribacteriodal se incrementa considerablemente y la PI3K y la profilina podrían tener un papel importante participando activamente en tráfico vesicular para la formación de estas membranas durante la órgano génesis del nódulo. En plantas se tienen evidencias adicionales apoyadas en los resultados de inhibición del tráfico vesicular en la células BY2 cuando se adiciona wortmanina, inhibidor específico de la actividad de la PI3K, o cuando se expresa el dominio EBD (domino de unión a PI3P) fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (Kim *et al.*, 2001b).

Los análisis de interacción *in vitro* han permitido evidenciar que la profilina puede interaccionar con 27 proteínas que contienen regiones ricas en prolina (Witke, 2004). Posiblemente estas proteínas interaccionan con profilina a través de su dominio de unión a PLP el cual esta compuesto por las dos alfas hélices localizadas en el amino y en el carboxilo terminal (Witke, 2004). Los ensayos de interacción *in vitro* de la His-PI3K expresada en células de insecto demuestran que la interacción de la profilina y la PI3K es a través del dominio de unión a PLP ya que ésta interacción es inhibida en presencia de PLP (Figura 12 y 18). Adicionalmente, también demostramos que la profilina tiene otro dominio de interacción con PLP y éste se encuentra localizado en la región de la Tyr72. Esta región al igual que el otro dominio de unión a PLP es capaz de interaccionar con la PI3K (Figura 16 y 19). Este nuevo dominio de interacción a PLP consiste de tres residuos aromáticos (Tyr66, Tyr72 y Tyr106) espaciados de una manera similar en las que se encuentran los residuos

aromáticos del dominio de unión PLP (WX₂YX₂₇₋₃₀W) que se encuentran altamente conservados en todas las secuencias de las profilinas que se han reportado (Witke, 2004).

Previamente se demostró (Guillen *et al.*, 1999) que las diferentes isoformas de profilina presentes en los órganos de frijol son generadas por la fosforilación de residuos de tirosina, sugiriendo que la interacción de la profilina con la PI3K podría ser dependiente de la fosforilación de los residuos de tirosina localizados en los dominios de unión a regiones ricas en prolina. Se sintetizó una batería de péptidos que posteriormente se utilizaron en los ensayos de interacción *in vitro* con la His-PI3K. Los resultados obtenidos (Figura 16) demostraron que la PI3K no se une a los péptidos que contienen residuos ácidos y se pega específicamente a los péptidos silvestres (Y72 y C+N) y al péptido que mimetiza la no fosforilación del residuo de tirosina 72 y 6 (Y72F y Y6F) (Figura 16 y 20). En otras palabras, para que se favorezca el pegado de la PI3K a la profilina, las tirosinas, específicamente la tirosina 72 no debe estar fosforilada, indicándonos que la fosforilación en los residuos de tirosina regula la interacción de la profilina con otras moléculas. Este es un mecanismo de regulación que comúnmente ocurre en células animales, sin embargo en plantas actualmente no se han reportado, una regulación de este tipo, Estos resultados, en conjunto con los ensayos de competencia con PLP (Figura 18 y 19) indican que la profilina interacciona con los motivos ricos en prolina de la PI3K.

El dominio de interacción a PLP es similar a la conformación estructural de los dominios SH3 ya que tienen expuestos los aminoácidos aromáticos que participan en la interacción con las prolina del motivo rico en prolina. En 1999

Morrogh y colaboradores reportaron que la interacción entre el dominio SH3 de la proteína PSTPIP (proteína asociada a actina, que interacciona con la foafatasa, serina-treonina, por sus siglas en inglés) y el motivo rico en prolina de la cinasa Btk es inhibido por la fosforilación de los residuos de tirosina. Estos resultados nos indican que la fosforilación de los residuos de tirosina podría ser un evento común para la regulación de la asociación de las profilinas de plantas con proteínas con motivos ricos en prolina ya que estos residuos están altamente conservados en las isoformas de profilina vegetales. Otra observación, quizás la más importante, es el hecho que las diferentes isoformas de profilina generadas por la fosforilación de residuos de tirosina podrían tener diferentes funciones en la especificidad de la selección de los motivos ricos en prolina que se encuentran en las diferentes proteínas con las que interactúa. En los últimos años, ha sido plenamente demostrado que las isoformas de profilina exhiben diferentes patrones de expresión y cada una de ellas tienen diferente afinidad por los péptidos ricos en prolina (Witke *et al.*, 1998). Por ejemplo, en maíz las isoformas prof1, prof2 y prof3 (isoformas de clase I) se encuentran únicamente en polen mientras que las isoformas prof4 y prof5 (isoformas de clase II) son expresadas en los tejidos vegetativos (Kovar *et al.*, 2000). Además, las isoformas de clase II tienen mayor afinidad por PLP y secuestra más monómero de actina que las isoformas de profilinas de clase I. Y que la mutante de la isoforma prof1 (ZmPRO1-Y6F), que tiene un cambio de la tirosina en la posición 6 por una fenilalanina, mejoró su afinidad por PLP (Gibbon *et al.*, 1998). Estas cualidades determinadas *in vitro* correlacionan con la propiedad de estas isoformas *in vivo*, porque las isoformas de clase II rompen la arquitectura de la actina citoplásmica más rápidamente que las

isoformas de clase I (Kovar *et al.*, 2000). Si bien en frijol solamente se expresa un gen de la profilina en raíz y nódulos (vegetativo), se detectaron de dos a cinco isoformas de profilina que son generadas por fosforilación de residuos de tirosina, las cuales pueden estar mimetizando las propiedades bioquímicas de las cinco isoformas que se expresan diferencialmente en maíz. Aunque este tipo de modificación postraducional de la profilina no ha sido reportado en ningún otro organismo eucariota existe la posibilidad que cada una de los estados fosforilados de las tirosinas de la profilina puede realizar funciones distintas en frijol.

Con la identificación de varias docenas de proteínas que pueden interactuar con la profilina (Witke, 2004), es importante entender cómo la profilina puede lograr la especificidad para unir a las diferentes proteínas. Los residuos aromáticos del dominio de unión a PLP tiene una similitud estructural con los sitios de unión de los motivos ricos en prolina de los dominos SH3 (Thorn *et al.*, 1997). La fuerte similitud entre estos dominios implica que los dominios de unión a PLP pueden estar participando en la interacción con péptidos que contengan regiones ricas en prolina. Los dominios de unión a PLP se piensa que pueden unir específicamente a las proteínas que están implicadas en el tráfico de vesículas (Witke *et al.*, 1998) a través de sus motivos ricos en prolina.

En plantas se ha visto que la PI3K de tipo III está involucrada en la regulación de mecanismos tales como el transporte vesicular a vacuolas en células de tabaco, en el movimiento estomacal de inducido por ácido absísico, de células guarda de *Commelina communis* (Jung *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001a; Matsuoka *et al.*, 1995). Para comprobar que el nuevo dominio de la

región de la tirosina 72 interactúa con el motivo ZPPX localizado en el dominio catalítico de la PI3K se realizaron los ensayos tipo “far western” con el péptido que contenía este motivo de la PI3K y los péptidos de la profilina. El motivo ZPPX de la PI3K solamente se unió al péptido no fosforilado (Y72) (figura 22), lo cual sugiere que la PI3K puede formar complejos con la profilina de una manera dependiente del estado de fosforilación de los residuos de tirosina que están localizados en los dominios de unión a regiones ricas de prolina.

Los motivos ZPPX de las PI3Ks tipo III son altamente conservados a través de todo el reino eucarionte lo cual indica que las pequeñas diferencias en las secuencias de los motivos ZPPX probablemente refleja la conservación durante la evolución de funciones similares; como por ejemplo, la interacción de determinadas isoformas en las diferentes especies.

Esto puede tener gran importancia *in vivo* ya que en los diferentes tejidos de frijol (hoja, raíz, nódulos) generalmente se detectan las isoformas fosforiladas y las no fosforiladas son una fracción muy pequeña, lo que sugiere que la profilina libre para interactuar con la PI3K y otras posibles moléculas solo sucede de manera transitoria probablemente por la activación puntual de una fosfatasa de tirosina durante la señalización. Esto no es muy remoto ya que se sabe que las fosfatasas de tirosina se activan transitoriamente por el estado redox de la célula. Sería interesante suponer que al alterar la condición redox se pueda incrementar los niveles del complejo PI3K-profilina por la desfosforilación de las posiciones 72Y, 6Y y 125Y de la profilina. El uso de mutantes de profilina que alteran esta proporción será importante para aclarar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

Analizando en conjunto todos los resultados obtenidos en este trabajo de investigación podemos concluir lo siguiente:

- En *Phaseolus vulgaris* la profilina y la PI3K se encuentran preferencialmente en la fracción del citoesqueleto asociado a membranas.
- En *Phaseolus vulgaris* se encontró una PI3K de tipo III, con características farmacológicas semejantes a las PI3K encontradas en otras plantas y levadura.
- Con los ensayos de co-inmunoprecipitación demostramos que la profilina y la PI3K interaccionan *in vivo* en *P vulgaris*.
- Con una PI3K recombinante y en ensayos de interacción *in vitro* demostró que la PI3K interacciona con el dominio de unión a PLP que está formado por las alfa hélices del amino y carboxilo terminal.
- Con una PI3K recombinante y en ensayos de interacción *in vitro* se determinó que una secuencia de 13 a 15 aminoácidos (Y72) de la secuencia de profilina participa en la interacción con la PI3K.
- En ensayos *in vitro*, también se demostró que la fosforilación de la tirosina 72 de la secuencia de profilina inhibe la interacción con la PI3K.
- Un motivo rico en prolinas del tipo ZPPX, localizado dentro el dominio catalítico de la PI3K interviene en la interacción con la profilina.
- Parte de la PI3K está procesada (endoproteólisis) *in vivo* y es probable que la forma no procesada tenga una mayor afinidad por profilina.
- la interacción entre la profilina y la pi3k está regulada por la desfosforilación de la tirosina 72 en *phaseolus vulgaris*.

PERSPECTIVAS

- ✓ Se requiere realizar las construcciones de plásmidos binarios que contengan el cDNA de la PI3K fusionado al cDNA de alguna proteína fluorescente para poder expresar esta proteína de fusión en células de frijol y así poder determinar la localización subcelular de la PI3K.
- ✓ Es importante obtener plantas transgénicas que expresen el RNA de interferencia de la PI3K para determinar el efecto fenotípico por la ausencia de la enzima en los diferentes tejidos de frijol.
- ✓ De la misma manera es importante evaluar el fenotipo de las plantas de frijol transgénicas que se les inserto el plásmido binario que contiene el cDNA de la PI3K.
- ✓ Se requiere realizar las construcciones de plásmidos binarios que contengan el cDNA de la PI3K fusionado en el extremo amino y en el carboxilo una proteína fluorescente para que nos permita evaluar el procesamiento de la PI3K *in vivo*.
- ✓ Es importante continuar con los ensayos de interacción *in vitro* entre la profilina y los motivos ricos en prolina de la PI3K tipo III de diferentes organismos eucariota.
- ✓ Finalmente, es indispensable estudiar la regulación de la interacción entre la profilina y la PI3K *in vivo* para lo cual se requiere de un plásmido binario que contenga el cDNA de la profilina y de la PI3K, tanto silvestre como mutantes, para poder expresarlo en las células de frijol.

REFERENCIAS

- Alfarano, C., Andrade, C.E., Anthony, K., Bahroos, N., Bajec, M., Bantoft, K., Betel, D., Bobechko, B., Boutilier, K., Burgess, E., Buzadzija, K., Caverio, R., D'Abreo, C., Donaldson, I., Dorairajoo, D., Dumontier, M.J., Dumontier, M.R., Earles, V., Farrall, R., Feldman, H., Garderman, E., Gong, Y., Gonzaga, R., Grytsan, V., Gryz, E., Gu, V., Haldorsen, E., Halupa, A., Haw, R., Hrvojic, A., Hurrell, L., Isserlin, R., Jack, F., Juma, F., Khan, A., Kon, T., Konopinsky, S., Le, V., Lee, E., Ling, S., Magidin, M., Moniakis, J., Montojo, J., Moore, S., Muskat, B., Ng, I., Paraiso, J.P., Parker, B., Pintilie, G., Pirone, R., Salama, J.J., Sgro, S., Shan, T., Shu, Y., Siew, J., Skinner, D., Snyder, K., Stasiuk, R., Strumpf, D., Tuekam, B., Tao, S., Wang, Z., White, M., Willis, R., Wolting, C., Wong, S., Wrong, A., Xin, C., Yao, R., Yates, B., Zhang, S., Zheng, K., Pawson, T., Ouellette, B.F. and Hogue, C.W. (2005) The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update. *Nucleic acids research*, **33**, D418-424.
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M.J., Stein, R., Watton, S.J., Layton, M.J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J. and Waterfield, M.D. (1998) Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem*, **273**, 33082-33090.
- Arcaro, A., Zvelebil, M.J., Wallasch, C., Ullrich, A., Waterfield, M.D. and Domin, J. (2000) Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol*, **20**, 3817-3830.
- Bhargavi, V., Chari, V.B. and Singh, S.S. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase binds to profilin through the p85 alpha subunit and regulates cytoskeletal assembly. *Biochem Mol Biol Int*, **46**, 241-248.
- Birbach, A., Verkuy, J.M. and Matus, A. (2006) Reversible, activity-dependent targeting of profilin to neuronal nuclei. *Experimental cell research*, **312**, 2279-2287.
- Brown, B.K. and Song, W. (2001) The actin cytoskeleton is required for the trafficking of the B cell antigen receptor to the late endosomes. *Traffic*, **2**, 414-427.
- Carlsson, L., Nystrom, L.E., Lindberg, U., Kannan, K.K., Cid-Dresdner, H. and Lovgren, S. (1976) Crystallization of a non-muscle actin. *Journal of molecular biology*, **105**, 353-366.
- Cedergren-Zeppezauer, E.S., Goonesekere, N.C., Rozycki, M.D., Myslik, J.C., Dauter, Z., Lindberg, U. and Schutt, C.E. (1994) Crystallization and structure determination of bovine profilin at 2.0 A resolution. *J Mol Biol*, **240**, 459-475.

- Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P.** (1997) cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol*, **137**, 169-182.
- Christensen, H.E., Ramachandran, S., Tan, C.T., Surana, U., Dong, C.H. and Chua, N.H.** (1996) Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J*, **10**, 269-279.
- Dantan-Gonzalez, E., Rosenstein, Y., Quinto, C. and Sanchez, F.** (2001) Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 1267-1273.
- De Corte, V., Gettemans, J. and Vandekerckhove, J.** (1997) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specifically stimulates PP60(c-src) catalyzed phosphorylation of gelsolin and related actin-binding proteins. *FEBS letters*, **401**, 191-196.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. and Nosworthy, N.J.** (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, **83**, 433-473.
- Drøbak, B.K.F.-T., V.E. Staiger, C.J.** (2004) The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling *New Phytologist*, **163**, 13-30.
- Eads, J.C., Mahoney, N.M., Vorobiev, S., Bresnick, A.R., Wen, K.K., Rubenstein, P.A., Haarer, B.K. and Almo, S.C.** (1998) Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry*, **37**, 11171-11181.
- Evangelista, M., Zigmund, S. and Boone, C.** (2003) Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci*, **116**, 2603-2611.
- Fang, D., Wang, H.Y., Fang, N., Altman, Y., Elly, C. and Liu, Y.C.** (2001) Cbl-b, a RING-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-kinase for ubiquitination in T cells. *J Biol Chem*, **276**, 4872-4878.
- Fedorov, A.A., Ball, T., Valenta, R. and Almo, S.C.** (1997) X-ray crystal structures of birch pollen profilin and Phl p 2. *Int Arch Allergy Immunol*, **113**, 109-113.
- Fedorov, A.A., Fedorov, E., Gertler, F. and Almo, S.C.** (1999) Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nature structural biology*, **6**, 661-665.
- Fedorov, A.A., Pollard, T.D. and Almo, S.C.** (1994) Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **241**, 480-482.
- Fields, G.B. and Noble, R.L.** (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res*, **35**, 161-214.

- Gareus, R., Di Nardo, A., Rybin, V. and Witke, W.** (2006) Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 2803-2811.
- Gibbon, B.C., Ren, H. and Staiger, C.J.** (1997) Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function in vitro and in live cells. *Biochem J*, **327 (Pt 3)**, 909-915.
- Gibbon, B.C., Zonia, L.E., Kovar, D.R., Hussey, P.J. and Staiger, C.J.** (1998) Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell*, **10**, 981-993.
- Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N.N., Drobot, L.B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A.M., Waterfield, M. and Buchman, V.L.** (2000) Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *Embo J*, **19**, 4015-4025.
- Guillen, G., Valdes-Lopez, V., Noguez, R., Olivares, J., Rodriguez-Zapata, L.C., Perez, H., Vidali, L., Villanueva, M.A. and Sanchez, F.** (1999) Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *Plant J*, **19**, 497-508.
- Haarer, B.K., Petzold, A.S. and Brown, S.S.** (1993) Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol*, **13**, 7864-7873.
- Hansson, H., Mattsson, P.T., Allard, P., Haapaniemi, P., Vihinen, M., Smith, C.I. and Hard, T.** (1998) Solution structure of the SH3 domain from Bruton's tyrosine kinase. *Biochemistry*, **37**, 2912-2924.
- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Rieger, D., Lottspeich, F. and Schleicher, M.** (1991) *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci*, **100 (Pt 3)**, 481-489.
- Hilpela, P., Vartiainen, M.K. and Lappalainen, P.** (2004) Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr Top Microbiol Immunol*, **282**, 117-163.
- Hong, Z. and Verma, D.P.** (1994) A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9617-9621.
- Huang, S., McDowell, J.M., Weise, M.J. and Meagher, R.B.** (1996) The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol*, **111**, 115-126.
- Jiang, H., Sha, S.H. and Schacht, J.** (2006) Rac/Rho pathway regulates actin depolymerization induced by aminoglycoside antibiotics. *Journal of neuroscience research*, **83**, 1544-1551.
- Jimenez, C., Portela, R.A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Collard, J., Serrano, A., Martinez, A.C., Avila, J. and Carrera, A.C.** (2000) Role of the PI3K

regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol*, **151**, 249-262.

Jung, J.Y., Kim, Y.W., Kwak, J.M., Hwang, J.U., Young, J., Schroeder, J.I., Hwang, I. and Lee, Y. (2002) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell*, **14**, 2399-2412.

Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J. and Waterfield, M.D. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 615-675.

Kim, D.H., Eu, Y.J., Yoo, C.M., Kim, Y.W., Pih, K.T., Jin, J.B., Kim, S.J., Stenmark, H. and Hwang, I. (2001a) Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *The Plant cell*, **13**, 287-301.

Kim, H.M., Yim, H.G., Yoon, H.S., Park, S.T., Jeung, J.Y., Lee, K.N., Baek, S.H., Song, Y.S., Oh, G.J., Kim, N.S. and An, N.H. (2001b) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates proliferation of RAW 264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **23**, 355-365.

Kivens, W.J., Hunt, S.W., 3rd, Mobley, J.L., Zell, T., Dell, C.L., Bierer, B.E. and Shimizu, Y. (1998) Identification of a proline-rich sequence in the CD2 cytoplasmic domain critical for regulation of integrin-mediated adhesion and activation of phosphoinositide 3-kinase. *Mol Cell Biol*, **18**, 5291-5307.

Kost, B. and Chua, N.H. (2002) The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell*, **108**, 9-12.

Kovar, D.R., Drobak, B.K., Collings, D.A. and Staiger, C.J. (2001) The characterization of ligand-specific maize (*Zea mays*) profilin mutants. *The Biochemical journal*, **358**, 49-57.

Kovar, D.R., Drobak, B.K. and Staiger, C.J. (2000) Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell*, **12**, 583-598.

Krugmann, S., Hawkins, P.T., Pryer, N. and Braselmann, S. (1999) Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J Biol Chem*, **274**, 17152-17158.

Kwiatkowski, D.J. and Bruns, G.A. (1988) Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis. *J Biol Chem*, **263**, 5910-5915.

Larson, S.M. and Davidson, A.R. (2000) The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci*, **9**, 2170-2180.

- Li, S.S.** (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *The Biochemical journal*, **390**, 641-653.
- Lim, A. and Zhang, L.** (1999) WebPHYLLIP: a web interface to PHYLLIP. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **15**, 1068-1069.
- Linassier, C., MacDougall, L.K., Domin, J. and Waterfield, M.D.** (1997) Molecular cloning and biochemical characterization of a Drosophila phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*, **321 (Pt 3)**, 849-856.
- Lu, J. and Pollard, T.D.** (2001) Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Molecular biology of the cell*, **12**, 1161-1175.
- Mahoney, N.M., Janmey, P.A. and Almo, S.C.** (1997) Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol*, **4**, 953-960.
- Mahoney, N.M., Rozwarski, D.A., Fedorov, E., Fedorov, A.A. and Almo, S.C.** (1999) Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nat Struct Biol*, **6**, 666-671.
- Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T. and Takai, Y.** (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 86-89.
- Manseau, L., Calley, J. and Phan, H.** (1996) Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte. *Development (Cambridge, England)*, **122**, 2109-2116.
- Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N.V. and Nakamura, K.** (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol*, **130**, 1307-1318.
- McCurdy, D.W., Kovar, D.R. and Staiger, C.J.** (2001) Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*, **215**, 89-104.
- Metzler, W.J., Constantine, K.L., Friedrichs, M.S., Bell, A.J., Ernst, E.G., Lavoie, T.B. and Mueller, L.** (1993) Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: 1H, 13C, and 15N NMR assignments and global folding pattern. *Biochemistry*, **32**, 13818-13829.
- Molendijk, A.J. and Irvine, R.F.** (1998) Inositide signalling in Chlamydomonas: characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase gene. *Plant Mol Biol*, **37**, 53-66.
- Nakano, K. and Mabuchi, I.** (2006) Actin-capping protein is involved in controlling organization of actin cytoskeleton together with ADF/cofilin, profilin and F-actin crosslinking proteins in fission yeast. *Genes Cells*, **11**, 893-905.

- Nodelman, I.M., Bowman, G.D., Lindberg, U. and Schutt, C.E.** (1999) X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol*, **294**, 1271-1285.
- Ohta, Y., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P.** (2006) FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nature cell biology*, **8**, 803-814.
- Okkenhaug, K. and Vanhaesebroeck, B.** (2001) New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE*, **2001**, PE1.
- Ono, S., Mohri, K. and Ono, K.** (2004) Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments. *J Biol Chem*, **279**, 14207-14212.
- Pawson, T.** (1994) Tyrosine kinase signalling pathways. *Princess Takamatsu symposia*, **24**, 303-322.
- Pawson, T. and Nash, P.** (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes & development*, **14**, 1027-1047.
- Petrella, E.C., Machesky, L.M., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D.** (1996) Structural requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. *Biochemistry*, **35**, 16535-16543.
- Pollard, T.D. and Borisy, G.G.** (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**, 453-465.
- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripier, D. and Walter, U.** (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7956-7960.
- Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M. and Waterman-Storer, C.M.** (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol*, **5**, 599-609.
- Rothman, J.H., Howald, I. and Stevens, T.H.** (1989) Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, **8**, 2057-2065.
- Samaj, J., Baluska, F. and Hirt, H.** (2004) From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J Exp Bot*, **55**, 189-198.
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D. and Emr, S.D.** (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*, **260**, 88-91.

Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C. and Lindberg, U. (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*, **365**, 810-816.

Schutz, I., Gus-Mayer, S. and Schmelzer, E. (2006) Profilin and Rop GTPases are localized at infection sites of plant cells. *Protoplasma*, **227**, 229-235.

Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M. and Pawson, T. (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nature reviews*, **7**, 473-483.

Singh, S.S., Chauhan, A., Murakami, N. and Chauhan, V.P. (1996) Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry*, **35**, 16544-16549.

Skare, P. and Karlsson, R. (2002) Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett*, **522**, 119-124.

Sohn, R.H., Chen, J., Koblan, K.S., Bray, P.F. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1995) Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 21114-21120.

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. and et al. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, **72**, 767-778.

Sprinzak, E., Altuvia, Y. and Margalit, H. (2006) Characterization and prediction of protein-protein interactions within and between complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14718-14723.

Staiger, C.J., Goodbody, K.C., Hussey, P.J., Valenta, R., Drobak, B.K. and Lloyd, C.W. (1993) The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J*, **4**, 631-641.

Stephens, L., Cooke, F.T., Walters, R., Jackson, T., Volinia, S., Gout, I., Waterfield, M.D. and Hawkins, P.T. (1994) Characterization of a phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase from mammalian cells. *Curr Biol*, **4**, 203-214.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B. and et al. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, **269**, 690-693.

Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *The EMBO journal*, **17**, 6516-6526.

Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochemical and biophysical research communications*, **260**, 296-302.

- Sumoza-Toledo, A. and Santos-Argumedo, L.** (2004) The spreading of B lymphocytes induced by CD44 cross-linking requires actin, tubulin, and vimentin rearrangements. *J Leukoc Biol*, **75**, 233-239.
- Swoboda, I., Bhalla, P.L., Xu, H., Zhang, Y., Mittermann, I., Valenta, R. and Singh, M.B.** (2001) Identification of pronp1, a tobacco profilin gene activated in tip-growing cells. *Plant Mol Biol*, **46**, 531-538.
- Ten Klooster, J.P., Evers, E.E., Janssen, L., Machesky, L.M., Michiels, F., Hordijk, P. and Collard, J.G.** (2006) Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *The Biochemical journal*, **397**, 39-45.
- Thorn, K.S., Christensen, H.E., Shigeta, R., Huddler, D., Shalaby, L., Lindberg, U., Chua, N.H. and Schutt, C.E.** (1997) The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*, **5**, 19-32.
- Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A.L., Yin, H.L. and Wulfing, C.** (2003) Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol*, **171**, 2287-2295.
- Valenta, R., Duchene, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D. and Scheiner, O.** (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, **253**, 557-560.
- Vinson, V.K., Archer, S.J., Lattman, E.E., Pollard, T.D. and Torchia, D.A.** (1993) Three-dimensional solution structure of Acanthamoeba profilin-I. *J Cell Biol*, **122**, 1277-1283.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C. and Waterfield, M.D.** (1995) A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *The EMBO journal*, **14**, 3339-3348.
- Walsh, J.P., Caldwell, K.K. and Majerus, P.W.** (1991) Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9184-9187.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S.** (1997) p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J*, **16**, 3044-3056.
- Welters, P., Takegawa, K., Emr, S.D. and Chrispeels, M.J.** (1994) AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of Arabidopsis thaliana, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11398-11402.

- Witke, W.** (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, **14**, 461-469.
- Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C. and Mann, M.** (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *The EMBO journal*, **17**, 967-976.
- Wymann, M.P. and Pirola, L.** (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 127-150.
- Yarmola, E.G. and Bubb, M.R.** (2006) Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends in biochemical sciences*, **31**, 197-205.
- Yu, L.X., Nasrallah, J., Valenta, R. and Parthasarathy, M.V.** (1998) Molecular cloning and mRNA localization of tomato pollen profilin. *Plant Mol Biol*, **36**, 699-707.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P. and Lim, W.A.** (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE*, **2003**, RE8.