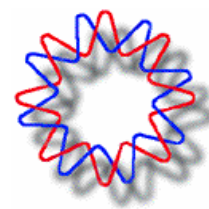




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



“MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA DE LA PROFILINA DE
PHASEOLUS VULGARIS”

TESIS
Para obtener el Grado
De Maestro en Ciencias Bioquímicas
P R E S E N T A
LIC. EN C. MARCOS AMED SALAZAR BLAS

TUTOR: DR. FEDERICO E. SANCHEZ RODRIGUEZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



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.

Contenido

ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Profilina.....	11
Fosfatidil inositol 3 cinasa	12
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Cepas bacterianas y plásmidos.....	25
Preparación de células electrocompetentes XL1-Blue y DH5- α	27
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
Purificación de ADN.....	30
RESULTADOS.....	31
Obtención de las distintas secuencias mutantes de la profilina.....	31
Obtención de un cDNA para generar un ARN de interferencia	33
Obtención de la construcción YFP2xFYVE.....	35
Recombinación con el vector binario	35
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS	38
ANEXOS.....	39
Composición y preparación de los medios de cultivo.....	39
Secuencia profilina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	40
Mapa del vector de entrada.....	41
Secuencia de la fusión YFP-2xFYVE-Tnos:.....	42
Mapa del vector binario.....	43
REFERENCIAS	44

ABREVIATURAS

PRM	Proline rich motif (motivo rico en prolina)
kDa	Kilodaltones
PLP	Poly-L-proline (poli L-prolina)
Tyr o Y	Tirosina
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico complementario)
Actina G	Actina globular
Actina F	Actina filamentosa
ABP	Actin binding protein (proteína de unión a actina)
ADF	Actin depolymerization factor (factor de depolymerización de actina)
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase (cinasa de la posición 3 del fosfatidil inositol)
VCP	Vaseline-containing protein
VPS	Vacuolar protein sorting (proteína de transporte vacuolar)
PI	Phosphatidil inositol (fosfatidil inositol)
PI3P	Phosphatidil inositol 3 phosphate
PI4P	Phosphatidil inositol 4 phosphate
PI(4,5)P ₂	Phosphatidil inositol 4,5 bisphosphate
PI(3,4)P ₂	Phosphatidil inositol 3,4 bisphosphate
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidil inositol 3,4,5 triphosphate
PAS	Preautophagosomal structure (estructura preautofagosomal)
PLC	Phospholipase C (fosfolipasa C)
PKC	Proteína cinasa C
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
Int	Integrasa
Xis	Excisionasa
IHF	Integration Host Factor (factor de integración al hospedero)
mM	Milimolar
pmol	Picomoles
RNAi	Ribonucleic acid interference (ácido ribonucleico interferente)
UTR	Untranslated region (región no traducida)
Clm	Cloranfenicol
Km	Kanamicina
D	Ácido aspártico
F	Fenilalanina

RESUMEN

La interacción entre proteínas juega un papel importante en una gran cantidad de procesos celulares. Muchas de estas interacciones son mediadas por dominios de reconocimiento entre secuencias específicas en las proteínas. Dentro de este grupo se encuentran aquellos que reconocen secuencias ricas en prolina (PRM, del inglés *proline rich motif*). La profilina es una proteína de bajo peso molecular (14 kDa) que fue inicialmente descrita por su capacidad de regular la polimerización de actina; pero además dentro de su estructura se han determinado dominios de unión a secuencias de poli L prolina (PLP), que forman parte del grupo de secuencias ricas en prolina y que este reconocimiento se da mediante residuos aromáticos expuestos. Los eventos de unión dirigen el ensamblaje y el movimiento de los complejos proteicos involucrados en la localización nuclear, dinámica del citoesqueleto, endocitosis y otras vías de señalización. El análisis bioquímico enfatiza la importancia de los residuos de tirosina de las posiciones 6 y 125 de la profilina en la unión a PLP y existe el antecedente de que estos y otros residuos de tirosina son fosforilados. Todo esto apoya la idea de que la fosforilación podría jugar un papel regulatorio relevante en diferentes procesos celulares durante la ontogenia de la raíz y nódulo de *Phaseolus vulgaris*. Para corroborar esta hipótesis se ha obtenido una batería de mutantes de profilina, mediante cambio de los residuos de tirosina de las posiciones 6 y 125 por residuos de ác. Aspártico y fenilalanina. Tales mutantes serán caracterizadas posteriormente mediante la generación de raíces peludas que sobreexpresen cada cDNA de la mutante de profilina en la simbiosis de *P. vulgaris* con *Rhizobium*.

ABSTRACT

Protein-protein interactions play a critical role in a wide range of cellular processes. Most of these interactions are mediated by peptide-peptide recognition modules. One particularly represented group of peptide-ligands consists of those that contain a proline-rich motif (PRM). Profilin is a small protein (14kDa) which was originally described as a regulator of actin polymerization. Within its structure, the PLP-binding domain, that resembles the PRM domains, exposes highly conserved aromatic residues to form a domain that binds proline-rich ligands. These binding events often direct the assembly and targeting of protein complexes involved in nuclear localization, cytoskeleton dynamics, endocytosis and other signaling pathways. Biochemical analysis has emphasized the predominant involvement of the profilin Y6 and Y125 positions with the PLP interaction and there is a fact that bean profilin is phosphorylated on tyrosine residues. This supports the idea that the phosphorylation could play an important regulatory role in different cellular processes during ontogeny of root-nodule in *Phaseolus vulgaris*. In order to verify this hypothesis we obtained a battery of profilin mutants and then we will generate hairy roots that over-expressed the cDNA of the profilin mutant in *P. vulgaris*.

INTRODUCCIÓN

El citoesqueleto de las células eucariontes es una estructura altamente dinámica, que permite una rápida adaptación de la célula a los diferentes estímulos a los que están expuestas; durante muchos años se pensó que participaba únicamente en la determinación de la forma celular y que era independiente de los mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, hoy en día está ampliamente establecido que participa en los procesos de señalización, ciclo celular, endocitosis, diferenciación y desarrollo. En la actualidad se sabe que está compuesto por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios; que en su conjunto forman una compleja y dinámica estructura, la cual hace posible que se lleven a cabo las diversas funciones celulares. Es importante mencionar que, aunque se les han asignado papeles separados a los distintos componentes del citoesqueleto, estos pueden estar altamente asociados en diversos procesos celulares; por ejemplo en fibroblastos se ha encontrado que, durante la migración celular, se requiere una elevada dinámica de formación de microtúbulos para obtener la distribución polarizada de las protuberancias celulares; sin embargo, estas estructuras también son dependientes de actina (Rodríguez *et al* 2003; Pollard and Borisy 2003). En estudios de Sumoza y Santos se sugiere 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 microfilamentos se forman a partir de la unión de monómeros de actina (actina globular o actina G) para dar lugar a la actina filamentosa (actina F). 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), así como 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 de los microfilamentos para responder de una manera rápida y eficaz, en cada uno de los diferentes procesos en los que están involucrados, está dada por la variedad de dominios presentes en la secuencia de la actina globular, así como los que se encuentran en la actina filamentosa (Dos Remedios *et al* 2003) para dar lugar a una regulación muy fina y precisa ya sea de la polimerización o de la despolimerización de la actina.

Actualmente se sabe que dicha regulación se lleva a cabo por la acción concertada de diversas proteínas que se conocen genéricamente como proteínas de unión a actina (*actin binding proteins* o ABPs, por sus siglas en inglés). Esta serie de proteínas actúan de distintas maneras sobre la polimerización o despolimerización de los cables de actina con la finalidad de coordinar los procesos celulares en los cuales están involucrados. 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 estructural y de composición molecular. La caracterización bioquímica de éstas proteínas ha permitido agruparlas de acuerdo a la acción que ejercen sobre la actina G o la actina F; de tal manera que se tienen proteínas que: 1) se unen a los monómeros de actina, es decir, secuestran la actina G y previenen la polimerización (por ejemplo, timosina $\beta 4$ y DNAsa I), 2) despolimerizan los filamentos de actina como por ejemplo la cofilina, 3) se unen a los extremos del filamento y los bloquean, por lo que evitan la adición de monómeros (tropomodulina y CapZ), 4) fragmentan los microfilamentos (gelsolina), 5) entrecruzan los cables de actina, ya que tienen dos sitios de unión a F-actina (Arp 2/3 y filamina), 6) estabilizan a los cables de actina, debido a que se unen a los costados del filamento y previenen la despolimerización (tropomiosina) y 7) actúan como motores moleculares como la miosina que se mueven a lo largo de los filamentos de actina (Dos Remedios *et al* 2003). En la figura 1 se encuentran representadas algunas de las proteínas de unión a actina y la acción que llevan a cabo en relación a los microfilamentos.

Es importante mencionar la acción conjunta de distintos tipos de ABPs sobre los cables de actina, que le permitirán a la célula que, de acuerdo a sus requerimientos, se lleve a cabo el crecimiento o el rompimiento de los microfilamentos. Por ejemplo, se ha demostrado la actividad sinérgica que tienen las proteínas factor de despolimerización de actina (*actin depolymerization factor* o ADF, por sus siglas en inglés) y la profilina a favor del proceso conocido como *treadmilling* de los filamentos (Didry *et al* 1998), interacción cuya relevancia queda ejemplificada en los estudios del crecimiento de la punta de la raíz en *Arabidopsis thaliana* (Kandasamy *et al* 2007).

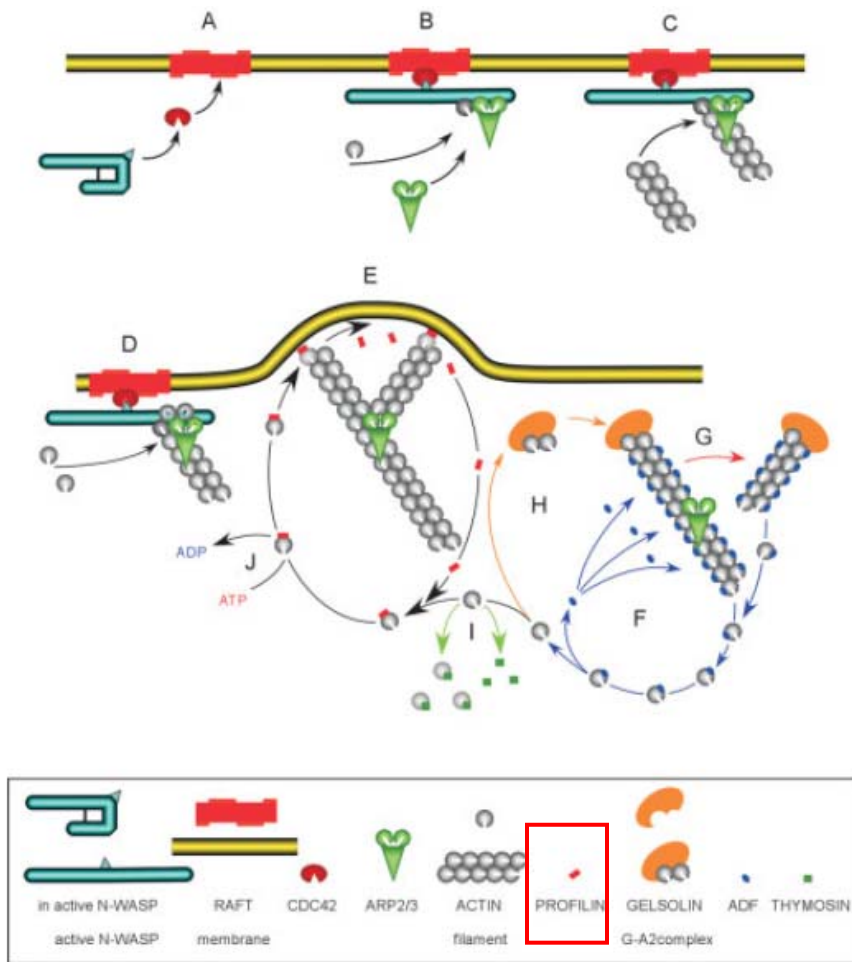


Figura 1. Representación de los mecanismos de acción de las ABPs. Las proteínas de unión a actina permiten el anclaje de la actina a la membrana celular a través de la proteína N-WASP y Arp2/3 (A-D): activación y orientación de N-WASP en la membrana plasmática. E: crecimiento del filamento ramificado mediante G-actina y la acción de la profilina sobre los monómeros, para promover su ensamblaje. F, G, H: Regulación de la dinámica de la actina en un lamelipodio por ADF y proteínas de protección del extremo del filamento (como la gelsolina, que forma complejos 1:2 con la G-actina). I: Secuestro de la actina por la timosina. J: Reciclamiento de G-actina mediante intercambio de nucleótidos. Dentro de este esquema cabe resaltar la acción de la profilina (recuadro rojo) como un elemento primordial para la regulación del ensamblaje de los cables de actina. Modificado de Carlier *et al* 2003.

Las ABPs, al igual que la mayoría de las proteínas de la célula, están organizadas estructuralmente en módulos que pueden ser dominios o motivos de interacciones moleculares o dominios con actividad catalítica y cuyos eventos de unión dirigen el ensamble y la localización de los complejos proteicos que están involucrados en el crecimiento celular, en la transcripción, en la señalización postsináptica y en la regulación de la dinámica del citoesqueleto (Witke *et al* 2004). Muchas de las proteínas relacionadas

con las cascadas de señalización intracelular contienen dominios que participan en el reconocimiento de regiones ricas en prolina (figura 2 y 3). Dentro de esta familia destacan los dominios SH2 y SH3 (homólogos a los dominios encontrados en la proteína Src), los primeros (SH2) unen a regiones con tirosinas fosforiladas, los otros (SH3) se unen a regiones ricas en prolina (figura 3). Se han determinado dominios con funciones similares, como son los WW (llamados así por los dos triptófanos altamente conservados en su secuencia) y los EVH1 (dominio 1 homólogo a Enabled/VASP, también es conocido como dominio 1 homólogo a VASP o WH1) (Zarrinpar *et al* 2003) (figura 3). En este grupo de dominios también se encuentra el dominio de unión a poli-L-prolina (PLP) de profilina, el cual contiene aminoácidos aromáticos expuestos en su estructura de una manera similar a otros dominios que unen regiones ricas en prolina (por ejemplo los dominios SH3). Este módulo fue descrito como un dominio que interactuaba con secuencias que contenían un mínimo de 5 prolina 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 prolina del tipo ZPPX (donde Z puede ser Pro, Gly o Ala; y X cualquier aminoácido hidrofóbico) (Witke *et al* 1998).

Profilina

Dentro de la familia de las profilinas se comparten propiedades bioquímicas y similitudes estructurales, con función conservada durante la evolución, sin embargo la identidad de aminoácidos es baja, incluso en isoformas de un mismo organismo. Inicialmente, la profilina fue identificada en plantas como un alérgeno (Valenta *et al* 1991) pero con el paso del tiempo se ha ido esclareciendo su papel en la célula, que serán mencionados más adelante. Estudios previos demostraron que se encuentra presente como una familia multigénica en muchas especies de plantas (Staiger *et al* 1997), donde se pueden encontrar múltiples isoformas, que presentan regulación temporal de su expresión o específica de tejido, como se demostró en estudios en maíz y en otras especies (Gibbon *et al* 1998). La profilina tiene un peso molecular de 12 a 15 kDa y se encuentra ampliamente distribuida en el citoplasma (Buss *et al* 1992). En su estructura, 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 (Fig. 4). Los estudios bioquímicos han permitido demostrar que esta proteína puede promover el intercambio de nucleótido (ADP a ATP) en los monómeros de actina liberados de los filamentos (Ballweber *et al* 1998). También se ha visto que puede favorecer la despolimerización de los microfilamentos cuando está en presencia de cofilina (Didry *et al* 1998); por otro lado, también se ha descrito como una proteína que inhibe la hidrólisis de ATP unido a actina, manteniendo de esta manera los monómeros en un estado donde éstos retienen su afinidad por el extremo barbado (+) del filamento (Ampe *et al* 1988) y se ha visto que promueve la polimerización mediante el transporte de monómeros hacia el extremo de crecimiento. Se han reportado una gran variedad de proteínas que reconocen 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), NWASP (Suetsugu *et al* 1998, 1999), dinamina I (Witke *et al* 1998), la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 cinasa (phosphatidylinositol 3 kinase o 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 intracelular y el citoesqueleto de actina.

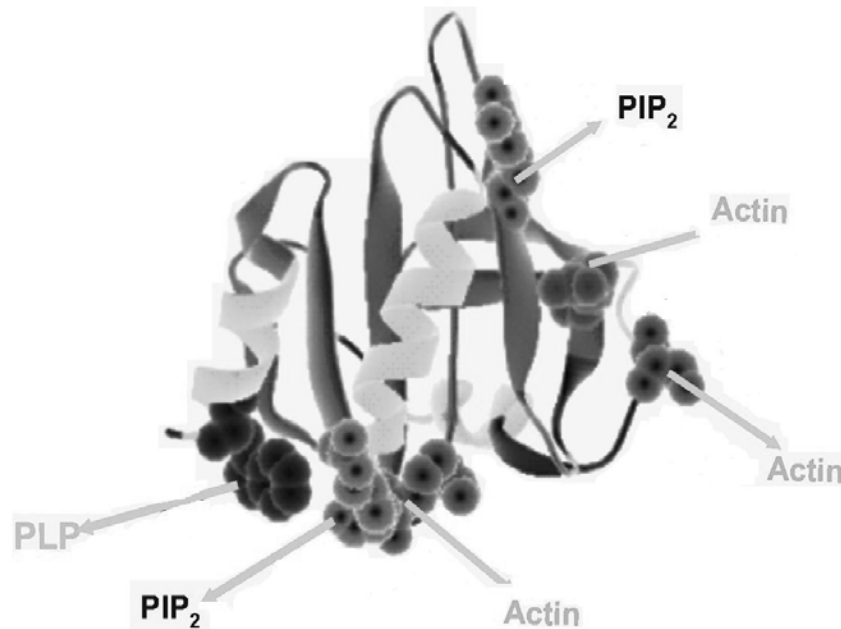


Figura 4. Estructura de la profilina. Representación de la estructura terciaria, mostrándose las alfa hélices y asas que conforman la estructura de la profilina; se resaltan los distintos dominios de interacción, como lo son los sitios de unión a actina, fosfoinosítidos y PLP. Imagen facilitada por Lucio Montero (Doctorado IBT, UNAM)

En mamíferos se ha encontrado que la profilina 1 está relacionada con el tráfico membranal, ya que se encuentra unida a proteínas aisladas de las vesículas provenientes del aparato de Golgi y además se involucra en el reclutamiento de dinamina 2 hacia este organelo (Dong *et al* 2000). En trabajos previos realizados en células de cerebro de ratón se ha descrito que la profilina participa en el proceso de endocitosis, ya que se demostró la interacción de la profilina 1 con clatrina y la VCP (por sus siglas en inglés, *vasoline-containing protein*); así como también se ha demostrado la interacción de la profilina 2 con la dinamina 1, la sinapsina y Nap1 (Witke *et al* 1998), las cuales están relacionadas con la endocitosis y el reciclaje de vesículas sinápticas.

Fosfatidil inositol 3 cinasa

Como ya se ha mencionado, la profilina además de estar relacionada con proteínas del citoesqueleto, también interactúa con diversas proteínas de las vías de señalización

celular y el tráfico vesicular. Una familia de proteínas particularmente importante son las cinasas del fosfatidil inositol cuyos productos, los polifosfoinosítidos, tienen gran relevancia como mensajeros intracelulares. La PI3K es una de las enzimas que regula los niveles de los fosfoinosítidos, 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 bisfosfato (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 5). En mamíferos existen tres clases de PI3 cinasas, las de la clase I tienen como sustratos: PI, PI4P y PI(4,5)P₂; los productos derivados de la acción de las enzimas sirven como señalizadores hacia tirosin cinasas (clase IA) o hacia receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (clase IB) (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). Se ha encontrado que las enzimas de la clase II son activadas por insulina e integrinas (Brown *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1998) y tienen de sustrato a PI y a PI4P. Las enzimas de la clase III sólo tienen al PI como sustrato y posiblemente sean las encargadas de la síntesis del mayor porcentaje PI3P utilizado por las células animales (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). En *Saccharomyces cerevisiae*, el producto del gen de copia simple VPS34 (del inglés *vacuolar-protein sorting*) codifica para una PI3K (Schu *et al.* 1993), que es la responsable de la generación de todo el PI3P, utilizando solamente al PI como sustrato. En plantas sólo se ha identificado la PI3K tipo III, la cual tiene alta identidad con la VPS34 de levadura (Welters *et al.* 1994). *Arabidopsis thaliana* sólo tiene un gen (Welters *et al.* 1994) y se han encontrado ortólogos en *Glycine max*, *Brassica napus* y *Medicago truncatula* (Das *et al.* 2005; Hernandez *et al.* 2004; Hong and Verma 1994).

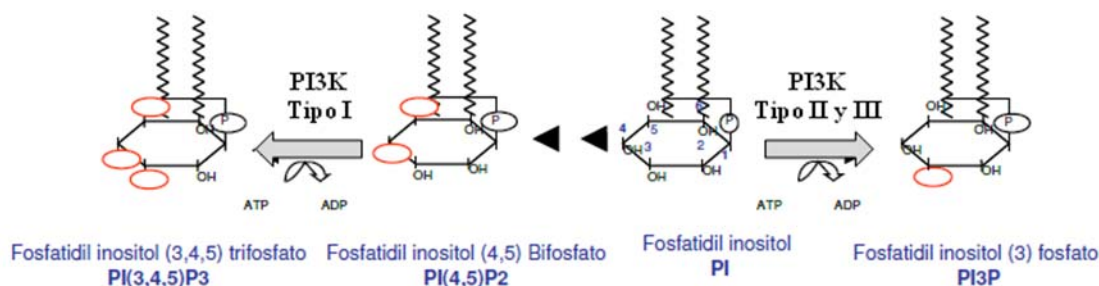


Figura 5. Actividad Bioquímica de la PI3K. Estructura química de los sustratos y productos de la actividad de la PI3K. En el sustrato fosfatidil inositol (PI), se muestran los carbonos numerados, en rojo la posición de los grupos fosfatos. Tomado de tesis doctorado Aparicio-Fabre, IBT, UNAM.

Se tienen estudios, en mamíferos, en los que se ha determinado que PI3K tipo III juega un papel en el movimiento de vesículas hacia la membrana plasmática (Wennstrom *et al* 1994). En levadura, VPS34 tiene un papel esencial en la endocitosis y el tráfico vesicular (Schu *et al* 1993), ya que las mutaciones en dicha proteína resultan en la falla para llevar proteínas hacia las vacuolas (Stack *et al* 1993). La expresión de un antisentido de AtVPS34 en *Arabidopsis thaliana* resulta en severos defectos en el crecimiento (Welters *et al* 1994), sugiriendo un papel crucial del PI3P y su síntesis. Además, plantas silenciadas en este gen no producen polen fértil, debido a defectos en la vacuola y en la división nuclear durante la meiosis (Lee *et al* 2008). Al examinar el polen, se observó un incremento significativo en el número de componentes citoplásmicos, lo cual indica un defecto en el transporte vacuolar y probablemente en la autofagia.

Además de llevar a cabo funciones de transporte vesicular, se sabe que PI3K es un componente fundamental en la autofagia, proceso importante para el reciclaje de proteínas y organelos, así como para la muerte celular programada; y que se ha venido incrementando su estudio en plantas, por ser la principal forma de muerte, como lo es en la respuesta a estrés por patógenos. De la maquinaria de formación de autofagosomas, la presencia de la PI3K se encuentra conservada entre los distintos organismos, desde levadura hasta plantas y mamíferos (Bassham *et al* 2006, Seay *et al* 2006). En levadura, un complejo formado por VPS34 y ATG6 (homólogo de beclina-1) se localiza en la estructura pre-autofagosomal (PAS, por su siglas en inglés *preautophagosomal structure*) y se

requiere de su actividad para el reclutamiento de los distintos componentes hacia el núcleo del sistema ATG9 (Xie *et al* 2007).

En plantas, estudios *in vitro* han demostrado que PI3K tipo-III interacciona con la profilina (Aparicio *et al* 2006); estudios posteriores mostraron que dicha interacción se ve afectada por el estado de fosforilación de algunos residuos de tirosina en la profilina. Estos resultados permiten sugerir un potencial papel de profilina como molécula reguladora de la actividad de PI3K, con la posibilidad de verla implicada en procesos de tráfico vesicular, autofagia y respuesta a patógenos. Con el afán de llevar a cabo estudios del seguimiento del PI3P, producto único de la PI3K de plantas, la identificación del dominio FYVE ha servido para dar un gran empuje al respecto. Ha sido nombrado FYVE ya que inicialmente fue encontrado en las proteínas Fab1p, YOTB, Vac1p y EEA1; está compuesto de una región rica en cisteínas que une dos iones de Zn, además contiene un motivo característico R(R/K)HHCRXCG (Corvera *et al* 1999; Stenmark *et al* 1996) y se une específicamente a PI3P (Burd and Emr, 1998; Gaullier *et al* 1998, 1999; Kutateladze *et al* 1999). Vermeer *et al* 2006 realizaron una construcción en la que unieron la proteína amarillo fluorescente (YFP por sus siglas en inglés) a un tándem de dos dominios FYVE y posteriormente determinaron su unión específica a PI3P en células vegetales, de tal manera demostraron tener un excelente biosensor para el estudio de PI3P en plantas.

ANTECEDENTES

Dentro de los estudios llevados a cabo a nivel de estructura de la profilina, se ha encontrado una alta similitud estructural entre las profilinas de los distintos organismos, sin que esto conlleve a una similitud a nivel de secuencia. De hecho la secuencia de amino ácidos está muy poco conservada. El extremo amino terminal es el que muestra mayor grado de conservación entre las distintas isoformas. Se sabe que tanto el extremo amino, como carboxilo terminal pueden unir a PLP, aunque recientemente se ha establecido una región más, que involucra un residuo de tirosina, en el caso de profilina de frijol, que también puede unir a PLP (Aparicio-Fabre *et al* 2006) (Fig. 6). Se ha determinado que en plantas, a diferencia de los hongos, los animales y los protistas, existen varios genes con alta divergencia que codifican para las diferentes isoformas de la profilina (Christensen *et al* 1996, Gibbon *et al* 1997, Gibbon *et al* 1998, Huang *et al* 1996, Staiger *et al* 1993). Con base al desarrollo de las plantas, las profilinas han sido divididas en dos clases de isoformas: las que se expresan vegetativamente y las específicas de polen. Las isoformas más divergentes de *Arabidopsis thaliana* (las isoformas vegetativas y polen específicas) tienen 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 isovariantes de profilina se manifiesta por sus diferencias en la afinidad por la actina y por la PLP (Gibbon *et al* 1997, Gibbon *et al* 1998). Las isoformas de la clase II tienen alta afinidad por PLP y secuestran más actina monomérica que las de la clase I. Por otro lado las profilinas de la clase I inhiben en mayor proporción la actividad de la fosfolipasa C (PLC) que las de la 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.

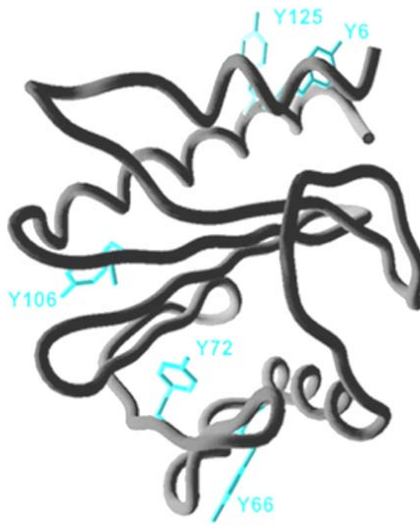


Figura 6. Estructura profilina. Representación de tubos múltiples con los átomos de Ca de la secuencia de profilina. Se resaltan los residuos de tirosina que permiten la unión a PLP. Tomado y modificado de Aparicio-Fabre *et al* 2006.

Además de la expresión diferencial de genes que codifican para la profilina, se ha demostrado en diferentes organismos otro nivel de regulación (modificación postraduccional). En vertebrados, la profilina puede ser fosforilada *in vitro* por la proteína cinasa C (PKC) (Hansson *et al* 1998; Singh *et al* 1996). En raíces de frijol, solamente un gen es expresado, sin embargo existen varias isoformas, las cuales son generadas a partir de distintos estados de fosforilación de la proteína (Guillen *et al* 1999) (figura 7). En trabajos previos del laboratorio se determinó que la profilina está fosforilada en residuos de tirosina (Tyr, Y) (Guillen *et al* 1999) (figura 8). A la fecha no se ha determinado qué enzima es la encargada de la fosforilación de tales residuos; sin embargo, Limmongkon *et al* 2004, demostraron en tabaco que la profilina es un sustrato de la NtMEK2.

Como se mencionó previamente, la profilina interactúa con proteínas relacionadas al tráfico vesicular. Para demostrar la interacción *in vitro* con la PI3K tipo III, se sintetizó un péptido quimérico que contenía las regiones amino terminal y carboxilo terminal de la profilina (figura 9a), que son dos regiones que se unen a PLP y que contienen dos tirosinas relevantes (las de las posiciones 6 y 125). Se determinó que hay una interacción directa entre ambas proteínas (figura 9b); además, debido a que se muestra una competencia por la unión al péptido al incrementar la concentración de PLP, se sugirió que *in vivo* podría darse

una regulación a través de este dominio por la unión con otras proteínas que contienen dominios ricos en prolina (Aparicio-Fabre *et al* 2006).

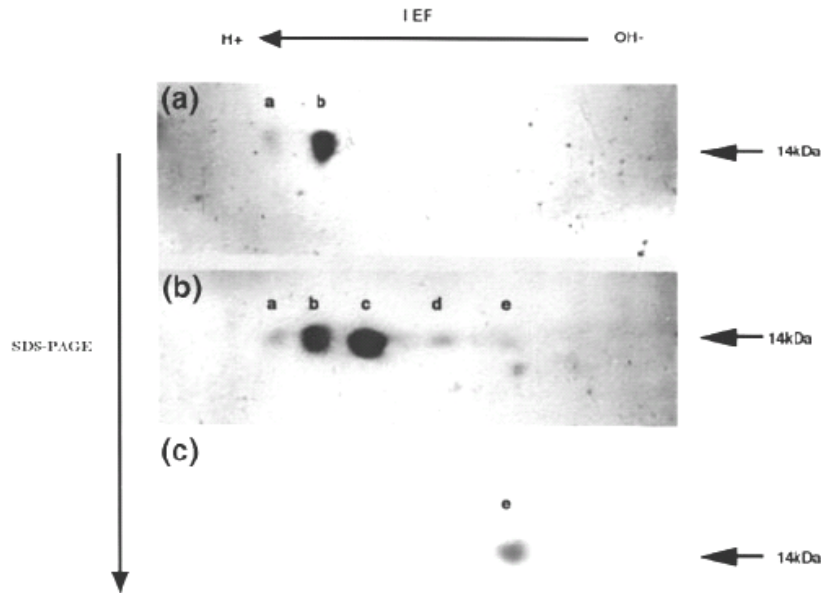


Figura 7. Análisis de las isoformas de profilina encontradas en nódulos de raíz de *Phaseolus vulgaris*. Las proteínas se extrajeron de raíz (a) y de nódulos de raíz (b), se prepararon y fraccionaron en un gel bidimensional y las distintas isoformas fueron detectadas por *immunoblot* mediante anticuerpos específicos de profilina. (c) El ARN polisomal extraído de nódulos de raíz fue traducido *in vitro* en lisados de reticulocitos de conejo que contenían 50 μ Ci de [35S]-metionina. La profilina fue inmunoprecipitada con anticuerpos antiprofilina, fraccionada por 2DPAGE, sujeta a fluorografía y expuesta a películas en rayos X. El gradiente de pH va de 4.0 a 6.5. Tomado de Guillen *et al.* 1999

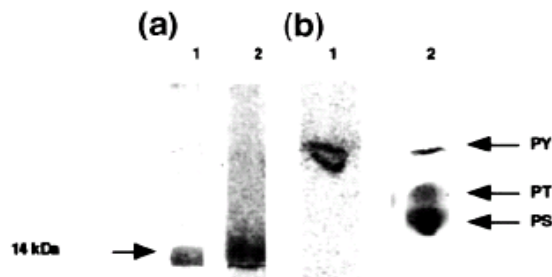


Figura 8. Fosforilación *in vivo* de la profilina. La profilina fue extraída de plántulas crecidas en medio sin fosfatos, adicionado con fosfato radioactivo. La proteína se detectó en el PhosphoImagen (panel a, carril 2) y una banda del mismo tamaño fue detectada con anticuerpos específicos (panel a, carril 1). Los fosfoaminoácidos de la proteína fueron separados (panel b, carril 1) y se determinó que eran residuos de tirosina mediante la comparación con fosfoaminoácidos comerciales (panel b, carril 2). Tomado de Guillen *et al.* 1999.

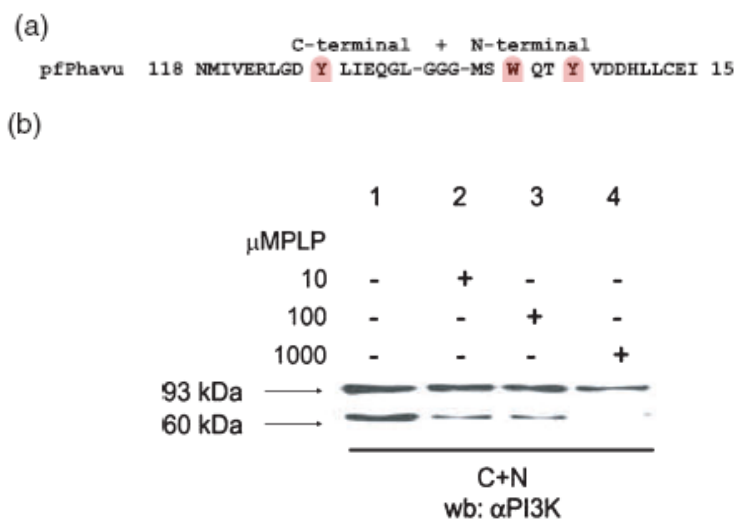


Figura 9. El dominio de unión a PLP interactúa *in vitro* con la proteína PI3K recombinante. (a) Secuencia del péptido quimérico formado por las regiones amino terminal y carboxilo terminal de la profilina de frijol, se resaltan en rojo los residuos aromáticos conservados en el dominio de unión a PLP. (b) Incubación con distintas concentraciones de PLP y posterior *Western blot* para determinar el efecto en la unión entre la profilina y la proteína recombinante His-PI3K. Tomado y modificado de Aparicio-Fabre *et al* 2006.

Para detallar esta interacción se diseñaron péptidos que contenían el amino terminal (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. La región carboxilo terminal presentó mayor afinidad que la región amino terminal en el pegado a las dos bandas. Cuando se utilizó el péptido quimérico se observó un incremento significativo en la afinidad por las dos bandas; sin embargo, la presencia de las dos tirosinas (cuando no están fosforiladas) tiene un mayor efecto en la afinidad por la banda de 93 kDa. Estos resultados indican que las Tyr 6 y 125 del dominio de unión a PLP de la profilina interactúan con la PI3K (figura 10).

La fosforilación del residuo de Tyr 72 en el dominio de interacción a PLP tiene un efecto negativo en la interacción de la profilina con una secuencia rica en prolinas localizada en el dominio catalítico de la PI3K de frijol (Figura 11). Estos resultados guardan similitud con los ensayos de interacción *in vitro* que se han hecho con la mutante de profilina Y6F de la isoforma 1 de maíz (Gibbon *et al* 1998), donde se mimetiza el estado no fosforilado del residuo de tirosina, donde se presentó un incremento en el pegado a PLP en un orden de magnitud, con respecto a la isoforma 1.

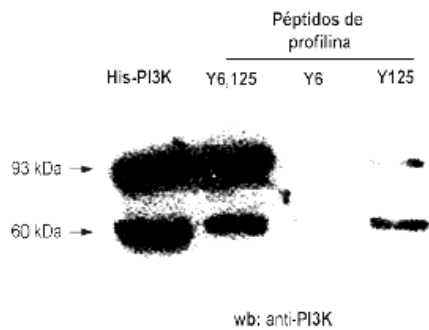


Figura 10. Interacción de las regiones amino y carboxilo terminal de la profilina con la HisPI3K de frijol. Análisis tipo western blot con el anticuerpo anti PI3K de las proteínas pegadas a los péptidos C+N, Y6, Y125 de la región del amino y carboxilo de profilina. Los extractos totales de las células de insecto que expresan la HisPI3K se incubaron con los diferentes péptidos. Las flechas indican las bandas de aproximadamente 93 y de 66 kDa que detecta el anticuerpo antiPI3K. Tomado de Aparicio-Fabre, tesis de doctorado.

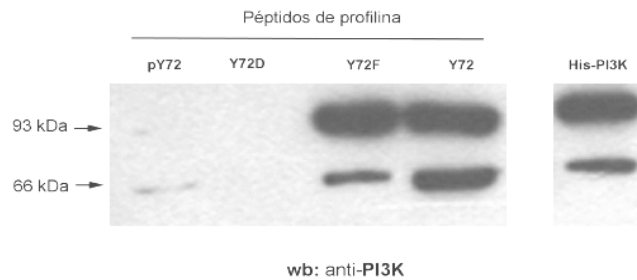


Figura 11. La PI3K interacciona con la región de la tirosina 72 de la profilina. Análisis tipo *western blot* con el anticuerpo anti PI3K de lo que se unió a los péptidos de profilina pY72 (tirosina 72 fosforilada), Y72D (cambio de tirosina 72 por un ácido aspártico), Y72F (cambio de la tirosina 72 por una fenilalanina) y Y72 (tirosina sin cambio). En el recuadro de la derecha se muestra la HisPI3K utilizada como control de carga. Las flechas indican las bandas de aproximadamente 93 y de 66 kDa detectadas por el anticuerpo antiPI3K. Tomado de Aparicio-Fabre, tesis de doctorado.

A partir de la secuencia del cDNA de la profilina de frijol (GI:556835) se llevaron a cabo los estudios bioinformáticos, con los cuales fueron identificados los residuos importantes para la interacción con PI3K, así como la relevancia de algunos de ellos. Con lo anterior se pudo determinar los 5 residuos de tirosina de la secuencia de la profilina (6, 66, 72, 106, 125) que son de gran importancia para la interacción, asimismo se determinó que esta asociación está afectada por el estado de fosforilación de tales aminoácidos, ya que se llevó a cabo la interacción *in vitro* entre las mutantes de profilina (Y72F, Y72D) con la PI3K (Aparicio-Fabre *et al* 2006). Estos resultados sugieren que la modificación postraduccional por fosforilación de los residuos de tirosina podría estar regulando la

interacción de profilina con regiones ricas en prolina. Las modificaciones ya sea por ácido aspártico o fenilalanina, simulando el estado fosforilado o defosforilado de la Tyr respectivamente, permitieron conocer la relevancia de estas posiciones en la unión por regiones ricas en prolina.

Como ya se mencionó anteriormente, la PI3K está involucrada (mediante su actividad en la generación de PI3P) en la dinámica de formación de vesículas, proceso que muestra un incremento de hasta dos órdenes de magnitud durante la internalización de bacterias del género *Rhizobium* en la interacción simbiótica con frijol. En uno de los primeros resultados que se desprenden del uso del biosensor YFP2xFYVE, para el seguimiento de PI3P, cuando este se expresa en nódulos se observó, que bajo el control de un promotor constitutivo (pGreen-35S-YFP-2xFYVE), dicho sensor interfiere en la internalización de las bacterias, ya que no se da la formación del hilo de infección o queda interrumpido su crecimiento (Figura 12A). Por otro lado, en los pocos casos en donde ocurre la formación de una estructura parecida a un nódulo, no ocurre la infección intracelular de *Rhizobium* (Figura 12B). Esto podría indicar que el biosensor está secuestrando el PI3P que se va generando para la formación de membrana, por lo que no le permite actuar durante la interacción de la bacteria con la planta.

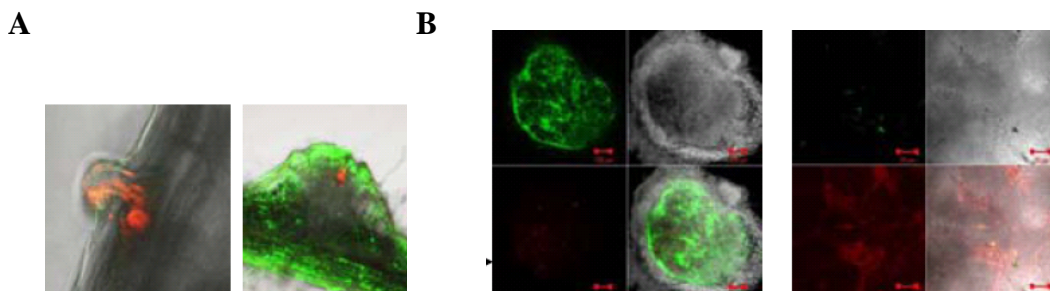


Figura 12. Microscopía del biosensor YFP2xFYVE en la simbiosis de *Phaseolus vulgaris* con *Rhizobium*. Para la infección se utilizaron bacterias de la cepa *Rhizobium etli* que expresan la proteína rojo fluorescente (DsRed) y que permite seguirlas durante el proceso de nodulación. A) En el panel izquierdo se muestra una infección sin la utilización del biosensor, se logra observar la manera en la que van avanzando las bacterias a través de la raíz; en el lado derecho se observa que con el uso del biosensor no se logra la formación del hilo de infección. B) En los paneles de la izquierda se observa la distribución homogénea de las bacterias, mientras que en los paneles de la derecha se logran ver ciertos puntos donde se concentran las bacterias (Estrada-Navarrete *et al*, datos no publicados).

JUSTIFICACIÓN

La profilina es una proteína ubicua cuya estructura presenta dominios que dan lugar a interacciones proteicas sumamente relevantes en distintos escenarios celulares. Por un lado se tiene un amplio conocimiento de su importancia en la polimerización de los filamentos de actina y poco a poco se ha venido elucidando la relevancia de su interacción con fosfoinosítidos, así como con proteínas que contienen regiones ricas en prolina. Para conocer la importancia de la profilina en la interacción con otras proteínas, se ha mostrado que la generación de mutantes ha sido una herramienta que permite un mayor entendimiento del papel de la proteína, por ello es que en el presente proyecto nos hemos planteado la necesidad de obtener mutantes de profilina en residuos de tirosina, del dominio de unión a PLP, para su posterior seguimiento durante la ontogenia del nódulo (en la asociación de profilina con PI3K), durante la relación simbiótica de frijol con *Rhizobium*.

HIPÓTESIS

La profilina tiene la capacidad de interactuar con gran variedad de proteínas relacionadas con la transducción de señales y el reordenamiento del citoesqueleto, por lo cual se le puede considerar como molécula reguladora de ambos procesos. La caracterización de mutantes de profilina en la interacción con PI3K permitirá tener un mejor conocimiento del mecanismo de acción de esta proteína en ambos procesos.

OBJETIVO GENERAL

Generar mutantes en residuos de tirosina de la posición 6 y 125 de la secuencia de la profilina de *Phaseolus vulgaris*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1 A partir del cDNA de profilina, generar distintas mutantes en los residuos de tirosina 6 y 125, por cambios a ácido aspártico o fenilalanina. Las mutantes a generar serán las siguientes: con cambio simple Y6D, Y6F, Y125D, Y125F y con cambio doble Y6DY125D, Y6DY125F, Y6FY125D y Y6FY125F.
- 2 Clonar cada una de las secuencias obtenidas, así como un RNA interferente (RNAi), en un vector binario que contenga un promotor inducible.
- 3 Clonar en un vector binario la construcción de YFP2xFYVE.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas bacterianas y plásmidos.

En este trabajo se utilizaron las cepas de *E. coli* XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-hsdR 17 supE44 relA1 lac* [F' *pro AB lacIqZΔM15Tn10 (Tetr)*]) (Stratagene^R), así como la cepa DH5-α (*F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal-phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*)(Invitrogen). Así como la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes*.

Los distintos cDNAs de profilina, así como el cDNA de la construcción YFP2xFYVE fueron insertados en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Anexo: vector de entrada), el cual permite una inserción unidireccional y genera resistencia a kanamicina en las bacterias portadoras. La mezcla de reacción para llevar a cabo la clonación al plásmido se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en el manual (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K240020>), considerando para nuestro caso la mitad del volumen final. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Se hizo una dilución del producto de PCR de interés, llevando a una concentración final de 1 a 5 ng/μl, se tomó 1 μl de esta dilución y se adicionaron 0.5 μl de agua destilada, 1 μl de una dilución 1:4 de solución salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) y finalmente 0.5 μl del vector (15-20 ng/μl).
2. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se incubó a -20 °C durante toda la noche.
3. Transformación de las bacterias (XL-1 blue o DH5α). Se llevaron a cabo los siguientes pasos:
 - a. Adicionar 2 μl de la mezcla de reacción antes descrita en un vial con células electrocompetentes.
 - b. Incubar a 4 °C por un lapso de 10 a 15 min.

- c. Transferir a una celda para dar choque eléctrico (1.6 V durante 10 seg) para inmediatamente transferir a 500 µl de medio S. O. C. (Anexo Composición de los medios de cultivo).
 - d. Incubar a 37 ° C con agitación durante una hora.
 - e. Tomar 150 µl del cultivo para sembrar en una placa de medio LB sólido (Anexo) adicionada con kanamicina 50 µg/ml (Kan 50), sembrar el resto del cultivo en una placa adicional con la misma concentración de antibiótico.
 - f. Incubar durante la noche a 37 °C.
4. Se comprobó cuales de las colonias contenían el inserto de interés mediante PCR de colonia.

Finalmente, se utilizó el vector destino pJCGLOX (Joubes *et al* 2004, Anexo: vector binario) como vector de expresión de las distintas construcciones en frijol. La reacción de recombinación, se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de la enzima LR clonasa (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/11791019>):

1. Adicionar a un tubo los siguientes componentes, a temperatura ambiente y mezclar:

Vector de entrada (50-150 ng)	1 µl
Vector destino (pJCGLOX) (150 ng/µl)	1 µl
Buffer TE, pH 8.0	completar 8 µl

Composición Buffer TE 10:1 Tris 10 mM, pH 8.0 llevado con HCl, EDTA 1mM. Para preparar 100 ml: 1 ml de tris 1 M (pH 8.0, HCl) y 0.2 ml EDTA (0.5 M) y aforar a 100 ml con agua destilada.

2. Mantener a 4 °C la mezcla de LR Clonasa, alrededor de 2 min y agitar con vórtex brevemente (2 seg), dos veces.

Nota. La mezcla de LR clonasa (Gateway[®] LR Clonase[™] II enzyme mix) está patentada, en su formulación se encuentran las proteínas de recombinación del bacteriófago lambda, las denominadas Integrasa (Int) y Excisionasa (Xis), así como la proteína de integración de *E. coli* (*Integration Host Factor* (IHF)) y un buffer de reacción.

3. Adicionar a cada muestra 2 μl de la mezcla de LR clonasa, para llevar a cabo la reacción de recombinación, mezclar brevemente en vórtex, dos veces. Centrifugar brevemente.
4. Incubar la mezcla de reacción a 25 °C durante 1 hr.
5. Adicionar 1 μl de proteinasa K (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a cada muestra para terminar la reacción. Agitar brevemente en vórtex.
6. Incubar las muestras a 37 °C durante 10 min.
7. Proceder a la transformación de células de *Agrobacterium* de la cepa K599 electrocompetentes, como se describió anteriormente con las cepas XL1- blue y DH5- α , solo modificando la temperatura de incubación a 30 °C.

Preparación de células electrocompetentes XL1-Blue y DH5- α

Se inocularon 400 ml de medio LB con 1/100 v/v de un pre-cultivo saturado de células XL1-Blue o DH5- α . Las células se cultivaron a 37 °C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) de entre 0.5-0.8, se mantuvieron a 4°C durante 30 min y se centrifugaron a 4026 g por 15 min. Posteriormente, se recuperó la pastilla en 250 ml de agua destilada, fría, estéril (colocándola cuidadosamente para no romper las células), y se centrifugó de nueva cuenta a la velocidad antes mencionada. Se recobró la pastilla y se resuspendió en 100 ml de agua fría. Se centrifugó por última vez, la pastilla obtenida se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10%, se prepararon alícuotas de 50 μl y se almacenaron a -70 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la tabla 1 se muestran los distintos oligonucleótidos que se diseñaron y se sintetizaron para la obtención de las secuencias de interés, cada par utilizado fue probado mediante PCR en gradiente para determinar la temperatura óptima de hibridación (*annealing*). Posteriormente se llevó a cabo el PCR con la combinación de oligonucleótidos y las temperaturas requeridas para cada secuencia.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
Prof Fwd	CAC CAT GTC GTG GCA AAC GTA CG
Prof Rev	<i>TTA GAG ACC CTG TTC AAT GAG ATA ATC ACC</i>
Y6F	CAC CAT GTC GTG GCA AAC <u>GTT CGT</u> CG
Y6D	CAC CAT GTC GTG GCA AAC <u>GGA CGT</u> C
Y125F	<i>TTA GAG ACC CTG TTC AAT GAG</i> <u>AAA</u> ATC ACC
Y125D	<i>TTA GAG ACC CTG TTC AAT GAG</i> <u>ATC</u> ATC ACC
RNAi FWD	CAC CCG GAA GAA ATA ACT GGG ATC
RNAi REV	CTT TCT TCA CTA CAC GCA GAT
ProfInt5'	TTA ATG AGC CTG GAA CAC TTG C
ProfInt3'	GCA AGT GTT CCA GGC TCA TTA A
YFPFwd	CAC CAT GTC CAA GGG CCA GG
FYVERev	ATA GAA TAC AAG CTT GGG CTG CAG

Tabla 1. Oligonucleótidos para amplificar las distintas secuencias mutantes y el cDNA que se utilizará para construir el vector que exprese el RNAi en plantas. En negrita se indica la secuencia agregada a los oligos 5' para permitir una clonación unidireccional en el vector de entrada. En cursiva se indica al codón de inicio (ATG) o al de paro (TTA). Subrayado se indican los codones que darán lugar al cambio de aminoácido, por ácido aspártico (GAC o ATC) o fenilalanina (TTC o AAA)

Obtención de las distintas mutantes de profilina.

Se llevó a cabo el PCR para la obtención de cada mutante, quedando la mezcla de reacción de la siguiente manera:

Agua destilada	17.5 µl
Buffer Pfu 10 X (+MgSO ₄)	2.5 µl
dNTPs (2 mM)	1 µl
Oligo 5' (10 pmol)	1 µl
Oligo 3' (10 pmol)	1 µl
cDNA Profilina	0.5 µl
Enzima Pfu 2.5 u/µl (Fermentas)	0.5 µl
Volumen final 25 µl	

Composición Buffer Pfu 10X (+MgSO₄): 200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA, Triton X-100 1% (v/v), 20 mM MgSO₄

El programa a seguir fue el siguiente:

	1 ciclo	95 °C	3 min
25 ciclos	{	95 °C	30 seg
		** Temperaturas	30 seg
		72 °C	30 seg
	1 ciclo	72 °C	7 min
** Temperatuas	Y6D y Y125D		55 °C
	Y6F y Y125F		64 °C
	Y6DY125D, Y6DY125F,		
	Y6FY125D y Y6FY125F		56 °C

Obtención de la construcción YFP2xFYVE.

A partir de la secuencia enviada por el Dr. Vermeer (Anexo: secuencia de la fusión YFP-2xFYVE-Tnos), se diseñaron oligonucleótidos para obtener sólo la región de interés (YFP2xFYVE) (Tabla 1), que sería clonada al vector de entrada. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Agua destilada	17.5 µl
Buffer Pfu 10 X (+MgSO ₄)	2.5 µl
dNTPs (2 mM)	1 µl
Oligo YFP Fwd (10 pmol)	1 µl
Oligo FYVE Rev (10 pmol)	1 µl
Plásmido FYVE (5 ng/µl)	0.5 µl
Enzima Pfu 2.5 u/µl (Fermentas)	0.5 µl
Volumen final 25 µl	

El programa a seguir fue el siguiente:

	1 ciclo	95 °C	3 min
25 ciclos	}	95 °C	30 seg
		58 °C	30 seg
		72 °C	90 seg
	1 ciclo	72 °C	7 min

Purificación de ADN

Todas las purificaciones fueron hechas a temperatura ambiente y se utilizaron de 3 a 6 ml de cultivo de bacterias en medio LB para la purificación de plásmidos. Los pasos de centrifugación se hicieron a 12000 x g. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1. Resuspender el botón de células en 250 µl de solución de resuspensión. Transferir la suspensión de células a un tubo para microcentrífuga.
2. Adicionar 250 µl de solución de lisis y mezclar invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces hasta que la suspensión se vuelva clara y viscosa. **Nota.** No agitar con vórtex para evitar el rompimiento del ADN cromosomal. No incubar por más de 5 min para evitar la desnaturalización o superenrollamiento del plásmido.
3. Adicionar 350 µl de solución de neutralización y mezclar de inmediato, invirtiendo de 4 a 6 veces el tubo. **Nota.** Es importante mezclar considerablemente después de la adición de la solución de neutralización, para evitar precipitación del ADN bacteriano.
4. Centrifugar durante 5 min y transferir el sobrenadante a una columna GeneJET. Evitar tomar el precipitado blanquizco.
5. Centrifugar por un minuto. Descartar el líquido que pasó por la columna.
6. Adicionar 500 µl de solución de lavado a la columna de GeneJET. Centrifugar de 30 a 60 seg y descartar el líquido que atravesó por la columna. Repetir el paso.
7. Descartar el líquido y centrifugar por un min para remover posibles residuos.
8. Transferir la columna GeneJET a un tubo nuevo. Adicionar 50 µl de buffer de elución a la membrana de la columna para eluir el DNA. Incubar por 2 min.
9. Descartar la columna y almacenar el DNA purificado a -20°C.

RESULTADOS

Obtención de las distintas secuencias mutantes de la profilina

Se procedió al diseño de oligonucleótidos para generar mediante PCR (del inglés *polymerase chain reaction*) las distintas mutantes, con cambios de las tirosinas 6 y 125. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de la secuencia de nucleótidos del cDNA de profilina (ACCESSION X81982).

Los cambios puntuales para generar el cambio de codón de Tyr por Phe o por Asp se realizaron en la secuencia de los oligonucleótidos ya que la Tyr 6 y Tyr 125 se encuentran localizadas en los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente (Tabla 1). A los oligonucleótidos que contienen el codón de inicio de la traducción se les adicionó la secuencia CACC para poder clonar el producto de PCR de una manera unidireccional en el vector pENTR/D-TOPO (Anexo mapa del vector de entrada). Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del cDNA de profilina mutante usando la combinación de pares de oligos del extremo 5' y 3' de la secuencia de cDNA de la profilina (Tabla1). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1%, se comparó el tamaño con un marcador comercial de peso molecular y se observó una banda de aproximadamente 400 pb que corresponde al peso molecular calculado teóricamente (figura 13). Por lo que ya se cuenta con las distintas secuencias que tienen los cambios de una Tyr por una Phe o un Asp en las posiciones 6 y 125 (Y6D, Y6F, Y125D, Y125F) y las que tienen la combinación de los cambios (Y6D125D, Y6D125F, Y6F125F y Y6FY125D).

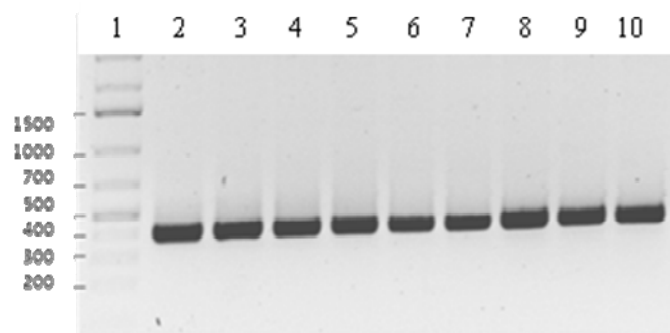


Figura 13. Productos de PCR de las distintas mutantes generadas. Carril 1: Marcador de pesos moleculares (pb) (Fermentas). Carril 2: Control profilina silvestre. Carril 3 al 10: mutantes Y125D, Y6D, Y125F, Y6F, Y6DY125F, Y6DY125D, Y6FY125D y Y6FY125F, respectivamente.

Cada cDNA mutante de profilina fue clonado en el vector de entrada pEntr/D-TOPO (materiales y métodos), las colonias que resultaron positivas (corroborado por PCR

de colonia) fueron crecidas en medio LB líquido adicionado con Kan 50, incubadas durante una noche en agitación, para posteriormente llevar a cabo la purificación de plásmido de acuerdo al kit comercial GeneJET plasmid miniprep (Fermentas) (materiales y métodos). Finalmente, se midió la concentración del plásmido, mediante Nanodrop, se tomó la cantidad requerida para enviar a secuenciación cada muestra, con la utilización de los oligonucleótidos M13 *Forward* (M13Fwd) y *Reverse* (M13 Rev).

En estudios previos donde se llevó a cabo la expresión de profilina se incluyó el primer intrón (Jeong *et al.* 2006), ya que mejoraba la eficiencia de la sobreexpresión contener supuestamente un potenciador (enhancer). Por tal motivo, se procedió a amplificar el gen completo de la profilina y posteriormente tomar el primer intrón. A partir de DNA genómico de *Phaseolus vulgaris*, se llevó a cabo una reacción de PCR con los oligonucleótidos ProfFwd y ProfRev (Tabla 1, materiales y métodos), con esto se obtuvo el gen completo de profilina, cuyo tamaño aproximado es de 1500 pb, el producto fue enviado a secuenciación. Ya que nuestro interés estaba enfocado en el primer intrón, el cual se ubica entre los aminoácidos 41 y 42 de la profilina y consta de alrededor de 408 nucleótidos, se diseñaron oligonucleótidos internos (Tabla 1) para que, utilizando como templado el producto de PCR del gen completo, pudiéramos obtener un fragmento de la región 5' que contenga al primer intrón y, utilizando como templado el cDNA de profilina, obtener un fragmento de la región 3' que complete nuestra secuencia (Figura 14).

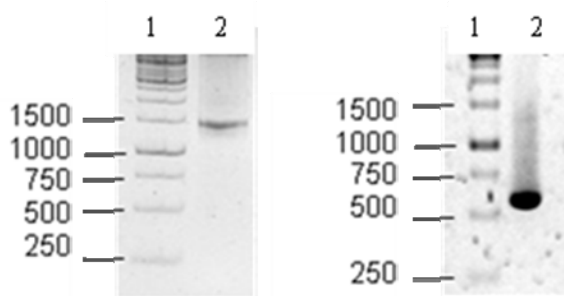


Figura 14. Fragmento de la región 5'. A) Producto de PCR obtenido utilizando los oligonucleótidos ProfFwd y ProfRev, utilizando DNA genómico como templado. B) Producto obtenido utilizando como templado el producto de per del gel mostrado en A, utilizando los oligos ProfInt3' y ProfFwd. El fragmento es de aproximadamente 600 pb, por lo que se deduce que el intrón consta de alrededor de 400 pb.

Cada fragmento obtenido fue clonado en el vector pJET/Blunt. Se transformaron bacterias de la cepa XL-1 Blue, y se realizaron reacciones de PCR en colonia para corroborar que contuvieran el plásmido con el inserto requerido; se obtuvo una eficiencia de colonias que contenían al inserto mayor al 70%. Posteriormente se purificó plásmido que se utilizó como templado para obtener productos de PCR de ambas regiones (figura 15) que a su vez servirán como templado para generar la secuencia codificante completa de la profilina, con el primer intrón incluido.

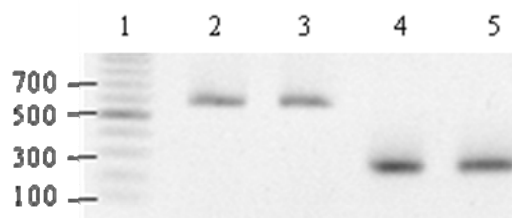


Figura 15. Productos de PCR de los extremos 5' y 3'. Carril 1, marcador de pesos moleculares (cada 100pb). Carriles 2 y 3, productos de PCR utilizando como templado el plásmido que contiene la región 5' de la profilina y que incluye al primer intrón del gen. Carriles 4 y 5, productos de PCR que contienen el fragmento 3' de la profilina y que completa la secuencia de la profilina. Los productos de PCR fueron purificados del gel para ser utilizados como templado posteriormente.

Obtención de un cDNA para generar un ARN de interferencia

Se amplificó el fragmento de cDNA de aproximadamente 400 pb que se utilizará para generar un ARN de interferencia (RNAi) al ser insertado en un vector de expresión en plantas, de esta manera se logrará el silenciamiento de la profilina endógena. El fragmento se amplificó con los oligonucleótidos que se localizan en la región 3' *UTR* y otro que está en una zona interna de la región codificante de la profilina (Tabla 1). El producto de la reacción es un fragmento de 411 pb (Figura 16). Este producto se clonó en el vector pEntr TOPO y se transformaron bacterias de la cepa XL-1 Blue, para posteriormente purificar el plásmido que contuviera el inserto.

La secuencia que dará lugar al RNAi y que se encontraba en el vector de entrada pEntr, fue clonada por recombinación al vector pTDT (Fig. 17A), que permitirá generar la estructura de RNA que será procesada para la obtención del RNAi. Se comprobó por reacciones de PCR la correcta inserción de la secuencia (Fig. 17 B).

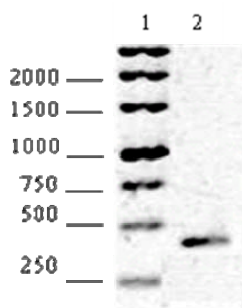


Figura 16. cDNA para el RNAi de la profilina. Carril 1: marcador de pesos moleculares. En el carril 2 se obtuvo la banda correspondiente al peso que se esperaba para el *cDNA* que permitirá dar lugar al *iRNA* (aproximadamente 400pb).

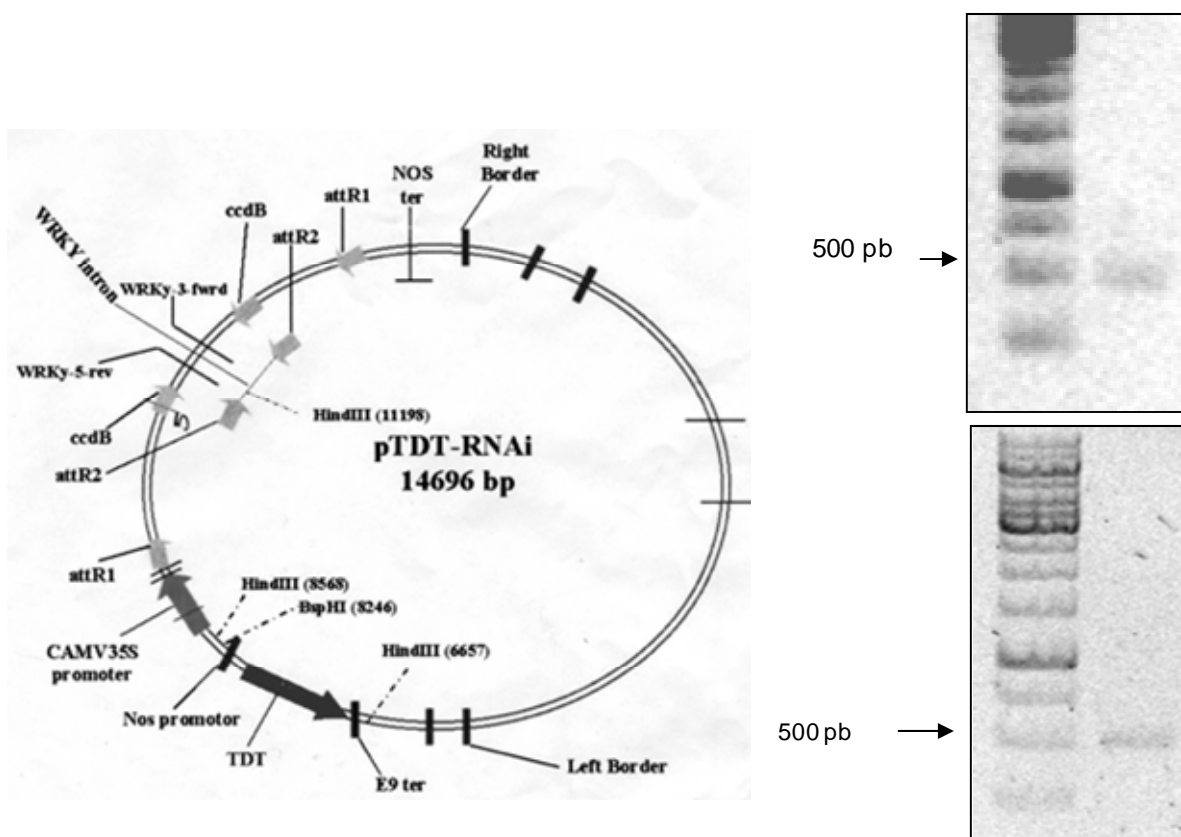


Figura 17. Inserción en el vector pTDT. Izquierda: mapa del vector pTDT-RNAi. Derecha: Se llevaron a cabo un par de reacciones de PCR para corroborar la inserción de la secuencia de interés. Arriba: Se utilizaron los oligos WRKY-3-fwd y RNAi Fwd. Abajo: Se utilizaron los oligos WRKY-5-rev y RNAi Fwd.

Obtención de la construcción YFP2xFYVE

La construcción que contiene a la proteína amarillo fluorescente (YFP) fusionada a un tándem de dos dominios FYVE nos fue proporcionada por el grupo del Dr. Vermeer. El cDNA que nos fue enviado, contiene una secuencia terminadora denominada tNOS y viene insertada en el vector pG29. Nuestro interés es el de utilizar la fusión en el plásmido binario pJCGLOX, el cual ya cuenta con una secuencia terminadora (Anexo mapa del vector binario), por lo que se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 1) que nos permitieran obtener sólo la región que corresponde a la fusión YFP2xFYVE. De esta manera, mediante PCR, utilizando como templado la construcción proporcionada por el grupo del Dr. Vermeer se procedió a la obtención de un producto que contendría sólo la secuencia de nuestro interés (YFP2xFYVE) (Figura 18). El producto resultante fue clonado en el vector de entrada, siguiendo el protocolo que se describe en materiales y métodos. Algunas de las colonias obtenidas fueron comprobadas mediante PCR; y de las que resultaron positivas, se les extrajo el plásmido y se secuenciaron (en este caso inicialmente se enviaron dos). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia recibida a través del grupo del Dr. Vermeer (Anexo secuencia de la construcción YFP2xFYVE) y el alineamiento mostró la correcta obtención del fragmento de interés.

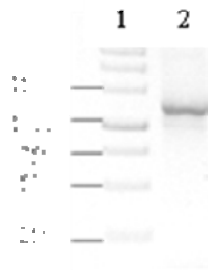


Figura 18. Producto de PCR de la fusión YFP2xFYVE. Carril 1 Marcador de pesos moleculares. Carril 2 se observa producto de PCR de alrededor de 1200 pb, el tamaño esperado para la secuencia de interés.

Recombinación con el vector binario

Para la expresión de las mutantes en planta, se llevaron a cabo las reacciones de recombinación con el plásmido binario pJCGLOX (Anexo mapa del vector binario) (Joubes *et al* 2004), el cual permite la expresión regulada del inserto, mediante la adición de

dexametasona. La finalidad de insertar nuestras secuencias de interés en dicho vector, es la de poder observar el efecto de la expresión de las mutantes en la planta y del cDNA que dará lugar al RNAi de manera individual. Además, el silenciar al gen de la profilina podría ser letal y por tanto no se obtendrían raíces transgénicas, de esta manera se puede inducir el silenciamiento de manera controlada y posterior a la generación de las raíces peludas.

La reacción de recombinación, se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de la enzima LR clonasa (Gateway LR Clonase II Enzyme Mix Invitrogen) (Materiales y métodos). Cada mezcla de reacción se utilizó para la transformación de células electrocompetentes. Las colonias positivas al crecimiento en cloramfenicol 30 (Clm30) fueron comprobadas para la expresión del inserto de interés mediante PCR de colonia.

A partir de las colonias positivas, se purificó el plásmido y se procedió a la transformación de *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599, desafortunadamente las colonias obtenidas resultaban falsos positivos en las reacciones de comprobación del inserto mediante PCR para nuestras secuencias de interés. La causa más probable era que las células fueran una mezcla de distintas cepas, por lo tanto se llevó a cabo una depuración de las mismas para obtener una cepa que resultara no resistente al antibiótico de interés (Clm30) y que tenga la característica de generar raíces peludas, mediante el protocolo habitual utilizado en nuestro grupo de trabajo. Pese a esta dificultad, se lograron obtener colonias que contienen la secuencia esperada de algunas de las mutantes de profilina (Y6FY125F, Y6DY125D y Y6D) y de la construcción YFP2xFYVE.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo la batería completa de mutantes que se deseaba, cada mutante (Y6D, Y6F, Y125D, Y125F, Y6DY125D, Y6DY125F, Y6FY125D y Y6FY125F) fue clonada en el vector de entrada pEntr TOPO-D. De esta manera se logra mantener cada cDNA para posteriores trabajos. Algunas de las mutantes ya han sido clonadas en el vector pJCGLOX para su posterior estudio en frijol.
- La construcción YFP2xFYVE se logró clonar en el vector pJCGLOX, bajo un promotor inducible, para poder llevar cabo la obtención de raíces peludas y caracterizar el comportamiento en distintas etapas de la infección por *Rhizobium*.
- Se obtuvo una construcción que permitirá el silenciamiento de la profilina endógena, con la desventaja de que el vector pTDT contiene promotor constitutivo para la expresión del inserto.

PERSPECTIVAS

- La clonación de cada una de las secuencias mutantes en el vector pEntr TOPO-D, además de permitir mantener el cDNA de cada una de ellas para su uso en posteriores trabajos, abre la posibilidad de utilizar estas secuencias en otro tipo de vectores binarios, por pertenecer a la tecnología Gateway, que es una potente herramienta para los estudios en plantas, particularmente en nuestro grupo de trabajo.
- Con cada uno de los cDNAs obtenidos en el presente trabajo (mutantes de profilina y construcción YFP2xFYVE), clonados en el vector binario pJCGLOX se puede dar paso a la caracterización de cada secuencia, durante su expresión en frijol, en la generación de raíces y nódulos transgénicos.
- El estudio de la expresión en plantas sería de manera individual, es decir, en una planta se generarán raíces peludas expresando sólo un cDNA. Posteriormente se buscaría la expresión de dos o tres cDNAs en una misma planta, es decir, la expresión conjunta de la construcción YFP2xFYVE, el cDNA para generar un RNAi y alguna de las mutantes de profilina, o simplemente de la construcción del FYVE con alguna mutante; todo esto para tener un panorama más completo de lo que sucede en la interacción de profilina con PI3K y el proceso de formación de vesículas, mediante el seguimiento de la YFP en las raíces y nódulos transgénicos.
- Estudios recientes han localizado a la profilina, tanto a su ARNm como a la proteína, en tejido vascular de frijol, específicamente en el floema, esto durante análisis de proteínas que incrementan su presencia durante estrés por déficit hídrico (Montalvo-Hernandez *et al* 2008). Esto podría ser un indicio de un posible papel de profilina en la señalización a nivel del organismo (sistémica), por tal motivo resulta de gran interés llevar a cabo un estudio más detallado, mediante el monitoreo de la expresión de la profilina en distintos tejidos durante la simbiosis con *Rhizobium*.

ANEXOS

Composición y preparación de los medios de cultivo

Medio LB (Luria-Bertani)

1.0% triptona

0.5% extracto de levadura

1.0% NaCl

pH 7.0

1. Para un litro de medio, disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10g de NaCl en 950 ml de agua destilada.
2. Ajustar el pH de la solución a 7.0, con NaOH y aforar a un litro.
3. Esterilizar en autoclave durante 20 min.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

Placas de LB sólido

1. Preparar medio LB como se indica anteriormente, adicionando 15 g de agar por litro de medio, antes de esterilizar en autoclave.
2. Esterilizar en autoclave durante 20 min.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

Medio S.O.C.

2 % triptona

0.5 % extracto de levadura

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

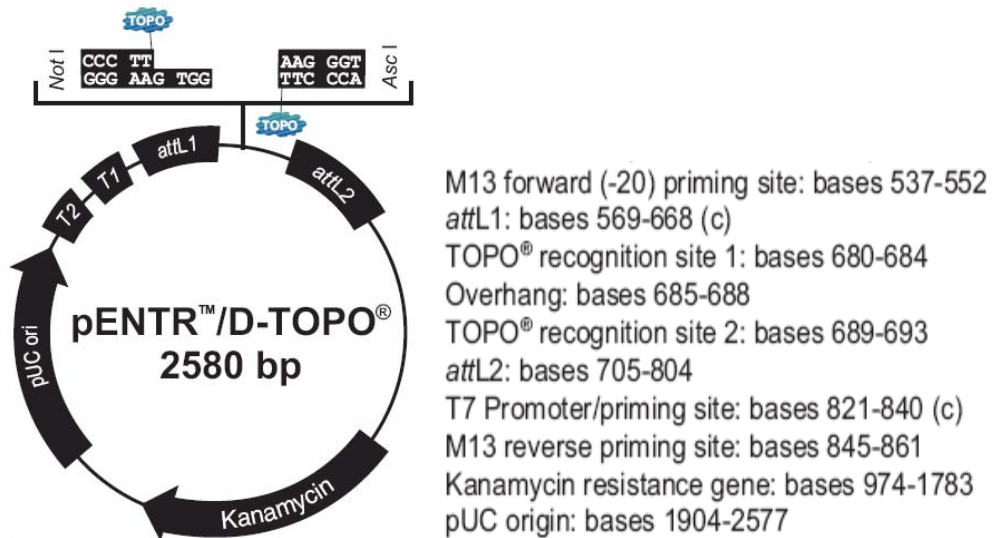
20 mM glucosa

Secuencia profilina de Phaseolus vulgaris

GenBank: X81982.1

1 atttcagag agaagcaaag cacagtgagt ttggtgagaa aatcagaagc atgctgtggc
61 aaacgtacgt cgacgaccac ettctctgtg agatcgaagg taaccacctc actcacgceg
121 ccatacctcgg ccaagacggc agcgtttggg ctaagagcgc cagcttcct cagttcaaac
181 cggaagaaat aactgggatac atgaatgatt ttaatgagcc tggaacactt gctcctactg
241 gattgtacat tgggtggcact aaatatatgg tcatccaagg tgaacccggc tctgtcattc
301 gaggcaagaa gggctcctggg ggtgttactg tgaagaagac gaatctggcc ttggtgatag
361 gcatttatga tgaacccatg actccaggtc aatgcaacat gatagttgaa aggcttgggtg
421 attatctcat tgaacagggt ctctaagcc ctgttatga ttggttatag tgcataattc
481 attggettct gtacagtttt ttgcatcgac cctcgactgg aatgctttga ttgcaggttt
541 aataatcttg tgggtgtcaa aagtcagggg atctgcgtgt agtgaagaaa gtgttttgat
601 gcttgagaaa tgatgactat aatgtcctat gcttgactt tttagtgggg tactgtatac
661 attacagtgt ttaattttat gctatggtat atggttggca atattaaca aaactttcca
721 gattctctc tatctcgcac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Mapa del vector de entrada.

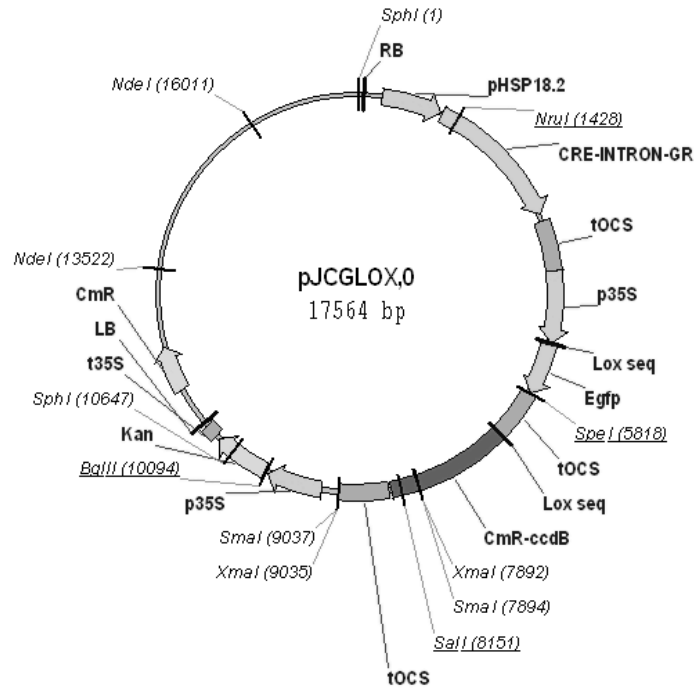


El vector pEntr/D/TOPO permite la inserción unidireccional del cDNA de interés, contiene una secuencia que confiere a las bacterias que lo portan resistencia a Kanamicina. El vector también contiene sitios que permiten la secuenciación del inserto por medio de los oligonucleótidos M13. Tomado de <http://products.invitrogen.com>

Secuencia de la fusión YFP-2xFYVE-Tnos:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAG
GGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
GCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTG
CTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCAT
GCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT
GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGA
ACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCT
GCTGCCCAGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCGAAAGTGATGCCATGTTTCG
TGCTGAAAGAGCCCCTGACTGGGTGGATGCTGAGGAATGCCATCGGTGCAGAG
TACAGTTTGGGGTGGTGACCCGCAAGCATCACTGCCGAGCATGTGGGCAGATC
TTCTGTGGCAAGTGCTCCTCCAAGTACTCCACCATCCCCAAGTTCGGCATTGAG
AAGGAGGTGCGCGTGTGTGAGCCCTGCTATGAGCAGCTGAACAAGAAGGCACA
AGGACAAGGATCCGAAAGTGATGCCATGTTTCGCTGCTGAAAGAGCCCCTGACT
GGGTGGATGCTGAGGAATGCCATCGGTGCAGAGTACAGTTTGGGGTGGTGACC
CGCAAGCATCACTGCCGAGCATGTGGGCAGATCTTCTGTGGCAAGTGCTCCTCC
AAGTACTCCACCATCCCCAAGTTCGGCATTGAGAAGGAGGTGCGCGTGTGTGA
GCCCTGCTATGAGCAGCTGAACAAGAAGGCAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTG
TATTCTATTGATCCAATTCGGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAA
GATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTA
CGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGT
TTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAT
ATAGCGCGCAAACACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
ATCGGGGATCGATCCCCGGGC

Mapa del vector binario



El vector contiene una secuencia promotora que permite la inducción por dexametasona. La resistencia a cloranfenicol es la que se confiere a las bacterias transformadas por este vector, mientras que para la selección en plantas, la resistencia es a kanamicina. Tomado de <http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php>

REFERENCIAS

- Ampe, C., F. Markey, et al. (1988). "The primary structure of human platelet profilin: reinvestigation of the calf spleen profilin sequence." *FEBS Lett* **228**(1): 17-21.
- Aparicio-Fabre, R., G. Guillen, et al. (2006). "Profilin tyrosine phosphorylation in poly-l-proline-binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*." *Plant J* **47**(4): 491-500.
- Ballweber, E., K. Giehl, et al. (1998). "Plant profilin induces actin polymerization from actin : beta-thymosin complexes and competes directly with beta-thymosins and with negative co-operativity with DNase I for binding to actin." *FEBS Lett* **425**(2): 251-255.
- Bassham, D. C., M. Laporte, et al. (2006). "Autophagy in development and stress responses of plants." *Autophagy* **2**(1): 2-11.
- Buss, F., C. Temm-Grove, et al. (1992). "Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments." *Cell Motil Cytoskeleton* **22**(1): 51-61.
- Chang, F., D. Drubin, et al. (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**(1): 169-182.
- Christensen, H. E., S. Ramachandran, et al. (1996). "Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin." *Plant J* **10**(2): 269-279.
- Didry, D., M. F. Carrier, et al. (1998). "Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover." *J Biol Chem* **273**(40): 25602-25611.
- Dong, J., B. Radau, et al. (2000). "Profilin I attached to the Golgi is required for the formation of constitutive transport vesicles at the trans-Golgi network." *Biochim Biophys Acta* **1497**(2): 253-260.
- dos Remedios, C. G., D. Chhabra, et al. (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." *Physiol Rev* **83**(2): 433-473.
- Evangelista, M., S. Zigmond, et al. (2003). "Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments." *J Cell Sci* **116**(Pt 13): 2603-2611.
- Gaullier, J.M. et al 1998. *Nature*, 394, 432-433.
- Gaullier, J.M. et al. 1999. *Chem. Phys. Lipids*, 98, 87-94.
- Gibbon, B. C., H. Ren, et al. (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., L. E. Zonia, et al. (1998). "Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs." *Plant Cell* **10**(6): 981-993.
- Guillen, G., V. Valdes-Lopez, et al. (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**(5): 497-508.
- Huang, S., J. M. McDowell, et al. (1996). "The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes." *Plant Physiol* **111**(1): 115-126.
- http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php?_app=vector&_act=construct_list_plant&

<http://products.invitrogen.com/ivgn/en/US/adirect/invitrogen?cmd=catProductDetail&productID=K240020>

- Jeong, Y. M., J. H. Mun, et al. (2006). "Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profilin gene family members." *Plant Physiol* **140**(1): 196-209.
- Kandasamy, M. K., B. Burgos-Rivera, et al. (2007). "Class-specific interaction of profilin and ADF isoforms with actin in the regulation of plant development." *Plant Cell* **19**(10): 3111-3126.
- Limmongkon, A., C. Giuliani, et al. (2004). "MAP kinase phosphorylation of plant profilin." *Biochem Biophys Res Commun* **324**(1): 382-386.
- Mammoto, A., T. Sasaki, et al. (1998). "Interactions of drebrin and gephyrin with profilin." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1): 86-89.
- Manseau, L., J. Calley, et al. (1996). "Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte." *Development* **122**(7): 2109-2116.
- Schutt, C. E., J. C. Myslik, et al. (1993). "The structure of crystalline profilin-beta-actin." *Nature* **365**(6449): 810-816.
- Singh, S. S., A. Chauhan, et al. (1996). "Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity." *Biochemistry* **35**(51): 16544-16549.
- Staiger, C. J., K. C. Goodbody, et al. (1993). "The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms." *Plant J* **4**(4): 631-641.
- Suetsugu, S., H. Miki, et al. (1998). "The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation." *Embo J* **17**(22): 6516-6526.
- Valenta, R., M. Duchene, et al. (1991). "Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals." *Science* **253**(5019): 557-560.
- Vidali, L., H. E. Perez, et al. (1995). "Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from Phaseolus vulgaris." *Plant Physiol* **108**(1): 115-123.
- Watanabe, N., P. Madaule, et al. (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**(11): 3044-3056.
- Witke, W. (2004). "The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes." *Trends Cell Biol* **14**(8): 461-469.
- Witke, W., A. V. Podtelejnikov, et al. (1998). "In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly." *Embo J* **17**(4): 967-976.

