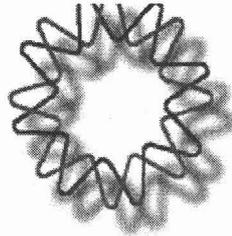


ISLAS FLORES, TANIA TAYDE 2005



00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
(U. N. A. M.)

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
(I. Bt.)

“Caracterización de una proteína con dominios WD-40 durante la germinación de *Phaseolus vulgaris*”

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Biol. Tania Tayde Islas Flores

Tutor:

Dr. Marco A. Villanueva Méndez

Comité tutorial:

Dr. Federico Sánchez Rodríguez.

Dra. Herminia Loza Tavera

Cuernavaca, Morelos. Junio del 2005

m. 3415918



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.

Este proyecto se llevó a cabo bajo la tutoría del Dr. Marco A. Villanueva Méndez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**A Karla
A mi familia**

AGRADECIMIENTOS:

No quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer a todas las personas e instituciones que me ayudaron a dar un paso más en mi carrera de la vida. Especialmente quiero dar las gracias al Dr. Marco Villanueva, por su paciencia y confianza. Para mí es un orgullo haber trabajado en su laboratorio por cuatro años, ya que aprendí muchas cosas académicas, pero sobre todo conocí su enorme valor humano, de respeto y lucha.

Agradezco mucho a Geo P., Yolo, Delfee, Mary, Ileana, Maru, Manuel, Carmelita y a la Dra. Gladys Cassab por todo el apoyo que me dieron para resolver mis dudas y mis experimentos; además, por permitirme convivir con ustedes en un ambiente de armonía. Y gracias de nuevo a Maru y Carmelita por su solidaridad conmigo.

A Juan Olivares y Gabriel Guillén, por su experiencia y ayuda en la expresión de mi cDNA y en mejorar algunas partes de mis experimentos. A Martín V., de la Facultad de Química de la UNAM por apoyarme con tiempo y talento en los ensayos de quimioluminiscencia. A la Dra. Herminia Loza y Federico Sánchez, que integraron mi comité tutorial y me dieron consejos que permitieron mejorar mi proyecto.

Quiero mencionar que la unidad de Cómputo del IBt fué indispensable para la presentación de esta tesis, por lo que les agradezco enormemente su ayuda.

Sin duda alguna no hubiese logrado culminar este proyecto sin el apoyo económico que CONACyT me otorgó durante los dos años en que realicé mi proyecto.

Por último y con mucho cariño agradezco a mi hija Karla y a mi mamá su comprensión por las ausencias y su cariño incondicional. A mis amigos y familiares, agradezco los momentos de convivencia que hicieron menos pesados mis momentos difíciles. No mencionaré cada uno de sus nombres ya que sé que ustedes saben lo mucho que les quiero y aprecio. *“Un hermano no siempre es un amigo, pero un amigo siempre será un hermano” (Benjamin, Franklin).*

“A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto, y de pronto toda nuestra vida se concentra en un instante”.

(Oscar Wilde)

ÍNDICE

I. RESUMEN -----	1
II. INTRODUCCIÓN -----	2
II.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN PLANTAS -----	3
II.1.1 Moléculas receptoras -----	3
II.1.2 Mediadores -----	4
II.1.2.1 a) Cinasas de proteínas -----	4
II.1.2.2 b) Proteínas G -----	5
II.1.2.3 c) Cinasas de proteínas activadas por mitógenos -----	5
II.1.2.4 d) Segundos mensajeros -----	6
II.1.2.5 e) Proteínas adaptadoras -----	7
III. REPETICIONES WD-40 -----	9
III.1 PROTEÍNAS CON DOMINIOS WD-40 EN PLANTAS -----	13
III.2 SPA (<i>Suppressor of Phytochrome A</i>) -----	13
III.3 COP I (<i>Constitutive Photomorphogenesis I</i>) -----	13
III.4 G_β -----	14
III.5 Homólogos de RACK1 -----	14
IV. ANTECEDENTES -----	16
IV.1 Hipótesis -----	19
IV.2 Objetivo -----	19
V. METODOLOGÍA -----	20
V.1 MATERIAL BIOLÓGICO -----	20
V.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS -----	20
V.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (<i>SDS-PAGE</i>) -----	20
V.4 ELECTROTRANSFERENCIA -----	20
V.5 ANTICUERPOS E INMUNODETECCIÓN -----	21
V.6 TINCIÓN DE GELES CON AZUL COOMASSIE -----	21
V.7 COLUMNA DE AFINIDAD -----	21
V.8 ANÁLISIS DE EXTRACTOS NATIVOS Y DESNATURALIZADOS -----	22
V.9 <i>DOT BLOT</i> -----	22
V.10 CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> -----	23
V.11 <i>WESTERN BLOT</i> DE LA CINÉTICA DE GERMINACIÓN -----	23
V.12 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE FRIJOL -----	23
V.13 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE SEMILLAS DE FRIJOL ---	24
V.14 ELECTROFORESIS DE RNA Y DNA EN GELES DE AGAROSA -----	25
V.15 MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS -----	25
V.16 <i>NORTHERN BLOT</i> DE LA CINÉTICA DE GERMINACIÓN -----	26
V.17 <i>SOUTHERN BLOT</i> -----	26
V.17.1 Digestión del DNA genómico -----	26

V.18 CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DE 580 pb's -----	27
V.19 EXPRESIÓN DEL FRAGMENTO DE 580 pb's -----	29
V.19.1 Expresión piloto -----	29
V.19.2 Expresión a escala mayor -----	30
V.20 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS -----	30
V.20.1 Purificación de la proteína recombinante -----	30
V.20.2 Preparación de la proteína recombinante para inmunizar -----	30
V.20.3 Inmunizaciones -----	30
V.20.4 Análisis de los anticuerpos levantados en conejo y ratones -----	31
V.21 Amplificación por RT-PCR de un fragmento del cDNA de p36 -----	31
VI. RESULTADOS -----	32
VI.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA p36 -----	32
VI.2 ANÁLISIS DE EXTRACTOS NATIVOS Y DESNATURALIZADOS -----	37
VI.3 <i>DOT BLOT</i> -----	37
VI.4 ANÁLISIS POR <i>WESTERN BLOT</i> DE LA ACUMULACIÓN DE p36 EN UNA CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL -----	39
VI.5 ANÁLISIS POR <i>NORTHERN BLOT</i> DE LA ACUMULACIÓN DEL RNA MENSAJERO DE p36 EN UNA CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL EN PRESENCIA DE H ₂ O, AIA, 2,4-D Y NPA -----	40
VI.6 <i>SOUTHERN BLOT</i> -----	43
VI.7 CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN FRAGMENTO DE 580 pb's -----	44
VI.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS LEVANTADOS EN TRES RATONES DE LA CEPA Balb-C Y UN CONEJO DE NUEVA ZELANDA, Y UN ANTICUERPO COMERCIAL ANTI-RACK1 -----	47
VII. DISCUSIÓN -----	49
VIII. CONCLUSIONES -----	55
IX. BIBLIOGRAFIA -----	57

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- ESTRUCTURA DE β-PROPELA DE LA G_{β} DE UNA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA -----	11
Fig. 2.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS SUPERFICIES DE INTERACCIÓN EN ESTRUCTURAS DE β-PROPELA -----	11
Fig. 3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS DOMINIOS WD-40 DE UNA G_{β}, Prp4 y Sec13 ----	12
Fig. 4.- ALINEAMIENTO DE LOS CUATRO PÉPTIDOS PARCIALES DE p36 OBTENIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS -----	16
Fig. 5.- INMUNODETECCIÓN DE p36 PRESENTE EN EXTRACTOS PROTEICOS DE EJES EMBRIONARIOS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> -----	17
Fig. 6.- ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTENIDAS A PARTIR DE EJES EMBRIONARIOS DE <i>Phaseolus vulgaris</i>, CON LA SECUENCIA DE LA PROBABLE G_{β} DE <i>Glycine max</i> -----	17
Fig. 7.- ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS OBTENIDA A PARTIR DE EJES EMBRIONARIOS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> CON LA SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD β DE UNA PROTEINA G HETEROTRIMÉRICA DE <i>Glycine max</i> -----	18
Fig. 8.- REPRESENTACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE 580 pb's A PARTIR DE cDNA DE <i>P. vulgaris</i> -----	27
Fig. 9.- MAPA DEL VECTOR pCRT7/CT-TOPO -----	28
Fig. 10.- ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DEL cDNA DE p36 -----	32
Fig. 11.- SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL FRAGMENTO DE p36 EN NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS -----	33
Fig. 12.- ALINEAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS DE UNIÓN A PKC DE RACK1 DE <i>Homo sapiens</i>, RWD DE <i>Oryza sativa</i>, Y EL FRAGMENTO DE p36 de <i>Phaseolus vulgaris</i> -----	34
Fig. 13.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LAS SECUENCIAS EN NUCLEÓTIDOS DE p36 de <i>P. vulgaris</i>, LA PROBABLE G_{β} DE <i>G. max</i>, arcA de <i>A. thaliana</i> y <i>N. tabacum</i> -----	35
Fig. 14.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LAS SECUENCIAS EN AMINOÁCIDOS DE p36 CON OTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS DE PLANTAS Y ANIMALES -----	36
Fig. 15.- ANÁLISIS DE EXTRACTOS NATIVOS, SEMIDESNATURALIZADOS Y DESNATURALIZADOS DE EJES EMBRIONARIOS DE <i>P. vulgaris</i> POR WESTERN BLOT A PARTIR DE GELES DE GRADIENTE SIN SDS -----	38
Fig. 16.- ANÁLISIS POR DOT BLOT DE EXTRACTOS NATIVOS, SEMIDESNATURALIZADOS Y DESNATURALIZADOS DE EJES EMBRIONARIOS DE <i>P. vulgaris</i> -----	38

Fig. 17.- ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ACUMULACIÓN DE p36 POR WESTERN BLOT DE TEJIDOS EXTRAÍDOS DE EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL A LO LARGO DE UNA CINÉTICA DE GERMINACIÓN -----	39
Fig. 18.- ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DEL RNA MENSAJERO QUE CODIFICA PARA p36 DURANTE DIVERSOS TIEMPOS DE GERMINACIÓN EN PRESENCIA DE H₂O, IAA, 2,4-D Y NPA -----	42
Fig. 19.- ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT DEL DNA GENOMICO DE FRIJOL DIGERIDO CON LAS ENZIMAS BamHI, BanI, Bgl II y KpnI -----	43
Fig 20.- SELECCIÓN POR PCR DE LAS 7 COLONIAS TRANSFORMADAS CON EL FRAGMENTO DE 580 pb's -----	45
Fig. 21.- DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE LAS CLONAS 2, 4, 5, 6 Y 7 CON LA ENZIMA BanI PARA DETERMINAR LA ORIENTACIÓN DEL INSERTO ---	46
Fig. 22.- CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE ----	46
Fig. 23.- PATRÓN DE TINCIÓN POR AZUL DE COOMASSIE EN UN GEL DE 12% DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA POR UNA COLUMNA DE NÍQUEL ACOPLADO A SEFAROSA -----	47
Fig. 24.- ANÁLISIS POR WESTERN BLOT CON LOS ANTISUEROS PROVENIENTES DE LOS RATONES Y EL CONEJO INMUNIZADOS CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DERIVADA DE p36, Y CON ANTI-RACK1 DE HUMANOS -----	48
Fig. 25.- ALINEAMIENTO DE LOS AMINOÁCIDOS 131-317 DE RACK1 DE HUMANOS CON EL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE DE p36 -----	51
Fig. 26.- MODELO DE EXPRESIÓN DE p36 -----	52
TABLA1.- PROTEÍNAS CONSERVADAS CON REPETICIONES WD DE FUNCIÓN CONOCIDA -----	10

I. RESUMEN

Durante su ciclo de vida, las células vegetales responden a señales que provocan cambios profundos en su fisiología, morfología y desarrollo. Los estímulos percibidos por las plantas son variados y por lo tanto, las respuestas particulares se darán según el estímulo específico. En los últimos años se han identificado algunos de los componentes de las vías de señalización de células vegetales, entre los que se encuentran por ejemplo, los segundos mensajeros, la fosforilación y defosforilación de proteínas, la presencia de receptores, proteínas G, etc. (Bowler y Chua, 1994). En las vías de señalización existen componentes que forman complejos multiproteicos que permiten integrar las señales entre varias proteínas para ampliar la señalización. Esta es una característica de proteínas que presentan una estructura específica que facilita la interacción con varias otras proteínas a la vez. RACK1 (por sus siglas en inglés: *Receptor for Activated Protein Kinase C*) es una proteína con repeticiones WD-40 que le confieren una estructura de β -propela que sirve de andamio para muchas otras proteínas durante los procesos de señalización.

En el presente trabajo se caracterizaron los niveles de acumulación de una proteína de 36 kDa (p36) y su mRNA en una cinética de germinación de *Phaseolus vulgaris*. El seguimiento de la proteína se llevó a cabo con anticuerpos anti-PA218 diseñados contra un decapeptido (AIATPIDNSD) de p36; sin embargo, estos anticuerpos no fueron eficientes para inmunoprecipitar a p36 por lo que se expresó un fragmento de 580 pb's del cDNA que codifica para esta proteína, y la proteína recombinante se utilizó para producir anticuerpos. Estos anticuerpos reconocen a la proteína recombinante pura. Se amplificó un fragmento de 936 pb's del cDNA que codifica para p36, y su secuencia se traduce en 311 aminoácidos, que presentan siete repeticiones WD-40. Una comparación de la secuencia con las reportadas en la base de datos mostró que la secuencia tiene alta identidad (96 y 89% de identidad a nivel de aminoácidos y nucleótidos respectivamente) con la probable G_{β} de soya, además también comparte identidad con arcA de tabaco y de *Arabidopsis*, RWD de arroz y con RACK1 de rata y humano. De igual forma, la secuencia no mostró alta similitud con proteínas G_{β} de las mismas especies. Esto indica que p36 es un homólogo de RACK1 en frijol. El análisis del patrón de acumulación de la proteína y el mRNA demostró que la proteína es almacenada durante el desarrollo de la semilla, mientras que el mRNA es sintetizado *de novo*, y tiene su máximo punto de acumulación a las 32 h de imbibición. Análisis del mismo mRNA en presencia de IAA y de la auxina sintética 2,4-D, mostró un cambio ligero en el punto de máxima acumulación que cambió de 32 h en el control a 40 h con ambas auxinas, pero con el inhibidor del transporte polar de auxinas (NPA) no se observó modificación significativa del patrón de acumulación del mRNA. Esto indica que los cambios en los patrones de acumulación son modulados probablemente de forma indirecta por el IAA y el 2,4-D aplicados exógenamente. Finalmente, un análisis por *Southern blot* permitió determinar que en el genoma de *Phaseolus vulgaris* hay solo uno o dos genes que codifican para p36.

II. INTRODUCCIÓN

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas. Esta desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, la regeneración de los bosques y la sucesión ecológica. La semilla es esencial para el ser humano, pues su alimento principal está constituido por semillas, directa o indirectamente. También es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones de plantas, para la reforestación, para la conservación del germoplasma vegetal y para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas; pueden almacenarse vivas por largos periodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas.

Las semillas se componen de un embrión y de reservas de alimento almacenadas en el endospermo para permitir el desarrollo de este. El embrión está rodeado por una capa seminal que protege a la semilla. Muchas semillas permanecen en estado de dormancia por mucho tiempo esperando a que el embrión se desarrolle completamente. En algunos casos, las semillas esperan hasta que las enzimas que causan que la cubierta seminal sea impermeable al agua, se degraden. Otras requieren periodos de descanso antes de que puedan ser estimuladas para germinar. Las semillas requieren de condiciones favorables para germinar como la presencia de agua, oxígeno y temperatura adecuada. Sus tejidos están deshidratados y por tanto el agua es esencial para que la germinación inicie. Las semillas toman el agua por ósmosis, hinchándose durante el proceso. El agua es entonces mezclada con celulosa y almidones almacenados dentro del endospermo. El embrión también requiere de oxígeno para transformar la energía de los nutrientes en ATP y utilizarla para crecer. Cuando la planta germina, comienzan a actuar algunas sustancias hormonales que regulan su crecimiento desde esta temprana fase: las fitohormonas, llamadas giberelinas, son las que gobiernan varios aspectos de la germinación; cuando la planta surge a la superficie, las hormonas llamadas auxinas aceleran su crecimiento vertical, y más tarde, comienzan a aparecer las citocininas, encargadas de la multiplicación de las células y que a su vez ayudan a la ramificación de la planta.

Las células, tanto vegetales como animales, presentan una gran variedad de mecanismos para detectar diferentes señales tanto ambientales como internas, y para transmitir y procesar esa información en su interior; estos mecanismos son rápidos, sensibles y específicos. En plantas, los mecanismos de transducción de señales no han sido estudiados tan ampliamente como en animales, aunque los componentes de las vías de señalización que se han identificado en plantas son conservados en todos los reinos; por ejemplo, los segundos mensajeros, la fosforilación y defosforilación de proteínas, presencia de receptores, proteínas G, etc. (Bowler y Chua, 1994). Sin embargo, aún es necesario estudiar cómo estos componentes interactúan uno con otro, cómo se integran las señales, a que se debe la especificidad, y cómo son los mecanismos de transducción de señales a nivel molecular. Un mecanismo por el cual las células eucarióticas son capaces de integrar

múltiples señales es a través de la formación de un “signalosoma”, con la ayuda de proteínas de andamio que sirven de plataforma para diferentes componentes de la señalización. Se han identificado ya algunas proteínas de este tipo entre las que se encuentran proteínas con estructura β -propela, característica estructural que les permite integrar las señales.

II.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN PLANTAS.

Durante su ciclo de vida, las plantas y sus células responden a señales alterando así su fisiología, morfología y desarrollo. Los estímulos percibidos por las plantas son variados y por lo tanto, las respuestas particulares se darán según el estímulo específico. Las respuestas pueden ser divididas en tres eventos: la percepción al estímulo, la generación y transmisión de la señal, y cambios subsecuentes en los procesos bioquímicos corriente abajo (Møller y Chua, 1999).

II.1.1 Moléculas Receptoras.

En la cascada de transducción de señales, participan moléculas receptoras que pueden estar ubicadas en la superficie de la célula, en el núcleo, en la pared celular o en el citosol (Trewavas y Malhó, 1997). El receptor puede participar directamente en la transducción de la señal ya que, en algunos casos, la unión de un ligando al receptor provoca que este cambie su conformación transmitiendo de esta forma la señal al interior de la célula.

Los receptores con actividad de cinasa de plantas juegan un papel importante en los procesos de reconocimiento célula-célula, defensa contra patógenos, y auto-incompatibilidad. El primer gen clonado para un receptor de una planta codifica para un RLK (por sus siglas en inglés: *receptor-like kinase*), que transduce la señal a través de la activación de su dominio de cinasa, y evidencia genética ha identificado otros receptores denominados SRK (por sus siglas en inglés: *S-receptor-like kinase*), que poseen dominios extracelulares S (relacionados con la glucoproteína de un locus llamado S) en especies de *Brassica* y que es el determinante femenino de auto-compatibilidad. Los receptores RLKs son conocidos en plantas como PRKs (por sus siglas en inglés: *plant receptor kinase*) y en *Arabidopsis* constituyen un grupo monofilético de más de 400 genes (Tichtinsky *et al.*, 2003). Aunque los PRKs han sido menos caracterizados que en su contraparte animal, parecen tener algunas características comunes a los receptores de las vías de señalización en los dos reinos. También se han encontrado proteínas RLK con regiones extracitoplásmicas ricas en leucinas (también llamadas LRR por sus siglas en inglés: *leucine-rich-repeat*), que representan gran parte de los PRKs caracterizados a la fecha. Esta familia incluye: ERECTA que participa en la formación de los órganos; HAESA que participa en la abscisión floral; CLAVATA1 (CLV1) que controla el mantenimiento de las células troncales en los meristemos apicales y que en su dominio intracelular es una proteína cinasa que actúa como una cinasa de serina; BRI1 (por sus siglas en inglés:

Brassinosteroid-insensitive 1) y su co-receptor BAK1 (por sus siglas en inglés: BRI1-associated receptor kinase 1), que median la respuesta de los brasinosteroides; y FLS2 (por sus siglas en inglés: *flagelin-sensing 2*) que media la respuesta innata a patógenos bacterianos (Tichtinsky *et al.*, 2003).

Otro tipo de cinasas de proteínas, las cinasas de histidinas se han clonado y se ha visto que están involucradas en la percepción de hormonas de plantas (como las citocininas y el etileno), y señales ambientales (Urao *et al.*, 2000). Se sabe también que el receptor fitocromo pertenece a los receptores tipo cinasa, ya que es activado por la luz roja en el dominio cinasa de serina/treonina (McCarty y Chory, 2000). Se ha propuesto que estos receptores pueden estar participando en un sistema de señalización de dos componentes en plantas ya que se han identificado otras proteínas relacionadas con estos mecanismos en *Arabidopsis* (Hwang *et al.*, 2002).

También existe una familia de receptores acoplados a proteínas G o GPCRs (por sus siglas en inglés: *G Protein Coupled Receptors*), que representan un grupo grande de proteínas de membrana con funciones diversas, y que también han sido identificados en plantas. En animales, pueden ser activados por un gran número de estímulos como la luz, aromas, hormonas y neurotransmisores. Los GPCRs tienen siete regiones transmembranales, y al ser activados por algún estímulo, catalizan el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas, transduciendo así la señal a varias vías secundarias que involucran canales iónicos, adenil ciclasas y fosfolipasas (Svoboda y Novotny, 2002). Los GPCRs de animales están clasificados en varias familias por similitud en secuencia: Rodopsinas, Olfatorios, Amina biogénica y Receptores de péptidos A, B y C.

Algunos receptores están localizados en el interior de la membrana celular y pueden comportarse como canales iónicos. El receptor mejor conocido de esta clase es el que une al segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato [Ins(1,4,5)P₃], y en plantas se han encontrado 20 genes de este tipo con similitud en secuencia a receptores de glutamato en animales (GLRs, por sus siglas en inglés: *glutamate receptor*). Se ha propuesto que estos son receptores que se comportan como canales iónicos (Davenport, 2002).

Todos estos datos proponen la existencia de sensores/receptores de los diversos estímulos externos y endógenos en las plantas, e implican que los componentes corriente abajo de los sistemas también se encuentran presentes y pueden tener funciones similares a sus homólogos en animales.

II.1.2 Mediadores

II.1.2.1 a) Cinasas de Proteínas. - La fosforilación de proteínas es un mecanismo clave para la transducción de señales intracelulares tanto en células procariotas como eucariotas. Este proceso es catalizado por cinasas que tienen actividad enzimática, y que son capaces de transferir el fosfato γ del ATP a las proteínas sustrato. Las cinasas de

proteínas están clasificadas por su similitud de secuencia en familias relacionadas. Típicamente las cinasas de proteínas de eucariotes han sido subdivididas en tres grupos, las que fosforilan serina y/o treonina, las que fosforilan histidinas y las que fosforilan tirosinas. En plantas la fosforilación de proteínas ha sido involucrada en respuesta a muchas señales, incluyendo la luz, invasión por patógenos, hormonas, temperaturas estresantes y privación de nutrientes. Las cinasas de proteínas implicadas en la transducción de señales de eventos tempranos son mediadas a su vez por cinasas únicas, y estas señales convergen en vías que utilizan a cinasas más altamente conservadas que son universales en eucariotes. Las diferencias observadas en los pasos iniciales de las vías de transducción de señales podrían reflejar la divergencia de señales del desarrollo y ambientales a las que responden las plantas.

II.1.2.2 b) Proteínas G.- Las proteínas de unión a GTP o GTPasas participan en la transducción de las señales como proteínas mediadoras. Estas proteínas unen GTP para activarse y de esta forma, activar a otras moléculas; las proteínas G transmiten la señal de la vía de moléculas receptoras a moléculas efectoras. Estas proteínas poseen tres subunidades, la subunidad α , β y γ . En mamíferos, la actividad de GTPasa se le atribuye a la subunidad α , la cual se une a GTP, y se disocia del dímero $G_{\beta\gamma}$ para posteriormente hidrolizar el GTP a GDP y regresar a su estado inactivo en el cual se une de nuevo al dímero (Terry *et al.*, 1993), y se propone que tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ regulan moléculas efectoras interactuando con ellas. En plantas, el modelo propuesto es el mismo que para animales, sin embargo, solo se han identificado dos subunidades γ en *Arabidopsis* y a la fecha no hay evidencia de la interacción del dímero $\beta\gamma$ con la subunidad α (Mason y Botella, 2001).

II.1.2.3 c) Cinasas de proteínas activadas por mitógenos.- Las MAPKs (por sus siglas en inglés: *Mitogen-activated protein kinase*) son un grupo grande de cinasas, entre las que se encuentra el grupo de ERKs (por sus siglas en inglés: *extracellular signal-regulated kinase*), son cinasas de serina-treonina, activadas por la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina. La enzima responsable de esta fosforilación dual es la MAPKK, que representa una clase inusual de proteína cinasa eucariótica que puede fosforilar en residuos de serina, treonina y tirosina. La activación por fosforilación ocurre en el asa de activación de MAPKs. Las cascadas de proteínas MAPK han emergido como un mecanismo de transducción de señales universal que conecta diversos receptores/sensores con respuestas celulares y nucleares. Las cascadas de cinasas de proteínas son altamente conservadas en eucariotes y consisten de tres cinasas actuando subsecuentemente, una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK), y finalmente la MAP cinasa (MAPK). Las MAPKs están implicadas en la regulación de la expresión génica y en la división celular. En plantas algunas de las MAPKs identificadas son: MsERK1 de alfalfa, y ATMPK1 y 2 de *Arabidopsis* que

presentan actividad de cinasa sobre MBP (por sus siglas en inglés: *myelin basic protein*) el sustrato utilizado convencionalmente para las MAPKs (Stone y Walker, 1995).

II.1.2.4 d) Segundos mensajeros. - Los segundos mensajeros también son piezas clave para la transducción de las señales. En eucariotes, proporcionan el enlace esencial entre estímulos externos y respuestas intracelulares específicas. Estos incluyen: Ca^{2+} -calmodulina, cGMP (Neuhaus *et al.*, 1993), diacilglicerol, cAMP (Assmann, 1995; Bolwell, 1995), fosfoinosítidos (Alexandre *et al.*, 1990; Allen *et al.*, 1995), glutatión, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo (Inzé y Montagu, 1995) y óxido nítrico. Sin embargo, en plantas no se ha logrado determinar niveles de cAMP, por lo que no hay evidencias que prueben que este es sintetizado en células vegetales. Se ha observado que los efectos de un gran número de estímulos químicos y físicos son mediados por incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Gilroy y Trewavas, 1994). Numerosos estímulos pueden alterar las concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma. Las proteínas de unión a Ca^{2+} cambian su comportamiento y transmiten información que resulta en cambios metabólicos y de expresión genética. Las cinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} o las cinasas con dominios tipo calmodulinas, CDPK (por sus siglas en inglés: *calmodulin-like domain protein kinase*), son reguladas por las concentraciones de este catión (Harmon *et al.*, 2000). En células guarda se ha visto que los incrementos de Ca^{2+} ocurren como respuesta al ácido abscísico, a las auxinas y a las elevadas concentraciones de CO_2 , al estrés oxidativo y al Ca^{2+} externo (Leckie *et al.*, 1998).

Se tienen evidencias de que el ácido fosfatídico también es un segundo mensajero, se sabe que su nivel aumenta en unos minutos después de una gran variedad de tratamientos de estrés medioambiental (Munnik, 2001). El fosfatidil-inositol monofosfato y el fosfatidil-inositol bisfosfato, actúan como fuentes de segundos mensajeros (Chen *et al.*, 1991). La unión de señales externas a los receptores de superficie activa a la fosfolipasa C (PLC) de la membrana. La PLC activada hidroliza al fosfatidil-inositol 4,5 bisfosfato que así se convierte en dos segundos mensajeros, el Ins (1,4,5) P_3 y el diacilglicerol (DAG); entonces el Ins(1,4,5) P_3 se une a un receptor del retículo endoplásmico disparando la liberación de Ca^{2+} de almacenes de este organelo y el DAG permanece en la membrana para activar a algunas cinasas (Munnik, 2001).

El cAMP (adenosina 3',5-monofosfato cíclico) se deriva del ATP; esta molécula no se vincula con la transferencia de energía pero representa un "segundo mensajero" que actúa a través de cinasas conocidas como dependientes de cAMP (cAMP-dependent). Las señales que activan o inhiben directamente a cinasas dependientes de cAMP usualmente son mediadas por tipos específicos de proteínas G. En plantas y protoplastos de células guarda, la aplicación de cAMP permite la activación de cinasas de proteínas que aceleran la apertura estomatal, y se ha encontrado también que esto provoca un decremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular; pero esto no es un indicativo de la existencia de cAMP en plantas (Leckie *et al.*, 1998).

El cADPR (ADP-ribosa cíclico) es sintetizado de NAD^+ por la enzima ADP-ribosil ciclase y es degradado por la cADPR hidrolasa a ADP-ribosa. Este segundo mensajero media la movilización del Ca^{2+} independientemente de InsP_3 , y puede facilitar tal proceso interactuando con un canal tipo receptor de rianodina (RyR) (Leckie *et al.*, 1998).

El óxido nítrico es un segundo mensajero intra y extra-celular que es producido por la enzima nitrato reductasa; en plantas éste activa varios genes de defensa y actúa como regulador del desarrollo, y a su vez, causa incrementos de cGMP (Guanidina 3',5-monofosfato cíclico) (Tuteja *et al.*, 2004)). Se propone que en plantas, el cGMP participa en la transducción de señales de invasión fúngica, de la luz roja mediada por fitocromos y en la señalización de giberelinas.

II.1.2.5 e) Proteínas adaptadoras.- Muchas de las proteínas involucradas en la transducción de señales son proteínas adaptadoras que interactúan con otras proteínas a través de distintos módulos que se caracterizan por dominios particulares. Estos dominios de interacción pueden ser clasificados en distintas familias, ya sea de acuerdo a su secuencia, o a las propiedades de unión al ligando. Por ejemplo, un gran número de las proteínas citoplasmáticas que contienen uno o dos dominios SH2 (por sus siglas en inglés: *Src-homology 2*), reconocen directamente motivos que contienen fosfotirosinas; sin embargo, proteínas con dominios PTB (por sus siglas en inglés: *Phosphotyrosine-binding*), también reconocen fosfotirosinas. Aunque los dominios PTB fueron descubiertos originalmente debido a su habilidad para unir fosfotirosinas con la secuencia: Asn-Pro-X-Tyr (NPXY), muchos dominios PTB reconocen motivos relacionados con este péptido pero de una forma fosfo-independiente. Otro grupo, incluye a las proteínas 14-3-3 (módulos de unión a fosfoserina-fosfotreonina), los dominios FHA (por sus siglas en inglés: *Forkhead associated*) y WD-40 (repeticiones del dipéptido Trp, Asp) que reconocen motivos específicos de fosfoserina-treonina, y por lo tanto median la actividad biológica de cinasas de serina-treonina (Pawson *et al.*, 2001).

Un grupo de varios dominios (SH3, WW, EVH1) se unen a motivos ricos en prolina; Similarmente, los dominios PDZ se unen a canales iónicos y receptores, de tal forma que son importantes para la localización de sus blancos en sitios subcelulares particulares, así como para la señalización corriente abajo.

Se han identificado un gran número de módulos que reconocen fosfolípidos específicos, principalmente fosfoinosítidos o PI (por sus siglas en inglés: *Phosphoinositides*). Los dominios PH (por sus siglas en inglés: *Pleckstrin-homology*) pueden unirse ya sea a PI-4,5-P2 o PI-3,4,5-P3, y por lo tanto, median los efectos de cinasas de lípidos y fosfatasa en la función celular. Estos dominios de unión a fosfolípidos sirven tanto para concentrar proteínas de señalización en subregiones específicas de la membrana plasmática, como para regular las actividades específicas de sus proteínas ya sea directamente o por reclutamiento de otra proteína reguladora. Módulos tales como los dominios FYVE (por

sus siglas en inglés: *Fab-1*, *YGL023*, *Vps27*, and *EEA1*) pueden reconocer a PI-3-P, y pueden tener un papel importante en el tráfico de proteínas en la célula (Pawson, 2003).

Los dominios particulares de cada una de estas proteínas son por tanto, necesarios para la interacción proteína-proteína, que es a su vez indispensable para transducir las señales de moléculas receptoras a moléculas efectoras. La gran variedad de dominios implica una exquisita regulación e interacción de proteínas de las cascadas de señalización, a todos los niveles.

III. REPETICIONES WD-40

Durante los últimos años, se ha ido acumulando información sobre la familia de proteínas que contienen repeticiones WD-40. Estas proteínas se distribuyen en todos los organismos eucariotes y se les ha implicado en una gran variedad de funciones cruciales. Los genomas procarióticos ya secuenciados no contienen proteínas con repeticiones WD-40 reconocibles; sin embargo, se identificaron dos proteínas con estas repeticiones en *Cyanobacterium synechocystis*, un alga verde-azul que se sabe, adquiere DNA de su entorno; y en *Thermomonospora curvata*, también un alga verde-azul. Además, se han encontrado 5 proteínas que presentan estas repeticiones en el genoma procariote de *Synechocystis sp.* (cepa PCC6803) (Nocker y Ludwig, 2003). Dado el gran número de procesos eucarióticos únicos en los que se involucran las proteínas con repeticiones WD-40, esta familia probablemente surgió en los precursores inmediatos de los eucariotes o durante sus etapas iniciales.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay 237 proteínas que presentan de 4 a 7 repeticiones WD y en el de *Saccharomyces cerevisiae*, 58. Las 237 proteínas encontradas en *Arabidopsis* con repeticiones WD-40 son clasificadas en 143 familias diferentes, 49 de estas contienen más de un miembro en *Arabidopsis*. Aproximadamente 113 de estas familias o proteínas individuales mostraron clara homología con proteínas con repeticiones WD-40 de levaduras, mosca de la fruta y /o humanos; donde se encontró que están conservadas en todos estos organismos, sugiriendo que muchas de estas proteínas son componentes de mecanismos celulares básicos (Nocker y Ludwig, 2003). Por otro lado, *Arabidopsis* carece de contrapartes de varias proteínas con repeticiones WD-40 que han sido extensamente estudiadas en otros eucariotes y se esperaría que se mantuvieran conservadas; por ejemplo, no se ha encontrado en el genoma de *Arabidopsis* ninguna proteína relacionada al iniciador de la muerte celular Dark (de mosca)/Apaf-1 (humano). Es importante destacar que esta proteína es el andamio central del apoptosoma y que hay muchos paralelos en las vías apoptóticas de animales y plantas; aunque otros componentes del fenómeno apoptótico de animales, no han sido identificados en plantas (por ejemplo, las caspasas). *Arabidopsis* también carece de la cadena intermediaria de la dineína, que es una proteína motora de microtúbulos involucrada en el transporte celular de moléculas cargo a lo largo de los microtúbulos. En mamíferos, la cadena intermediaria de la dineína citoplasmática desempeña un papel crucial como andamio, mediando las interacciones entre la cadena pesada y otros sustratos de la dineína; y previamente se hipotetizó, basándose en la secuencia genómica, que en *Arabidopsis* la dineína carece de cadena pesada, por lo cual se sugirió que no hay una dineína funcional en *Arabidopsis*, y que su función puede estar siendo compensada por la relativa variedad de cinesinas con dominios motores en el carboxi-terminal en esta especie (Nocker y Ludwig, 2003). Sin embargo, también se han encontrado proteínas que aparentemente no son necesarias para el metabolismo de *Arabidopsis*; por ejemplo, se identificó una proteína relacionada a la

proteína Nle (Notchless) de la mosca de la fruta que se une al dominio intracelular del receptor Notch pero al parecer *Arabidopsis* carece de este receptor, así como de otros componentes de esta vía de señalización del desarrollo (Nocker y Ludwig, 2003).

De todas las proteínas con dominios WD-40 identificadas en el genoma de *Arabidopsis*, sólo cerca de 10 han sido descritas, y se ha encontrado relación en función con sus contrapartes eucariotas (tabla 1). El hecho de que las proteínas con repeticiones WD-40 pueden interactuar con varias proteínas simultáneamente, las hace atractivas para analizar sus asociaciones con los distintos procesos celulares en plantas (Nocker y Ludwig, 2003).

Proteína de <i>Arabidopsis</i>	Proceso vegetal	Proteína representativa homóloga	Mecanismo celular básico
AGB1	Respuesta a auxinas	Gβ (humano)	Transducción de señales
COP1, SPA1	Señalización de la luz/Morfogénesis	Cop1 (humano)	Represión de los reguladores transcripcionales bZIP
FAS2	Mantenimiento del meristemo	Cac2 (levaduras)	Ensamblaje de la cromatina
FVE, AtMSII	Tiempo de floración, mantenimiento del meristemo	Msil, Hat2 (levadura)	Ensamblaje de la cromatina, acetilación de histonas
FIE	desarrollo del embrión, floración	Esc (mosca)	Represión transcripcional mediada por polipeptido
PRLI	Varias	Prp46 (levadura)	Procesamiento de RNA
FY	Tiempo de floración	Pfs2 (levadura)	Procesamiento de RNA

Tabla 1.- PROTEÍNAS CONSERVADAS CON REPETICIONES WD DE FUNCIÓN CONOCIDA. En la tabla se indican los procesos en los que participan estas proteínas, y su mecanismo celular básico en las proteínas homólogas en otros eucariotes (tabla adaptada de Nocker y Ludwig, 2003).

Los dominios WD-40 están comprendidos por aproximadamente 40 a 60 aminoácidos que son iniciados por un dipéptido de glicina-histidina (GH) de los 11 a los 24 residuos del amino terminal, y terminan con un dipéptido de triptófano-ácido aspártico (WD) en el carboxilo terminal. Entre los dipéptidos GH y WD hay una secuencia conservada de aproximadamente 40 aminoácidos (por lo que se le denominan dominios WD-40). Estas

repeticiones forman una estructura tipo β propela con 7 aspas, y cada aspa está compuesta por cuatro cadenas hoja- β plegadas antiparalelas. Cada repetición WD-40 forma las primeras tres cadenas de un aspa y la última cadena de la siguiente aspa. La última repetición WD-40 del carboxilo-terminal completa la estructura del aspa de la primera repetición WD-40 para formar la estructura de β -propela (Fig. 1).

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína con repeticiones WD-40, la subunidad β de una proteína G heterotrimérica (G_β), ha permitido asumir que esta estructura es común en todos los miembros de la familia. Esto permitió que a partir de sus secuencias se definiera la similitud de su superficie, y así, se dividieran en subfamilias (Smith, *et al.*, 1999). La estructura de β -propela contiene tres superficies potenciales de interacción: la superior, la inferior y la circunferencia (Fig. 2), y es de esperarse que los residuos de la superficie propelar coordinen interacciones con otras proteínas y/o pequeños ligandos, lo que le permite formar grandes complejos multiproteicos. La abundancia de estas proteínas sugiere que la familia se expandió y diversificó rápidamente. Este crecimiento explosivo puede reflejar la extraordinaria utilidad de esta plataforma rígida, la cual permite un alto grado de variación en las tres superficies. Muchas proteínas con repeticiones WD de función desconocida han sido designadas como "tipo- G_β ", incluso en ausencia de cualquier relación basada en secuencia o función con G_β .

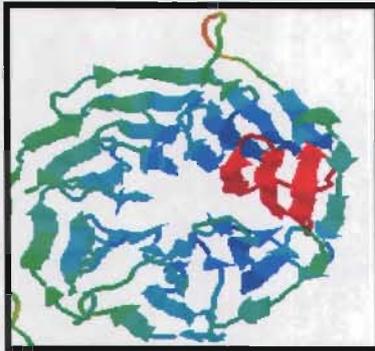


Fig. 1.- ESTRUCTURA DE β -PROPELA DE LA G_β DE UNA PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA.

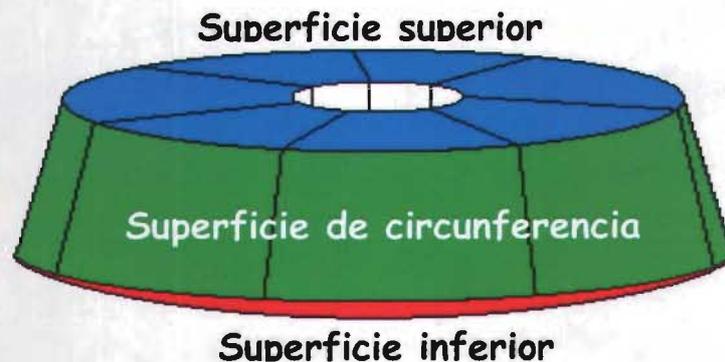


Fig. 2.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS SUPERFICIES DE INTERACCIÓN EN ESTRUCTURAS DE β -PROPELA. Figura adaptada de Smith, *et al.*, 1996.

Las funciones de las proteínas con dominios WD-40 son muy diversas; se ha observado que varias de estas proteínas están involucradas en los procesos de transducción de señales, como es el caso de $G\beta$. Sin embargo, las proteínas con estos dominios también están involucradas en otros procesos que pueden ser tan variados como procesamiento de RNA, modificación de la cromatina, regulación transcripcional, ensamblaje del citoesqueleto, formación del huso mitótico, formación y tráfico de vesículas, y en el control de varios aspectos de la división celular y la citocinesis, apoptosis, señalización de la luz y en la visión, movilidad celular, floración, desarrollo floral y organización del meristemo (Nocker y Ludwig, 2003). Proteínas con estos dominios han sido encontradas en el citoplasma o nucleoplasma, asociadas al citoesqueleto, o asociadas a membranas a través de la unión a proteínas de membrana o de interacciones con la membrana. La distribución de los dominios es también importante e indispensable para la variabilidad de las funciones desempeñadas por estas proteínas, como en el caso de $G\beta$, donde sus dominios se extienden por toda la secuencia a excepción del extremo amino. Prp4, es un factor de procesamiento de RNA que tiene dominios WD-40 distribuidos hacia el extremo carboxilo de su secuencia. La proteína Sec13 es requerida para la biogénesis de vesículas del retículo endoplásmico durante el transporte de proteínas; tiene sus dominios WD-40 distribuidos por toda su secuencia (Fig. 3). El rango de tamaño de estas proteínas va desde las pequeñas como el regulador pleiotrópico de plantas VIP3, hasta proteínas muy grandes como la proteína Lyst de mamíferos (>400 kDa) (Nocker y Ludwig, 2003).

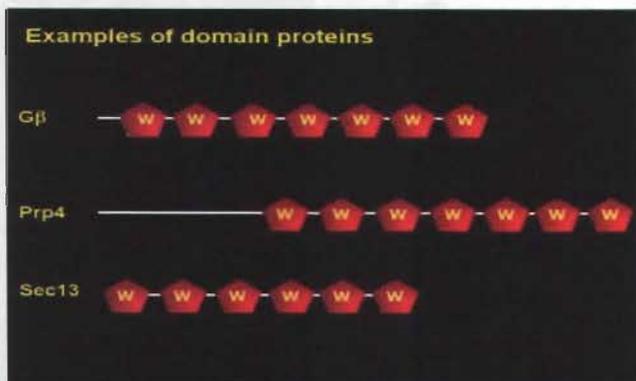


Fig. 3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS DOMINIOS WD-40 DE UNA $G\beta$, Prp4 y Sec13.

Pawson, T., 2003.

Un papel potencial para las proteínas con repeticiones WD-40 es ser componentes integrales de complejos proteicos. La partícula U3 de snoRNP, está involucrada en el procesamiento de la subunidad pequeña del RNA ribosomal; de las 28 subunidades caracterizadas de U3, no menos de 7 son proteínas con repeticiones WD-40 (Nocker y Ludwig, 2003). La proteína Pfs2 de levaduras se encuentra asociada con poli(A) polimerasa (Pap1) y con varios factores de multisubunidades en un gran complejo proteico

requerido para el procesamiento y poliadenilación del extremo 3' del pre-mRNA (Nocker y Ludwig, 2003). Dentro de este gran complejo Pfs2 interactúa directamente con subunidades específicas de dos de los factores de procesamiento, sugiriendo un papel importante de Pfs2 para la integridad del complejo. Muchas otras proteínas con repeticiones WD-40 se han encontrado en complejos relativamente estables, incluyendo el complejo de poro nuclear, el factor de transcripción general TFIID, y el complejo de la histona SET1 metiltransferasa (Nocker y Ludwig, 2003). Otro papel de las proteínas con repeticiones WD-40 es el de actuar como dominio de interacción modular de proteínas más grandes. Se cree que el papel de las proteínas con repeticiones WD-40 en estos casos es el de llevar a las proteínas y asociarlas con dominios auxiliares cerca de su blanco. Dos ejemplos en plantas son las proteínas de señalización de la luz COP1 y SPA1, que yuxtaponen las repeticiones del carboxilo-terminal con un anillo o dominio tipo cinasa, respectivamente. Otros ejemplos de dominios auxiliares vistos en proteínas con repeticiones WD-40 de levaduras, animales o plantas incluyen el F-box, dominio SET, y bromodominio (Nocker y Ludwig, 2003).

III.1 PROTEÍNAS CON DOMINIOS WD-40 EN PLANTAS

Los dominios WD-40 están ampliamente distribuidos en organismos eucariotes. En plantas se han identificado ya algunas de las proteínas que los contienen y se ha observado que sus funciones son muy variadas.

III.2 SPA (*Suppressor of Phytochrome A*): Las proteínas SPA de *Arabidopsis* (SPA1, 3 y 4), reprimen la fotomorfogénesis en plántulas crecidas en presencia de luz. SPA2 se localiza en el núcleo y puede interactuar con el represor COPI, además de ser un represor potente de la fotomorfogénesis solo en la obscuridad. Todas estas proteínas incluyendo a COPI presentan dominios WD-40, lo que puede ser un indicativo de que estos dominios desempeñan un papel central importante en la supresión de la fotomorfogénesis en *Arabidopsis* (Laubinger *et al.*, 2004).

III.3 COP I (*Constitutive Photomorphogenesis I*): La respuesta de etiolación de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en la obscuridad es mediada en parte por COPI, un represor de la transducción de señales de la luz. COPI se localiza en el núcleo y posee actividad de ubiquitina ligasa E3, probablemente en conjunto con proteínas que interactúan con esta (CIP8 y SPA). COPI contiene cuatro segmentos completos y dos medios de repeticiones WD-40 en el carboxilo-terminal, así como dos motivos de dedos de zinc en la región amino-terminal (Kwak *et al.*, 1997). Esta además contiene un péptido señal bipartita en el cual existe un dominio de localización nuclear y un dominio de 110 aminoácidos de localización citoplásmica o CLS (por sus siglas en inglés: Cytoplasmic Localization Signal); este último dominio es el responsable de la exclusión nuclear de COPI en un proceso acelerado por la luz (Subramanian *et al.*, 2004). La forma en que esta proteína

participa en la respuesta etiolada de las plántulas es uniéndose al dominio PAS del receptor del fitocromo (phyA) con su dominio WD-40, para ubiquitinarlo con su actividad de ubiquitina ligasa E3 y posteriormente ser degradado (Seo *et al.*, 2004).

III.4 G_β: Es el ejemplo más representativo de proteínas con dominios WD-40. En plantas se han identificado dos genes en avena (Jones *et al.*, 1998), y en *Nicotiana plumbaginifolia* (Kaydmov *et al.*, 2000). En algunas especies tetraploides o hexaploides como soya y tabaco se han encontrado de dos a tres genes para esta subunidad (Obrdlik *et al.*, 2000). En el caso de *Arabidopsis*, solo un gen codificante para esta subunidad ha sido identificado. Las subunidades G_β de plantas tienen dos estructuras particulares, una secuencia amino terminal que forma interacciones "coiled-coil" y siete repeticiones del dominio WD-40, lo cual ha sido observado en las subunidades G_β de mamíferos. En el modelo clásico de función de las proteínas G heterotriméricas, G_β siempre está asociada a G_γ a través de una fuerte interacción "coiled-coil" lo que la mantiene en la región membranal ya que G_γ tiene un grupo prenil en el carboxilo-terminal que la asocia a la membrana. La subunidad G_α está anclada a membranas a través de un sitio miristoil o palmitoil en la parte media del amino terminal; así, esta y el dímero G_{βγ} interactúan para mantenerse en estado inactivo. Cuando un GPCR es activado, activa a su vez al heterotrímero disociándose en G_α y dímero G_{βγ}; así, ambos componentes pueden transducir la señal a moléculas blanco. Un ejemplo es AG_{β1} que media la atenuación de la señalización de auxinas actuando como regulador negativo de la división celular (Ullah *et al.*, 2003), y como regulador del desarrollo de hojas, flores y frutos (Lease *et al.*, 2001). G_β se asocia con por lo menos 14 proteínas diferentes a G_γ, incluyendo fosfolipasas, adenilato ciclasas, y canales iónicos (Nocker y Ludwig, 2003).

III.5 Homólogos de RACK1: En plantas se identificó por medio de un tamizado diferencial una proteína con dominios WD-40 en células en suspensión de tabaco tratadas con auxinas sintéticas (2,4-D o ácido diclorofenoxiacético) y sin estas. El cDNA del gen de respuesta a auxina para esta proteína fue aislado 4 h después de la adición del 2,4-D. La proteína pesa 35.8 kDa y fue llamada *arcA* (por sus siglas en inglés: *auxin-regulated gene from cultured cells*). Inicialmente se encontró en los bancos de datos que esta proteína era homóloga a genes estructuralmente relacionados con G_β (Ishida *et al.*, 1993); sin embargo se determinó que el gen *arcA* de plantas es homólogo al gen RACK (por sus siglas en inglés: *Receptor for Activated Protein Kinase C*) de animales que inicialmente fue aislado de cerebro de rata y se compone de siete repeticiones WD-40 (Ron *et al.*, 1994). *In vivo*, RACKs de animales anclan y translocan a la proteína cinasa C activa (PKC) a dominios específicos de la membrana próximos a proteínas sustrato, y consecuentemente promueven la fosforilación del sustrato. En plantas aún no se han aislado genes para PKC, sin embargo la existencia de homólogos a RACK sugieren la presencia de proteínas similares a esta proteína cinasa en plantas.

Desde la identificación de arcA en tabaco, se han identificado homólogos en alfalfa (Msgb1, por sus siglas en inglés: *Medicago sativa* G_β-like) (McKhann *et al.*, 1997), *Arabidopsis* (AtarcA), arroz (RWD, por sus siglas en inglés: *rice protein containing the WD-40 repeat*) (Iwasaki *et al.*, 1995), y *Brassica napus* (BGB1) (Kwak *et al.*, 1997). La función que estas proteínas desempeñan en plantas podría ser similar a la de RACK1 en animales; por ejemplo, BGB1 de *B. napus* inhibe la maduración mediada por insulina de oocitos de *Xenopus laevis* cuando es expresada en estos. Esta vía es mediada por PKC, y la inhibición va acompañada de la reducción de PKC en la fracción membranal, como en el caso de RACK1 de mamíferos. Estos datos indican que BGB1 comparte algunas características funcionales comunes con RACK1 de mamíferos, sugiriendo que algunos procesos celulares relacionados a RACK1 puedan estar operando en plantas (Kwak *et al.*, 1997). Por otro lado, estas proteínas también se han visto involucradas en las vías de transducción de señales mediadas por hormonas, típicamente todas estas proteínas responden a auxinas a excepción de Msgb1 de *M. sativa* que es inducida por el tratamiento de las raíces con citocininas, y participa en la división celular de primordio y meristemas que darán lugar a los nódulos en respuesta a *R. meliloti*. El hecho de que arcA pueda compartir funciones entre animales y plantas, y pueda ser un regulador directo entre las respuestas a auxinas y el ciclo celular, la hace una proteína de interés para estudiar su función en las vías de señalización en las que participa.

IV. ANTECEDENTES

En plantas, cada vez se conoce más información referente a los procesos involucrados en su metabolismo celular; más aún, ahora se conocen algunos de los componentes de las vías de señalización que participan en su desarrollo y lo interesante es que tienen a sus contrapartes homólogas en sistemas animales y/u otros eucariotes, lo que ha dado lugar a sugerir sus funciones.

El enfoque inicial del proyecto fué identificar proteínas que participan en las vías de transducción de señales y su relación con el citoesqueleto en el eje embrionario de *Phaseolus vulgaris*. Por esta razón se utilizaron anticuerpos que reconocen a una proteína que se une a profilina, ya que se sabe que esta última interactúa con el citoesqueleto. Mediante análisis por *western blot* con estos anticuerpos se identificó una proteína de 36 kDa (p36), que fué enriquecida y secuenciada. La secuencia de los péptidos parciales de p36 reveló tener identidad con la subunidad β de una proteína G-heterotrimérica de *Glycine max* (San Román Roque, 2001) (Fig. 4). El péptido que presentó mayor identidad (AIATPIDNSD), fué utilizado para hacer anticuerpos que reconozcan específicamente a p36 (Fig. 5). Las secuencias de los péptidos parciales y su identidad con la secuencia de la probable G_{β} de *Glycine max* se utilizaron para diseñar los oligonucleótidos que permitieron amplificar por RT-PCR y RACE 3' un fragmento de 742 pb's del cDNA que codifica para p36. El alineamiento de esta secuencia con la de la probable G_{β} de *Glycine max* dió un 89% de identidad a nivel de nucleótidos (Fig. 6), y un 96% de identidad a nivel de aminoácidos (Fig. 7) (Islas-Flores, T. 2002).

⌘ 1	AHTDVVTAIATPIDNADMIVTASR 24	1	FSPSTLQPTIVSASWDR 17	
	AHTDVVTAIATPIDNADMIVTASR		FSPSTLQPTIVSASWDR	
❖13	AHTDVVTAIATPIDNADMIVTASR 36	157	FSPSTLQPTIVSASWDR 173	
⌘	1	LWDLAAGTSAR 11	1	IWDLESK 7
		LWDLAAGTSAR		IWDLESK
❖	89	LWDLAAGTSAR 99	259	IWDLESK 265

Fig. 4.- ALINEAMIENTO DE LOS CUATRO PÉPTIDOS PARCIALES DE p36 OBTENIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS. p36 de *P. vulgaris* (⌘) y G_{β} de *Glycine max* (❖). La secuencia intermedia es la secuencia consenso. Los números a los lados de las secuencias corresponden al del aminoácido.

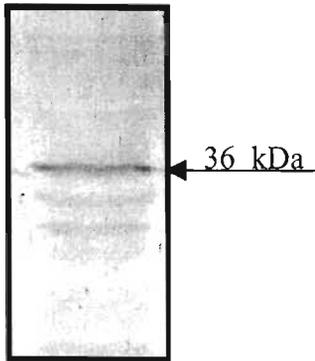


Fig. 5.- INMUNODETECCIÓN DE p36 PRESENTE EN EXTRACTOS PROTEICOS DE EJES EMBRIONARIOS DE *Phaseolus vulgaris*. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-PA218. La flecha indica la posición de migración de la proteína, que pesa 36 kDa.

FRIJOL	1	GTTTGGCCTCTCCGGCTCCTGGGACGGCGAA ACT CCGCCTCTGGGACCT TGCCGCGGCAC	60
SOYA	232	GTTCCGCCTCTCCGGCTCCTGGGACGGCGAG CT CCGCCTCTGGGACCT CGCGGCTGGCAC	292
FRIJOL	61	TTCCGCGCGCCGCTTTGT CGGCCACACCAAGGACGTGCTCTCCGTGGCGTTCTCCATCGA	120
SOYA	293	CTCTGCCGCGCCGCTTCGT TGGCCACACCAAGGACGTGCTCTCCGTGGCGTTCTCCATCGA	352
FRIJOL	121	CAACCGTCAGATCGTGTCCGG CTC ACGTGACCGCACGATCAAGCTGTGGAACACCCT TGG	180
SOYA	353	CAACCGTCAGATCGTGTCCGG CTC TCTGTGACCGCACGATCAAGCTGTGGAACACCCT GGG	412
FRIJOL	181	TGA AT GCAAGTACACCATTCAAG CA CGCGAC GC TCATTCT TG ATTGGGT TAG CTGCGT GCG	240
SOYA	413	TGAGT GCA AGTACACA AT CCAAG TG GGCGAT GCG CATT CG ATTGGGT AAG TGCGT CCG	472
FRIJOL	241	TTT CAG CCCC CAG CAC GC TT CAG CC GA CTATTGT GT CTGCAT CT TGGGAC CGT ACTGT GAA	300
SOYA	473	TTT CAG CCCC TAG CA CT CTT CAG CC AA CCATTGT TT CTGCT TC ATGGGAC AGG ACCGT TAA	532
FRIJOL	301	GGT AT GGA AT CT CAC GA ACT G CAA ACTGAG AA ACACT CT TGCTGGACAC AGT GGGTATGT	360
SOYA	533	GGT TT GGA AC CT GAC CA ACT G CA AGCTGAG GA ACACC CT TGCTGGACACA AT GGGTATGT	592
FRIJOL	361	GA AC ACTGTTGCTGTT TT CCCGATGG TT CTCT TT GGCCAGTGGCGGG AA AGATGG AGT	420
SOYA	593	GA AT ACTGTTGCTGTT TT CC CT GATGG CT CTCT CT GTGCCAGTGGTGG CAA AGATGG GGT	652
FRIJOL	421	TAT TT TGCTGTGGGATTTGGCTGAGGGTAAGCGTCTTACTCTCT TG ATGCTGGCT CTAT	480
SOYA	653	TAT TT CTCTGTGGGATTTGGCTGAGGGTAAGCGTCTTACTCTCT CG ATGCTGGCT CAAT	712
FRIJOL	481	TATCCATGC CT CTGCTT CAGT CC CA ACAGG TACT GGCT GT GCGCCGCCACCGAGCAGAG	540
SOYA	713	CAT CCATGC ACT CTGCTT CAG CC CA GCAGG TACT GGCT CT GCGCCGCCACCGAGCAGAG	772
FRIJOL	541	CATCAAGATCTGGGATTTGGAGAG TAA AGATATCGTTGAGGATTTGAAGGT AG ACCTCAA	600
SOYA	773	CATCAAGATCTGGGATTTGGAGAG CA AGATATCGTTGAGGATTTGAAGGT TG ACCTCAA	832
FRIJOL	601	GACTGAGGCTGATGG TACC AC---TGTTGG AA AC CA AA CA AAAGAGGTTAT CT ATTG	657
SOYA	833	GACTGAGGCTGAT GCC AC CT CCCGTGGTGG TAA CG CA CA CA GAAGAGGTTAT TT ATTG	892
FRIJOL	658	TAC GAGTTTGA ACT GGAGTGC GG ATGGAAGCACTTT CT TTAGTGG TATA CCGATGG CGT	717
SOYA	893	CAC AGTTTGA ACT GGAGTGC GG ATGGAAGCACTTT GT TTAGTGG TATA CCGATGG TGT	952
FRIJOL	718	GG TC AGAGTTTGGG CA ATTGGACGTTATTAGG	742
SOYA	953	GG CC AGAGTTTGGG CT ATTGGACGTTATTAGG	984

Fig. 6.- ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTENIDAS A PARTIR DE EJES EMBRIONARIOS DE *Phaseolus vulgaris*, CON LA SECUENCIA DE LA PROBABLE G_β DE *Glycine max*. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa *BLAST* (Tatusova y Madden, 1999). Las secuencias obtenidas de frijol tienen un 89% de identidad con la secuencia de soya. La secuencia completa de soya mide 978 pb's. La secuencia de p36 (frijol) está alineada con la secuencia de la probable G_β de *Glycine max*. Las letras en negritas indican las diferencias entre las secuencias de frijol y la secuencia de soya. Las líneas punteadas indican la inserción o delección de tres bases en las secuencias de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*.

Frijol 1	LSGSWDGELRLWDLAAGTSARRFVGHTKDVLSVAFSIDNRQIVSASRDRTIKLWNTLGEC 60	
	LSGSWDGELRLWDLAAGTSARRFVGHTKDVLSVAFSIDNRQIVSASRDRTIKLWNTLGEC	
Soya 79	LSGSWDGELRLWDLAAGTSARRFVGHTKDVLSVAFSIDNRQIVSASRDRTIKLWNTLGEC	138
Frijol 61	KYTIQSDAHSWVSCVRFSPSTLQPTIVSASWDRTVKVWNLTNCKLRNTLAGHSGYVNT 120	
	KYTIQD- DAHSWVSCVRFSPSTLQPTIVSASWDRTVKVWNLTNCKLRNTLAGH+GYVNT	
Soya 139	KYTIQDGAHSWVSCVRFSPSTLQPTIVSASWDRTVKVWNLTNCKLRNTLAGHNGYVNT 198	
Frijol 121	VAVSPDGSLCASGGKDGVILLWDLAEGKRLYSLDAGSIIHALCFSPNRYWLCAATEQSIK 180	
	VAVSPDGSLCASGGKDGVILLWDLAEGKRLYSLDAGSIIHALCFSP+RYWLCAATEQSIK	
Soya 199	VAVSPDGSLCASGGKDGVILLWDLAEGKRLYSLDAGSIIHALCFSPSRYWLCAATEQSIK 258	
Frijol 181	IWDLESKSIVEDLKVDLKTEADGTT-GGNTNKKKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDGVVR 239	
	IWDLESKSIVEDLKVDLKTEAD-T+-GGN-NKKKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDGV-R	
Soya 259	IWDLESKSIVEDLKVDLKTEADATSGGNANKKKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDGVAR 318	
	Frijol 240 VWAIGRY 246	
	VWAIGRY	
	Soya 319 VWAIGRY 325	

Fig. 7.- ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS OBTENIDA A PARTIR DE EJES EMBRIONARIOS DE *Phaseolus vulgaris* CON LA SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD β DE UNA PROTEINA G HETEROTRIMERICA DE *Glycine max*. El alineamiento se llevó a cabo con el programa *BLAST* utilizando la secuencia de aminoácidos traducidos de la secuencia nucleotídica, obtenida de los extractos de RNA total de ejes embrionarios de *P. vulgaris*. La secuencia obtenida de frijol tiene un 96% de identidad con la secuencia de soya. La secuencia intermedia es la secuencia consenso.

IV.1 Hipótesis

El embrión debe cumplir con muchas funciones puesto que de este depende el desarrollo y crecimiento de una planta completa; consecuentemente este tejido debe tener todos los elementos necesarios para llevar a cabo los procesos de transducción de señales que son fundamentales para los eventos que ocurren en la germinación. Por lo que la germinación es un modelo útil para estudiar a los elementos que participan en la transducción de señales y que permiten que a partir de una semilla se forme una plántula autótrofa. La secuencia en aminoácidos de p36 de *P. vulgaris* presenta siete dominios WD-40, lo que indica que puede adquirir una estructura de β -propela. Esta estructura podría entonces permitirle interactuar con muchas otras proteínas para participar activamente en las vías de transducción de señales y/u otros mecanismos celulares. Sin embargo, es probable que p36 integre algunas vías de señalización durante la germinación, ya que en esta etapa se disparan muchos mecanismos (señalización celular activa), que permiten que se lleven a cabo los procesos necesarios (división, elongación, diferenciación celular, etc.) e indispensables para la germinación.

IV.2 Objetivo

Con base en antecedentes acerca de la identificación de proteínas homólogas a p36 en sistemas vegetales y su posible función en la transducción de señales, el objetivo del presente trabajo es caracterizar a p36 y analizar sus niveles de mRNA durante la germinación de *Phaseolus vulgaris*, así como analizar el número de genes que codifican a esta proteína.

V. METODOLOGÍA

V.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron embriones de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. variedad negro Jamapa. Las semillas fueron desinfectadas con cloro comercial al 10%, se enjuagaron con abundante agua tridestilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los embriones fueron escindidos de forma manual, y se utilizaron para la extracción de proteínas.

Para el caso de la extracción de DNA se utilizaron hojas de frijol o tallos de 15 días y raíces de 72 h de imbibición.

V.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se hizo una harina triturando los embriones secos, se resuspendió en buffer PBS-C: 0.14 M NaCl, 0.0014 M NaH₂PO₄, 0.0036 M Na₂HPO₄, pH 7.5 (PBS), adicionada con un coctel comercial de inhibidores de proteasas (Complete™, Roche), en una relación de 0.05 g de harina por 250 µl de PBS-C y se incubó por 5 min con agitación a 4°C. Cuando la mezcla quedó totalmente hidratada y bien resuspendida, se centrifugó para eliminar el material insoluble. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20 °C. Algunas veces se utilizó el PBS-C con 0.05 % de Tritón-X100 con la finalidad de extraer también algunas proteínas solubles de membrana.

V.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)

Los extractos de proteína fueron analizados por electroforesis en geles de 12% de poliacrilamida desnaturante. Cada extracto de proteína fué mezclado en un volumen de una solución de Laemmli 2X (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% [p/v] dodecil sulfato de sodio (SDS), 20% [v/v] glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol (β-ME), 0.2% [p/v] azul de bromofenol) (Laemmli, 1970), e incubado 5 min a 95°C. En algunos casos las proteínas se precipitaron con 15% ácido tricloroacético (TCA). Las proteínas se separaron en geles discontinuos a 25 mA de corriente constante.

V.4 ELECTROTRANSFERENCIA

Cuando las proteínas se separaron en el gel, este se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C extra; Amersham), y se transfirió mediante una corriente eléctrica en una cámara de transferencia húmeda (BioRad) a 300 mA por 1-2 h. Después de la transferencia, la membrana se tiñó con una solución de 0.1% rojo de Ponceau en 1% ácido acético para verificar la transferencia. Las membranas fueron desteñidas para llevar a cabo las inmunodetecciones.

V.5 ANTICUERPOS E INMUNODETECCIÓN

Para los análisis por *western blot* se utilizó un anticuerpo levantado en conejo contra el péptido AIATPIDNSD que fué denominado anti-PA218. Alternativamente, en algunos casos se probó la reacción cruzada de anticuerpos anti-RACK1 levantados contra una proteína recombinante que corresponde a los aminoácidos 131-317 de RACK1 de humano. Para algunos análisis se utilizaron anticuerpos anti-histidinas (Qiagen) y los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo o anti-ratón conjugados a fosfatasa alcalina (Zymed) o anti-conejo conjugado a peroxidasa (Zymed) para detección por quimioluminiscencia. La preparación de los anticuerpos anti-péptido de la proteína p36, en conejo y ratón se explica más adelante. Las membranas de nitrocelulosa en las cuales se transfirió el gel de poliacrilamida, se pusieron en una solución de bloqueo (3% albúmina de suero bovina [BSA] disuelta en PBS). Se incubó con esta solución durante 1 h a 50°C. Se adicionó el anticuerpo primario diluído en una solución de PBS y 0.05% Triton X-100 (PBS-T). Se incubó toda la noche con agitación a 4°C seguido de tres lavados de 15 min con PBS-T, se adicionó el anticuerpo secundario asociado con fosfatasa alcalina y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó tres veces con PBS-T y una última vez con PBS, se reveló con 0.6 mM Nitro-azul de tetrazolio (NBT) y 0.07 mM 5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato (BCIP) los cuales son sustratos de la fosfatasa alcalina, en una solución de 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 9.5. A este método se le llama también *western blot* (Towbin *et al.*, 1979).

V.6 TINCIÓN DE GELES CON AZUL DE COOMASSIE

Los geles se tiñeron con una solución de azul de coomassie R-250 (0.1%) en agua:metanol:ácido acético glacial (5:5:2) con agitación por un mínimo de 1h. El gel se destiñó con una solución de 50% metanol, 10% ácido acético [v/v]. Este tipo de tinción tiene sensibilidad para visualizar proteínas con una concentración de 0.5 µg en el gel.

V.7 COLUMNA DE AFINIDAD

Para hacer una columna de afinidad con los anticuerpos anti-PA218, primero se requirió de purificar el anticuerpo contenido en el suero. Para ello se utilizó Proteína A (que tiene afinidad por el fragmento Fc de los anticuerpos), acoplada a Sefarosa CL-4B (Sigma), la resina se hidrató con 0.1 M Tris, pH 8, y se empacó en una columna; antes de pasar el suero (3.5 ml) se lavó la columna con 0.1 M Tris, pH 8; se colectó lo que no se pegó, se lavó la columna y se eluyó con 500 µl de 0.01 M Glicina-HCl, pH 3 hasta colectar 12 fracciones que se neutralizaron inmediatamente a pH 7.5 (todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C). Las fracciones así como lo que no se pegó a la columna fueron analizadas en un gel de poliacrilamida. El anticuerpo ya purificado fué dializado contra un buffer de 0.1 M NaHCO₃, pH 8 y 0.5 M NaCl.

Para hacer la columna de afinidad con los anticuerpos anti-PA218, se hidrataron 0.3 g de Sefarosa activada con Bromuro de Cianógeno (Sigma) en un tubo con 3.5 ml de 10 mM

HCl por 15 min a 4°C. Se retiró el HCl y se lavó la resina con 14 ml de 0.1M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8, y se adicionó el anticuerpo purificado a la resina. Esta mezcla se dejó incubando toda la noche a 4°C en agitación lenta. Se recuperó la fase líquida y se lavó tres veces la resina con 0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8, y tres veces con 0.3 M Tris y 1.9 M Glicina, pH 8, se incubó la resina con este buffer por 4 h a 4°C y se empacó en una columna. La columna ya empacada se lavó con 2 ml de 0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8 y dos veces con 0.1 M acetato de sodio, pH 4; se equilibró la columna con 30 ml de PBS-C, pH 7.5. Se pasó el extracto de 1 g de harina de eje embrionario, hecho con PBS-C pH 7.5, dos veces por la columna. Se dió un lavado a la columna con 60 ml de PBS-C, pH 7.5. La elución se llevó a cabo con 3 ml de 0.01 M Glicina-HCl, pH 3, y se colectaron fracciones de 500 µl en tubos que contenían 150 µl de 1M Tris, pH 8. Se precipitaron 2 ml de la colecta con TCA y este precipitado se analizó por *western blot*. Los anticuerpos anti-PA218 reaccionaron con una proteína de menor peso molecular al esperado, por lo cual se procedió a inmunopurificar anticuerpos contra esa proteína para ensayar en *western blot* contra p36. Para ello se cortó la banda y se lavó con 6 M Urea y 2% SDS para eluir el anticuerpo pegado, luego se reequilibró en PBS y se incubó con el antisuero que contiene el anticuerpo anti-PA218 con 3% BSA en PBS-0.05% Triton X-100, pH 7.5. La elución del anticuerpo pegado a la banda se llevó a cabo con 0.01 M Glicina-HCl, pH 3 que se neutralizó con 1 M Tris, pH 8.

V.8 ANÁLISIS DE EXTRACTOS NATIVOS Y DESNATURALIZADOS

Se hicieron extractos de proteínas de ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris* con PBS-C y se tomaron 5 alícuotas; todas las alícuotas se diluyeron 1:1 con el buffer de carga nativo (1M Tris, 2% Glicerol, y azul de bromofenol, pH 8,), a la segunda alícuota se le adicionó 1% SDS, a la tercera alícuota se le adicionó 2.5 % SDS, a la cuarta y quinta alícuota se le adicionó 2.5% SDS y 1% β-ME. Sólo la quinta alícuota fué hervida a 95°C por 5 min. Todas las alícuotas se corrieron en un gel nativo de un gradiente de concentración (4-20% Tris-HCl, BioRad) se transfirió a una membrana, y se realizó una inmunodetección con anticuerpos anti-PA218.

V.9 DOT-BLOT

Para obtener más evidencia de si los anticuerpos reconocen a la proteína en forma nativa, se hicieron ensayos de *dot-blot*. Se prepararon muestras de extractos proteicos de ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris* con 1% SDS, 2.5% SDS, y 2.5% SDS más 1% β-ME, hervido y sin hervir, a 95°C por 5 min (ver ensayo anterior). En una membrana cuadrículada, se puso una gota de cada muestra, y se bloqueó con 3% BSA en PBS-T. El *western blot* se hizo con anticuerpos anti-PA218 (purificados en columna de Proteína A).

V.10 CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Phaseolus vulgaris*

Se tomaron semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Jamapa y se lavaron por 15 min con una solución al 10% de cloro comercial, se lavaron tres veces con agua esterilizada y una vez brevemente con alcohol industrial; se dieron tres lavados con agua esterilizada y se escurrieron. En la campana de flujo laminar con mechero encendido se tomaron charolas con toallas absorbentes esterilizadas y se les puso agua esterilizada, o en su caso, los tratamientos (50 mM IAA, 25 mM 2,4-D y 25 mM NPA); entonces se fueron poniendo las semillas separándolas hasta llenar la charola, se cubrió con papel aluminio y se dejaron incubando a temperatura ambiente.

Los tejidos fueron extraídos, escindiendo el eje embrionario hasta el tiempo de 40 h, después de este tiempo se escindió la plántula y se cortó por la mitad (el corte se hizo en la parte media del hipocotilo); inmediatamente después de extraer los tejidos, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C .

Los tiempos tomados para el análisis de los tejidos fueron los siguientes: 8, 12, 20, 32, 40 h y se tomó el hipocotilo-ápice de las 48 h para todos los tratamientos.

Estos tejidos fueron procesados para analizar los cambios en los niveles de acumulación de p36 a nivel de mRNA.

V.11 WESTERN BLOT DE LA CINÉTICA DE GERMINACIÓN

Con los tejidos obtenidos de la cinética de germinación se hicieron extracciones de proteínas solubles (ver método de extracción). Se recuperó el sobrenadante y se midió la concentración de cada extracto y se tomaron 20 μg (la fracción soluble en un volumen de buffer de Laemmli), y se incubaron 5 min a 95°C . Las muestras desnaturalizadas fueron analizadas en geles de 12% de poliacrilamida que fueron teñidos con azul de coomassie, o transferidos a una membrana de nitrocelulosa (HybondTM-C Extra) para *western blot* con anticuerpos anti-PA218.

V. 12 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE FRIJOL

Se colectaron hojas de frijol de 15 días y se sumergieron en nitrógeno líquido inmediatamente para congelarlas a -70°C . Para la extracción del DNA genómico, se pesaron 1.8 g de tejido, este se pasó a nitrógeno líquido y se pulverizó en un mortero. La harina se puso en tubos Falcon y se le adicionaron 2 ml de buffer de extracción precalentado a 65°C (1% sarcosil, 0.8 M NaCl, 0.5 M EDTA (pH 8.0), 2 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.8% CTAB, 0.14 M manitol), además de 2.8 μl de β -ME y 2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se incubó a 65°C por 10 min agitando periódicamente y se centrifugó a 2,500 g por 5 min a temperatura ambiente. La fase superior se recuperó y se le adicionó 1 volumen de isopropanol frío; se mezcló y centrifugó a 2,500 g por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el precipitado y se resuspendió en 1.3 ml de 1 M CsCl y se le adicionó enseguida 2.6 ml de 100% etanol (en este paso se precipita el DNA). Se centrifugó a 3,500 g por 10 min a temperatura ambiente, se recuperó el precipitado y se

resuspendió en 833 μ l de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5); una vez mezclado perfectamente se adicionaron 10 μ l de RNAsa (10 mg/ml) y 200 μ l de 5 M NaCl. Se dividió el volumen en dos tubos eppendorf y se adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1); se agitó por 5 seg y se centrifugó a 6,500 g por 5 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase superior; finalmente se le adicionaron 500 μ l de cloroformo (para eliminar los residuos de fenol) y se centrifugó 5 min a 6,500 g. Se recuperó la fase superior y se le adicionaron 500 μ l de 70% de etanol y se mezcló por inversión, se incubó por 5 min a 4°C. Se centrifugó a 6,500 g por 10 min (el lavado con etanol se realizó tres veces). Se retiró todo el etanol y se dejó secar el precipitado por 10 min; la pastilla se resuspendió en 50 μ l de agua destilada. El DNA se guardó a -20°C.

V.13 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE SEMILLAS DE FRIJOL

Debido a la alta susceptibilidad del RNA a degradación por RNAsas, el material utilizado para su extracción y manipulación debe ser esterilizado y tratado con DEPC (dietil pirocarbonato; [Sigma]), que es un agente inhibidor de la actividad de las RNAsas.

Las semillas de frijol se lavaron brevemente con agua estéril tratada con DEPC y se pusieron a secar. Los embriones se escindieron y se pusieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Los morteros en los que se vaciaron los embriones se enfriaron y estos se molieron rápidamente hasta hacer una harina, la cual se puso en tubos eppendorf de 1 ml. A la harina en los tubos se le adicionó 1 ml de Trizol, se agitó vigorosamente el tubo y se dejó incubando 45 min a temperatura ambiente, entonces se les adicionó 0.3 ml de cloroformo, se agitó y se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 7,000 g durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionó 0.5 ml de isopropanol y se dejó incubando 5 min a 4°C y 20 min a -20°C; se centrifugó a 7,000 g durante 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 ml de 75% etanol, se agitó (vortex) hasta despegar la pastilla y se centrifugó a 7,000 g durante 10 min a 4°C; se desechó el etanol y se puso a secar la pastilla por 10 min, entonces se le adicionaron a la pastilla 2.5 M cloruro de litio para precipitar DNA y carbohidratos y se agitó suavemente (la pastilla) para disolverla; se tomó el sobrenadante y se incubó a -20°C por 20 min para precipitar el RNA, y se centrifugó a 7,000 g por 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 50 μ l de agua-DEPC y se resuspendió la pastilla.

Para evitar la rápida degradación del RNA extraído con trizol, también se hicieron extracciones de RNA total con el método de Tiocianato de guanidina, (Chomczynski y Sacchi, 1987). A 0.05 g de harina de ejes embrionarios, se adicionaron 300-500 μ l de solución de extracción de RNA (4 M Tiocianato de guanidina; 25 mM Citrato de sodio, pH 7.5, 0.5% Sarcosil y 0.1 M β -ME), 100 μ l de Acetato de sodio 2 M, 300-500 μ l de Fenol, y 100 μ l de Cloroformo-Alcohol isoamílico (49:1); la mezcla se resuspendió por 10 min, se incubó 15 min a 4°C y se centrifugó a 10,000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó 500 μ l de isopropanol, se precipitó a -20°C por 1 h y se centrifugó a 10,000 g por 20 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 150 μ l de

solución de extracción y se adicionó 1 volumen de isopropanol, se dejó precipitando 1 h a 20°C y se centrifugó a 10,000 g por 20 min, el precipitado se lavó tres veces con etanol al 75% y la pastilla se resuspendió en agua-DEPC. Se hicieron alícuotas que se congelaron a -70°C.

V.14 ELECTROFORESIS DE RNA Y DNA EN GELES DE AGAROSA

Los geles para RNA se prepararon con una concentración de 1.4% de agarosa en 30 ml de MOPS 1X [(3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico (MOPS) y 1 mM de EDTA, el buffer se ajustó a pH 7], 6.5 % de Formaldehído y 0.003% de bromuro de etidio, y las muestras se prepararon con 5 µl de RNA, 5 µl de buffer de carga (50% glicerol y 1% azul de bromofenol) y 16.5 µl de buffer de mezcla (MOPS 10X, 6.65% formaldehído, 50% formamida, buffer de carga y H₂O); esta preparación se calienta a 65°C por 5 min y se carga en el gel. La corrida se llevó a cabo a 60 V durante 1 h. El bromuro de etidio, es un compuesto que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y que a la longitud de onda de la luz UV se excita produciendo energía luminosa, de esta forma podemos observar nuestras preparaciones de RNA.

Los geles para DNA se prepararon con 0.8%-2% de agarosa en buffer TAE pH 8.5 (0.04 M Tris-Acetato, 0.11% ácido acético glacial y 0.001 M EDTA), con 0.003% bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 100 V por 1 h y se analizaron en un transiluminador de luz UV.

V.15 MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS

Para el marcaje radioactivo de sondas de DNA se utilizó un fragmento de 500 pb's producto de una reacción de PCR con los oligonucleótidos Fwd1 (ctctcatccgacggta) y Rv1 (tccatgcactctgctca), y un fragmento de 940 pb's, obtenido con los oligonucleótidos Fwd2 (cacaccgacgtcgtga)-Rv3' (ataacgtccaattgcccaaac). Se utilizaron aproximadamente 25 ng de cDNA (500 y 940 pb's) y se llevaron a un volumen final de 46-48 µl con TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA). La sonda para marcar se incubó a 100°C por 10 min y se transfirió a 4°C. La mezcla se pasó a un tubo con la solución de reacción (estuche Rediprime™ II; Amersham), y se adicionaron 2-4 µl de (alfa-³²P) dCTP (20-40 µCi). El tubo se incubó 30 min a 37°C, y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. El DNA marcado se precipitó adicionando 300-500 µl de Magic probe (0.1 mg/ml DNA de esperma de salmón, 10 mM EDTA, 2.5 M NH₄C₂H₃O₂) y 200-500 µl de isopropanol, e incubando por 15 min a temperatura ambiente y 2 h a 4°C. Se centrifugó a 7,000 g por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó el precipitado. La pastilla se resuspendió en 20-40 µl de 0.1 M NaOH y se hirvió a 95°C por 10 min para desnaturalizar la doble cadena de DNA antes de añadirla al tubo de hibridación.

V.16 NORTHERN BLOT DE LA CINÉTICA DE GERMINACIÓN

Para llevar a cabo la transferencia del RNA separado en el gel de agarosa, primero se le hicieron dos lavados de 10 min cada uno con MOPS 1X, un lavado breve con 10X SSC (3 M NaCl, 0.3 mM Citrato de sodio), y 20X SSC. El gel de agarosa se colocó sobre un vidrio con dos papeles filtro (Whatman) del tamaño del gel, sobre el gel se colocó una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) que fué cubierta por tres capas de papel filtro y por varias capas de toallas de papel absorbente. Sobre el ensamblaje se colocó un peso de aproximadamente 1 Kg y se mantuvo en contacto con una solución de 10X SSC. La transferencia se dejó por 24 h; posteriormente se lavó la membrana con una solución de 0.04 N NaOH por 3 min, seguido de 2X SSC por 5 min. La membrana se guardó a -20°C.

La membrana con el RNA transferido se colocó en un tubo con la solución de prehibridación (3.5 ml 20% SDS, 5.2 ml 1 M NaH₂PO₄, pH 7.2 combinado con 10.2 µl 0.5 M EDTA, pH 8, 1.3 ml H₂O tridestilada, 0.01 g BSA), y éste a su vez se colocó en un horno de hibridación a una temperatura de 55°C en agitación continua por 1 h. Se agregó la sonda marcada radioactivamente para incubar por 24 h a 55°C. Al término de este tiempo, se eliminó la solución con la sonda marcada radioactivamente de la membrana de nylon y se añadió la solución SSC 4X, 0.1% SDS para lavarla hasta que no se detectara señal radioactiva en las orillas de la membrana. La membrana se expuso un día en un pantalla de PhosphorImager o a una película X-OMAT por 2 días.

V.17 SOUTHERN BLOT

La técnica de *Southern blot* permite el análisis de DNA genómico o fragmentos definidos de DNA después de digestión con endonucleasas de restricción para determinar con una sonda conocida el número de genes contenidos en un genoma específico. El DNA inmovilizado en filtros de nitrocelulosa no interacciona con otras moléculas inmovilizadas y a su vez, mantiene la capacidad de hibridar con moléculas complementarias. La detección de estas hibridaciones se realiza mediante la detección de un marcador radioactivo en un revelado por autorradiografía.

V.17.1 Digestión del DNA Genómico.- El DNA previamente extraído se digirió para poder analizarlo e hibridarlo con la sonda marcada. La digestión se llevó a cabo con las enzimas: *Bgl*III, *Ban*I, *Kpn*I y *Bam*HI toda la noche a 37°C. La mezcla de reacción de digestión fué la siguiente:

Buffer (especial para cada enzima)	20 µl
DNA 5µg/µl	1-3 µl
H ₂ O	173-176 µl
Enzima	30-40 U

Posteriormente, el DNA digerido fué precipitado con 1 vol de isopropanol y 1/10 vol de 7.5 M de Acetato de Amonio, y separado en un gel de 0.8-1% agarosa, teñido con bromuro

con dos papeles filtro (Whatman) del tamaño del gel, sobre el gel se colocó una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham), que fué cubierta por tres capas de papel filtro y por varias capas de toallas de papel absorbente. Sobre el ensamblaje se colocó un peso de aproximadamente 1 Kg y se mantuvo en contacto con una solución de 0.4 N NaOH. La transferencia se dejó por 24 h; posteriormente se lavó la membrana con una solución SSC 2X (0.3 M NaCl, 30 mM Citrato de sodio) por 5 min a temperatura ambiente. La membrana se guardó a -20°C. La membrana con el DNA transferido se colocó en un tubo con la solución de prehibridación (5X SSC, 5X solución de Denhardt's [solución 100X: 20% Ficoll 400, 20% Polivinilpirrolidona y 20% de BSA], 1% SDS y 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón) en un horno de hibridación a una temperatura de 42°C en agitación continua por 2 h. La hibridación se llevó a cabo con la solución de prehibridación sin DNA de espermatozoos de salmón y con la sonda marcada radioactivamente, entonces se incubó por 24 h a 50°C. Se eliminó la solución con la sonda marcada radioactivamente de la membrana de nylon y se lavó la membrana con 4X SSC con 0.1% SDS y cuando se detectaba aún señal en las orillas de la membrana se lavó con 0.1X SSC con 0.1% SDS hasta que no se detectara señal radioactiva en las orillas de la membrana.

V.18 CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DE 580 pb's

Con la finalidad de producir anticuerpos que reconozcan una parte significativa de p36, se procedió a clonar y expresar un fragmento de cDNA del que ya se conoce su secuencia. Se amplificó un fragmento de 580 pb's que incluye al extremo 3'. Este fragmento se obtuvo con los oligonucleótidos FWAatg al que se le añadió un atg en el extremo 5' (atgtggaacacccttggtga) y Rv3', que no contiene el codón de término (ataacgtccaattgcccacaac). El atg que se le adicionó al oligonucleótido FWAatg fué con la finalidad de que este extremo quedara con el codón de inicio para que se lleve a cabo la expresión del fragmento clonado; para el extremo 3' se hizo el oligonucleótido Rv3' que no contiene el codón de término (Fig. 8), con la finalidad de que se exprese con el epítipo V5 y la cola de histidinas que tiene el vector (Fig. 9).

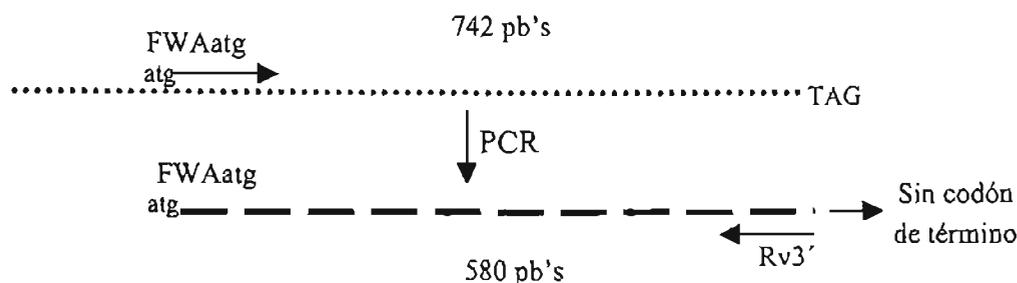


Fig. 8.- REPRESENTACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE 580 pb's A PARTIR DE cDNA DE *P. vulgaris*. La amplificación del fragmento de 580 pb's se llevó a cabo por PCR con los oligonucleótidos FWAatg y Rv3' que fueron diseñados con la finalidad de que produzcan extremos adecuados para la clonación en el vector pCRT7/CT-TOPO y para su expresión posterior.

La clonación del fragmento se llevó a cabo en un vector linearizado y activado con una topoisomerasa (pCR®T7/CT-TOPO, 2702 pb's), que permite expresar el producto con un epítipo (V5) para poder detectarlo, así como con una cola de histidinas en el extremo 3' (Fig. 9). La reacción consistió en mezclar 4 µl de producto de PCR, 1 µl de 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂ y 1 µl de vector (0.4 ng). Enseguida, se procedió a transformar la construcción en células de *E. coli* (TOP10F') químicamente competentes: a un vial de 50 µl de células, se adicionaron 2 µl de la reacción de clonación y se dió un choque térmico por 30 seg a 42°C; en seguida se adicionaron 250 µl de medio SOC y se incubaron por 30 min a 37°C y 200 rpm de agitación, se sembraron 100 µl en una caja con medio LB y se dejó incubando a 37°C toda la noche.

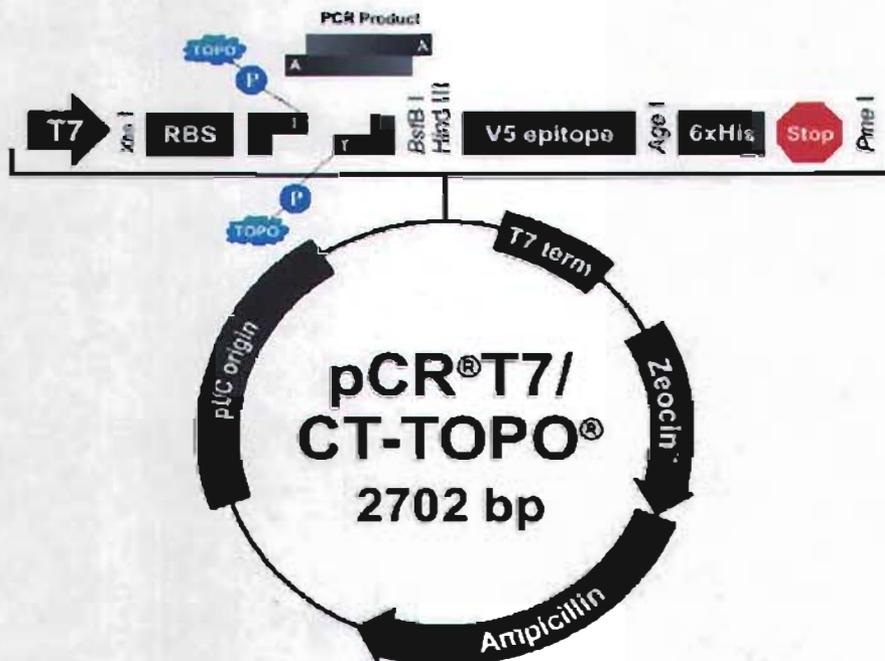


Fig. 9.- MAPA DEL VECTOR pCRT7/CT-TOPO. El vector linearizado tiene una timidina saliente, además tiene una topoisomerasa covalentemente unida al vector (vector activado); la *Taq* polimerasa con su actividad de transferasa terminal independiente de templado, adiciona una adenina a los extremos 3' de los productos de PCR, por lo cual estos pueden insertarse y ligarse eficientemente al vector.

La selección de clonas positivas para el inserto de 580 pb's se llevó a cabo por medio de PCR con los oligonucleótidos mencionados; sin embargo, este resultado no proporciona datos respecto a la orientación del inserto en el vector, por lo que se purificaron los plásmidos con el estuche QIAprep®Miniprep (Invitrogen) y se digirieron con la enzima *BanI*, que hace un corte en el inserto y dos cortes en el vector con lo cual se obtienen fragmentos de 660, 1059 y 1467 pb's cuando el inserto está en orientación correcta, y por otro lado, fragmentos de 974, 1059 y 1149 pb's cuando el vector no está en la orientación

correcta. Las clonas que tuvieron el inserto en orientación correcta (clonas 5 y 6), fueron mandadas a secuenciar para asegurar la orientación correcta del inserto en el vector, así como la fase correcta de la secuencia. Las células One Shot® TOP10F' no contienen T7 polimerasa por lo que su utilidad radica en el mantenimiento, propagación y caracterización del plásmido recombinante. La expresión del inserto es controlada por el promotor del fago T7. T7 RNA polimerasa reconoce específicamente este promotor; por tanto, para que se lleve a cabo la expresión es necesario que las células tengan esta enzima ya sea por inducción o infección con el fago. La cepa DE3 lleva la forma lisogénica del fago lambda, que contiene el gen *lac*, el gen T7 RNA polimerasa bajo el control de promotor *lacUV5*, y una pequeña porción del gen *lacZ*, y por tanto la expresión de T7 RNA polimerasa puede ser inducida con IPTG (isopropyl β-D-tiogalactosidasa).

V.19 EXPRESIÓN DEL FRAGMENTO DE 580 pb's

Para expresar el fragmento, se tomaron 10 ng del vector de la clona 6 y se transformó un vial de 50 µl de células de *E. coli* químicamente competentes (One Shot® BL21[DE3]) por medio de un choque térmico a 42°C por 30 seg; se adicionaron 250 µl de medio SOC y se incubaron por 30 min a 37°C y 200 rpm de agitación. Se tomó toda la solución de reacción y se inoculó a 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina; se dejó en incubación a 37°C toda la noche.

V.19.1 Expresión piloto.- Se llevó a cabo una expresión piloto para determinar el tiempo óptimo de expresión, así como la concentración adecuada de inductor IPTG. Se tomaron 500 µl del cultivo de toda la noche y se inoculó un tubo con 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina, se incubó por 2 h a 37°C y 200 rpm; se transfirieron 5 ml del cultivo a dos tubos y se adicionó a un tubo IPTG a una concentración final de 0.75 mM. El tubo sin IPTG se tomó como control. Se incubó en las mismas condiciones por 6 h y se tomaron 500 µl de cada tubo cada hora. El cultivo con 0.75 mM de IPTG tuvo una velocidad de crecimiento mucho menor que el control sin inductor. Las muestras se centrifugaron a 16,000 g por 30 seg y se desechó el sobrenadante. El paquete celular se guardó a -20 °C hasta su análisis.

Para analizar las muestras, se tomaron 80 µl de buffer de lisis (50 mM fosfato de potasio, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glicerol, 0.5% Triton X-100, 10 mM Imidazol) y se resuspendieron las pastillas de células. Estas se congelaron con nitrógeno líquido y descongelaron a 42°C 3 veces, seguido por sonicación a una amplitud de 20 unidades, e intervalos de 10 seg durante 10 min, y centrifugaron a 16,000 g por 1 min. La parte soluble se diluyó 1:1 con buffer de Laemmli 2X y la fracción insoluble se resuspendió en 20 µl de buffer de Laemmli 1X y se calentaron por 5 min a 95°C. Los extractos se analizaron por medio de geles de poliacrilamida desnaturalizante al 12% y teñidos con azul de coomassie, y por *western blot* con anticuerpos anti-poli-His.

V.19.2 Expresión a escala mayor.- Para evitar la lisis celular provocada por la adición del inductor, las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Con 500 ml de cultivo se inocularon 20 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche y con este cultivo se inoculó 1 L de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 0.75 mM de IPTG. Se incubó por 12 h a temperatura ambiente y en agitación; después se centrifugó a 3,000 g, 4°C por 10 min, y el paquete celular se resuspendió en 15-20 ml de buffer de lisis, seguido por congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño maría a 42°C y varios ciclos de sonicación a una amplitud de 20 unidades, e intervalos de 10 seg durante 10 min. La solución ya clarificada se centrifugó a 3,000 g por 10 min y la parte soluble se recuperó para purificar la proteína recombinante.

V.20 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Dado que los anticuerpos anti-PA218 aparentemente no reconocen a p36 en estado nativo, estos no permitirán hacer inmunoprecipitaciones de p36 con sus ligandos para poder identificarlos, así como tampoco permitirán hacer inmunolocalizaciones *in situ*. Por lo tanto se procedió a producir anticuerpos específicos contra un fragmento de p36 (580 pb's) expresado en bacterias de *E. coli*.

V.20.1 Purificación de la proteína recombinante.- Para la purificación de la proteína recombinante a partir del extracto soluble, se utilizaron 200 y/o 600 µl de Ni-NTA agarosa (Qiagen) o *His-Select Nickel* (Sigma) empacadas en columnas. Las columnas con las resinas se equilibraron con buffer de lisis, se pasó el extracto y los lavados se hicieron con 10 vol de columna con buffer de lisis con 20 mM imidazol y la elución se llevó a cabo con 5 vol de columna con buffer de lisis con 500 mM imidazol. Las fracciones eluidas fueron precipitadas con 15% TCA e incubadas por 30 min-1 h a temperatura ambiente y centrifugadas por 15 min a 4°C y 16,000 g; se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100% etanol frío, se centrifugó por 5 min, 4 °C y 16,000 g y la pastilla se resuspendió en buffer de Laemmli 2X.

V.20.2 Preparación de la proteína recombinante para inmunizar.- La proteína pura y desnaturalizada fué separada en un gel preparativo de 12% de poliacrilamida desnaturalizante de 1.5 mm de grosor, el gel fué teñido con azul de coomassie para detectar la banda correspondiente a la proteína recombinante. Se cortó la banda de proteína y se lavó varias veces con agua tridestilada y posteriormente con PBS, pH 7.5. La banda de poliacrilamida con la proteína recombinante fué macerada en PBS, pH 7.5 hasta que fué capaz de pasar por la aguja de una jeringa de insulina.

V.20.3 Inmunizaciones.- La proteína recombinante ya purificada en la agarosa macerada fué inyectada a tres ratones de la cepa CD+1 (5 µg/ratón) y un conejo de la línea Nueva Zelanda (60 µg). Las inmunizaciones fueron hechas cada 15-25 días, en los ratones

se llevaron a cabo 4 inmunizaciones y se esperaron 6 días para la extracción a blanco. En el conejo se hicieron 7 inmunizaciones y se esperaron 6 días para la extracción a blanco. La sangre se incubó a temperatura ambiente por 1 h y se incubó a 4 °C toda la noche; se separó el coágulo y se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C. Se recuperó el suero y se guardó a 4 °C.

V.20.4 Análisis de los anticuerpos levantados en conejo y ratones.- Para analizar el suero de los ratones, se hizo un *western blot* con la proteína recombinante pura. Se tituló el suero de los tres ratones a diferentes diluciones para encontrar la dilución óptima de trabajo y se analizaron las reacciones de pegado por *western blot*.

V.21 Amplificación por RT-PCR de un fragmento del cDNA de p36

Con la finalidad de obtener la secuencia faltante del extremo 5' del cDNA de p36, se hicieron reacciones de RT-PCR utilizando oligonucleótidos basados en la secuencia de la probable G_β de *G. max*. El RNA templado fué extraído de ejes embrionarios de frijol. Con estas reacciones de RT-PCR se logró amplificar un fragmento de 936 pb's con la combinación de los oligonucleótidos Fwd2 (cacaccgacgtcgtga) y Rv3' (ataacgtccaattgcccaaac). Para conocer la secuencia de este fragmento, se procedió a clonarlo utilizando el estuche TOPO TA Cloning® (ver metodología de clonación del fragmento de 580 pb's); el tamizado de las colonias transformadas se llevó a cabo por PCR; se purificaron los plásmidos de las colonias que tuvieron el inserto y se secuenciaron en la unidad de secuencia del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

VI. RESULTADOS

VI.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA p36

La secuencia de la probable G_{β} de *G. max* es de 978 pb's, y sólo se habían amplificado 742 pb's correspondientes en *P. vulgaris*, que incluyen el extremo 3' del cDNA. Para amplificar la parte correspondiente al extremo 5', se utilizaron los oligonucleótidos Fwd2 y Rv3', con los que se amplificó un fragmento de 936 pb's. Este último fragmento contiene los 742 pb's que ya se conocían, pero también permitió conocer otra parte de la secuencia hacia el extremo 5'; sin embargo, no se logró amplificar todo este extremo, por lo que hay aproximadamente 42 pb's que aún no se conocen de la secuencia del cDNA de p36 respecto al cDNA de G_{β} de *G. max* (Fig. 10).

La secuencia de cDNA parcial obtenida de p36, es de 936 pb's que codifican para un péptido de 311 aminoácidos. La secuencia contiene 7 dominios WD-40 (Fig. 11). Esta secuencia también incluye 5 sitios potenciales de N-miristilación, sugiriendo una posible localización en membranas, 2 sitios potenciales de N-glucosilación, 5 sitios potenciales de fosforilación por PKC, entre otros sitios potenciales de modificaciones post-traduccionales (Fig. 11). En la secuencia también se encontraron los dos péptidos de unión a PKC en animales, con un 100% de identidad en el primero, y 75% en el segundo (SIIHALCF) (Fig. 12). Un alineamiento múltiple a nivel de nucleótidos mostró que p36 tiene identidad con las secuencias de arcA de tabaco (75%) y *Arabidopsis* (80%), además de la probable G_{β} de soya (89%), con la que comparte mayor identidad (Fig. 13). El alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos mostró que p36 tiene mayor identidad con la probable G_{β} de soya y MsGB1 de alfalfa (96%); sin embargo, la identidad que tiene con las proteínas arcA de tabaco (83%) y *Arabidopsis* (85%); BGB1 de *B. napus* (84%) y RACK1 de ratón (67%) también es muy considerable (Fig. 14).

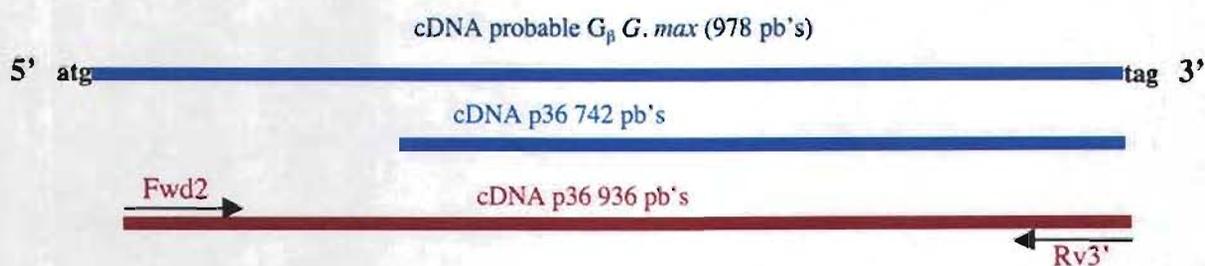


Fig. 10.- ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DEL cDNA DE p36. El cDNA de la probable G_{β} de *G. max* mide 978 pb's; del cDNA correspondiente en *P. vulgaris* se han obtenido 936 pb's, lo que indica que faltan por conocerse 42 pb's.

1	cac acc gac gtc gtg acg gcg att gcc act ccc att gac aac tcc gac atg att
1	H T D V V T A I A T P I D N S D M I
55	gtc acg gcg tgg cgc gac aaa tcc atc atc ctg tgg caa ctc acc aag gag gac
19	V T A S R D K S I I L W Q L T K E D
109	aag acc tac ggt gtc ccc cgc cgc cgt ttg acc ggc cac tcc ttc gtt cag
37	K T Y G V P R R R I T G H S H F V Q
163	gac gtc gtt ctc tct tcc gac ggt cag ttt gcg ctc tcc ggc tcc tgg gac ggc
55	D V V L S S D G Q F A L S G S W D G
217	gaa ctc cgc ctc tgg gac ctt gcc gcc ggc act tcc gcg cgc cgc ttt gtc ggc
73	E L R L W D L A A G T S A R R F V G
271	cac acc aag gac gtg ctc tcc gtg gcg ttc tcc atc gac aac cgt cag atc gtg
91	H T K D V L S V A F S I D N R Q I V
325	tgg gcg tca cgt gac cgc acg atc aag ctg tgg aac acc ctt ggt gaa tgc aag
109	S A S R D R T I K L W N T L G E C K
379	tac acc att caa gac agc gac gct cat tct gat tgg gtt agc tgc gtg cgt ttc
127	Y T I O D S D A H S D W V S C V R F
433	agc ccc agc acg ctt cag ccg act att gtg tct gca tct tgg gac cgt act gtg
145	S P S T L Q P T I V S A S W D R T V
487	aag gta tgg aat ctc acg aac tgc aaa ctg aga aac act ctt gct gga cac agt
163	K V W N L T N C K L R N T L A G H S
541	ggg tat gtg aac act gtt gct gtt tct ccc gat ggt tct ctt tgc gcc agt ggt
181	G Y V N T V A V S P D G S L C A S G
595	ggg aaa gat gga gtt att ttg ctg tgg gat ttg gct gag ggt aag cgt ctt tac
199	G K D G V I L L W D L A F G K R L Y
649	tct ctt gat gct ggc tct att atc cat gcc ctc tgc ttc agt ccc aac agg tac
217	S L D A G S I T H A L C F S P N R Y
703	tgg ctg tgc gcc gcc acc gag cag agc atc aag atc tgg gat ttg gag agt aag
235	W L C A A T E Q S I K I W D L E S K
757	agt atc gtt gag gat ttg aag gta gac ctc aag act gag gct gat ggt acc act
253	S I V E D L K V D L K E A D G...T...T
811	ggt gga aac aca aac aaa aag aag gtt atc tat tgt acg agt ttg aac tgg agt
271	G...G...N...T...N...K K K V I Y C T S L N W S
865	gcg gat gga agc act ttg ttt agt ggt tat acc gat ggc gtg gtc aga gtt tgg
289	A D G S T L F S G Y T D G V V R V W
919	gca att gga cgt tat tag
307	A I G R Y -

Fig. 11.- SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL FRAGMENTO DE p36 EN NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS. La secuencia en aminoácidos presenta 7 dominios WD-40, sombreados en azul (residuos de aminoácidos 1-40, 46-87, 88-120, 132-175, 176-217, 224-257 y 283-311). También presenta sitios potenciales de N-miristilación, subrayados con líneas punteadas (residuos de aminoácidos 68-73, 192-197, 198-203, 268-273 y 271-276); sitios de fosforilación por PKC, subrayados con línea seguida negra (residuos de aminoácidos 84-86, 115-117, 161-163, 243-245 y 274-276); dos sitios de N-glucosilación, subrayados con morado (residuos de aminoácidos 166-169 y 286-289); sitios de fosforilación para cinasa de caseína II, enmarcados en rojo (10-13, 33-36, 121-124, 128-131, 253-256 y 264-267); un sitio de amidación enmarcado en azul (residuos de aminoácidos 211-214); un sitio de fosforilación para una cinasa de proteína dependiente de cAMP y cGMP enmarcado en negro (44-47), y un tripéptido de señal de transporte a microcuerpos en el carboxilo terminal enmarcado en fucsia (residuos de aminoácidos 309-311). Además, la secuencia tiene 2 péptidos de unión a PKC en animales, letras en negritas enmarcadas en verde (residuos de aminoácidos 94-100 y 222-229). Datos obtenidos a

partir de la secuencia traducida en aminoácidos a partir de los 936 pb's que codifican a un fragmento de p36 con el programa *ScanProsite* (Gattiker, *et al.*, 2002).

Primer péptido.			
RACK1 <i>Homo sapiens</i>	106	D V L S V A F	114
RWD <i>Oryza sativa</i>	118	D V L S V A F	126
p36 <i>P. vulgaris</i>	94	D V L S V A F	100
Segundo péptido.			
RACK1 <i>Homo sapiens</i>	233	D I I N A L C F	242
RWD <i>Oryza sativa</i>	250	S I I H S L C F	259
p36 <i>P. vulgaris</i>	222	S I I H A L C F	229

Fig. 12.- ALINEAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS DE UNIÓN A PKC DE RACK1 DE *H. sapiens*, RWD DE *O. sativa*, Y EL FRAGMENTO DE p36 de *P. vulgaris*. Se alinearon los aminoácidos correspondientes a los péptidos de unión a PKC en animales, a partir de las secuencias de RACK1 de humano, RWD de arroz y p36 de frijol. El primer péptido tiene 100% de identidad en las tres secuencias de aminoácidos mientras que el segundo péptido presenta 62.5% de identidad entre RACK1 y RWD, 75% de identidad entre RACK1 y p36, y 87.5% de identidad entre RWD y p36.

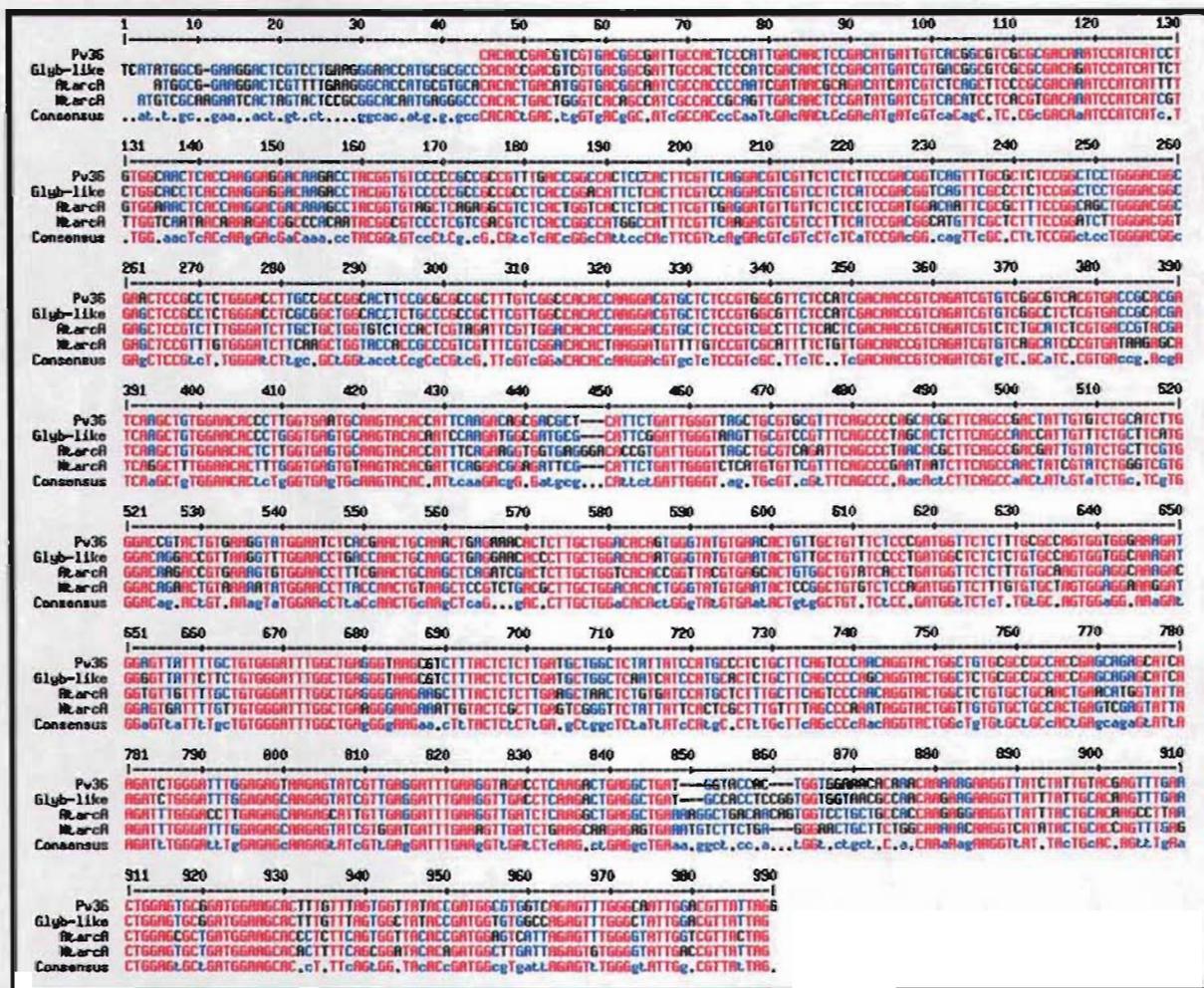


Fig. 13.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LAS SECUENCIAS EN NUCLEÓTIDOS DE p36 de *P. vulgaris*, LA PROBABLE G_{β} DE *G. max*, arcA de *A. thaliana* y *N. tabacum*. Pv36=p36 de frijol; Glyb-like=probable G_{β} de soja; AtarcA=arcA de *Arabidopsis*; NtarcA=arcA de tabaco. La identidad de p36 con G_{β} de soja es de 89%, con arcA de *Arabidopsis* es de 80% y con arcA de tabaco es de 75%. El alineamiento múltiple se hizo con el programa INRA (Corpet, 1988). Las secuencias se obtuvieron en el *GenBank*.

VI.2 ANÁLISIS DE EXTRACTOS NATIVOS Y DESNATURALIZADOS

Los anticuerpos anti-PA218 diseñados contra un péptido de 10 aminoácidos (AIATPIDNSD) fueron capaces de reconocer a p36 en *western blot* de geles de poliacrilamida desnaturalizantes; sin embargo, en repetidos intentos de acomplejarla a una columna de afinidad, p36 no pudo ser eluída de la misma, lo cual sugiere que los anticuerpos no reconocen a p36 en estado nativo. Para probar esta posibilidad, se hicieron extractos en condiciones nativas, semidesnaturalizadas y desnaturalizadas y se probaron en un *western blot* con anticuerpos anti-PA218. Las muestras de extractos proteicos de ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris* se pretrataron con 1% SDS, 2.5% SDS, 2.5% SDS más 1% β -ME, y con 2.5% SDS más 1% β -ME más calentado a 95°C por 5 min.

En el caso de la alícuota nativa se observó una banda bien definida de migración alta (Fig. 15A, carril 1, flecha horizontal); sin embargo, se observó también una banda tenue que migró menos que la anterior (Fig. 15A, carril 1, flecha vertical). La banda bien definida de alta migración ya no se observó a medida que aumentó la severidad de los tratamientos a partir de pre-incubación de la muestra con 1% SDS (Fig. 15A, carriles 2-5). El pre-tratamiento de la muestra con 1% y 2.5% SDS arrojó resultados similares ya que la banda tenue de migración menor se continuó observando (Fig. 15A, carriles 2 y 3, flechas verticales), y una banda adicional tenue de migración intermedia empezó a detectarse (Fig. 15A, carriles 2 y 3, asteriscos). Cuando se pre-trató la muestra con 2.5% SDS más 1% β -ME, el patrón cambió completamente; dos bandas tenues de mucho menor migración que las anteriores se detectaron (Fig. 15A, carril 4, flechas verticales). En el resultado de este pre-tratamiento más calentamiento de la muestra a 95 °C por 5 min ya no se detectaron las bandas tenues anteriores (Fig. 15, carril 5).

VI.3 DOT-BLOT

Para obtener mayores datos sobre el posible reconocimiento de los anticuerpos contra la proteína en forma nativa, se hicieron ensayos de inmunopunto o *dot-blot*. Se pusieron alícuotas de extractos de eje embrionario nativos y pre-tratados con las diferentes concentraciones de SDS y β -ME utilizadas para el experimento anterior. El *blot* se inmunodetectó con anticuerpos anti-PA218 (purificados en columna de Proteína A). Se observó que en el extracto nativo hubo una reacción colorida intensa (Fig. 16, gota 1), que podría corresponder a la banda de alta migración detectada en las inmunodetecciones por *western blot* en geles nativos (Fig. 15A, carril 1). La reacción disminuyó gradualmente en las muestras desnaturalizadas con 1 y 2.5% SDS (Fig. 16, gota 2 y 3). Sin embargo, en la muestra que se trató con 2.5% SDS y 1% β -ME (Fig. 16, gota 4), la reacción volvió a aumentar y se incrementó aún más en la muestra tratada con 2.5% SDS y 1% β -ME seguida de calentamiento a 95°C (Fig. 16, gota 5). Estos datos muestran claramente un aumento en la reacción del anticuerpo a medida que aumenta la desnaturalización, lo cual

sugiere, junto con la incapacidad de obtener p36 a través de la columna de afinidad, que anti-PA218 no es capaz de reconocer a esta proteína en forma nativa.

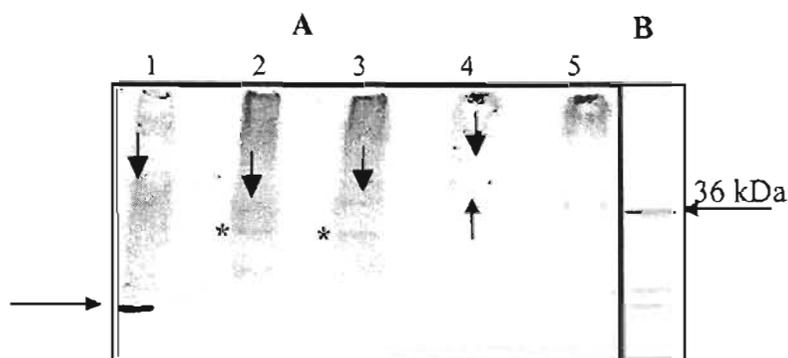


Fig. 15.- ANÁLISIS DE EXTRACTOS NATIVOS, SEMIDESNATURALIZADOS Y DESNATURALIZADOS DE EJES EMBRIONARIOS DE *P. vulgaris* POR WESTERN BLOT A PARTIR DE GELES DE GRADIENTE SIN SDS. La inmunodetección en (A) y (B) se llevó a cabo con anticuerpos anti-PA218, inmunopurificados con Proteína A-Sefarosa. (A), Carril 1, extracto nativo; carril 2, extracto con 1% SDS; carril 3, extracto con 2.5% SDS; carril 4, extracto con 2.5% SDS y 1% β -ME; y carril 5, extracto con 2.5% SDS y 1% β -ME calentado a 95°C por 5 min. (B) Extracto desnaturalizado procesado convencionalmente con solución de Laemmli desnaturalizante y corrido por SDS-PAGE. Las flechas y asteriscos en los carriles indican las posiciones de migración de las proteínas observadas después de la inmunodetección con el anticuerpo anti-PA218. La flecha de la izquierda indica una banda nativa que reaccionó fuertemente con el anticuerpo, y la flecha de la derecha, la proteína de 36 kDa en un *western blot* de un gel desnaturalizante.

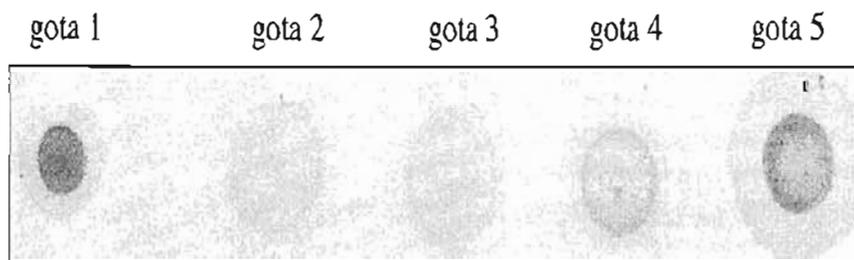


Fig. 16.- ANÁLISIS POR DOT BLOT DE EXTRACTOS NATIVOS, SEMIDESNATURALIZADOS Y DESNATURALIZADOS DE EJES EMBRIONARIOS DE *P. vulgaris*. La inmunodetección se hizo con anticuerpos anti-PA218 (purificados con columna de Proteína A). Gota 1, extracto nativo; gota 2, extracto

con 1% SDS; gota 3, extracto con 2.5% SDS; gota 4, extracto con 2.5% SDS y 1% β -ME sin calentar, y gota 5, extracto con 2.5% SDS y 1% β -ME calentado a 95°C por 5 min.

VIA ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LA ACUMULACIÓN DE p36 EN UNA CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL

Con la finalidad de analizar los posibles cambios en los niveles de acumulación de p36 durante la germinación, se imbibieron semillas de frijol y se extrajo el eje embrionario o el hipocotilo y el ápice (hipocotilo-ápice) según al caso, a las 0, 8, 12, 20, 32 y 40 h de imbibición, y estos tejidos fueron analizados por *western blot* con anticuerpos anti-PA218 (Fig. 17A). En el eje embrionario de la semilla seca (0 h de imbibición), se observó una cantidad significativa de p36 acumulada (Fig. 17A, 0 h) que se mantiene constante durante todos los tiempos analizados de imbibición (Fig. 17A, 8-40 h). El resultado muestra que cuando la semilla aún está en estado latente, p36 es expresada a altos niveles en el eje embrionario y su acumulación se mantiene relativamente constante durante la germinación, a pesar de que este proceso pudiera darse *de novo* durante los tiempos analizados (ver más adelante).

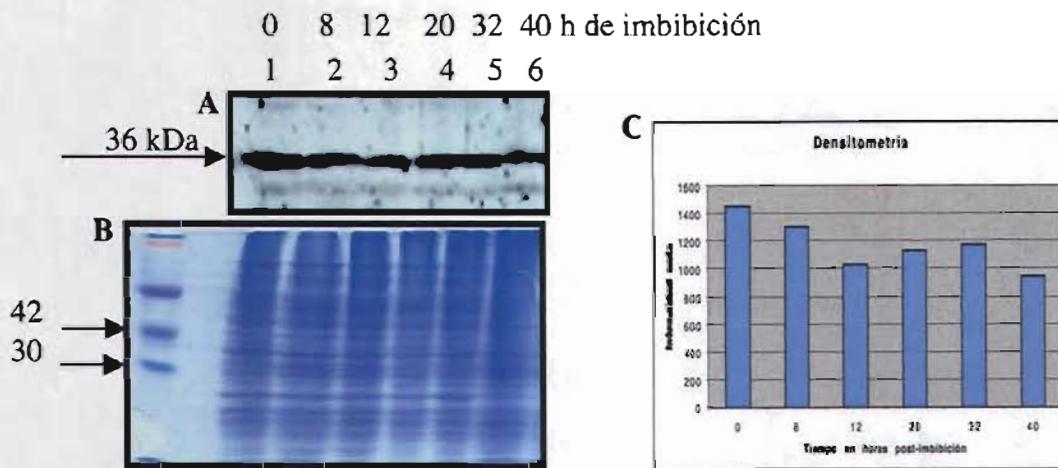


Fig. 17.- ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ACUMULACIÓN DE p36 POR WESTERN BLOT DE TEJIDOS EXTRAÍDOS DE EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL A LO LARGO DE UNA CINÉTICA DE GERMINACIÓN. A) La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-PA218 (purificados con columna de Proteína A). Carril 1, extracto proteico de eje embrionario de semilla seca; carril 2, eje embrionario de 8 h de imbibición; carril 3, eje embrionario de 12 h de imbibición; carril 4, eje embrionario de 20 h de imbibición; carril 5, hipocotilo-ápice con radícula de 32 h de imbibición y carril 6, hipocotilo-ápice y radícula de 40 h de imbibición. La flecha indica la posición de migración de la proteína de 36 kDa. B) Gel correspondiente al *western blot* de

poliacrilamida desnaturalizante teñido con azul de Coomassie. Las flechas a la izquierda indican la posición de migración de los marcadores de 30 y 40.2 kDa.

VI.5 ANÁLISIS POR *NORTHERN BLOT* DE LA ACUMULACIÓN DEL RNA MENSAJERO DE p36 EN UNA CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL EN PRESENCIA DE H₂O, AJA, 2,4-D Y NPA

El análisis por *northern blot* permite identificar los niveles de acumulación de un mRNA utilizando una sonda determinada. Con la finalidad de encontrar cambios en los niveles de acumulación y poder identificar la etapa en la que el mRNA de p36 se expresa mayoritariamente durante la germinación, se llevaron a cabo extracciones de RNA total a partir de los tejidos recuperados en la cinética de germinación. Este RNA fué corrido en geles de agarosa y después de transferencia a membranas de nylon, el mRNA específico para p36 fué detectado con una sonda que corresponde a 500 pb's del cDNA para p36 de frijol. Después de revelar las autoradiografías correspondientes, se observó que durante la cinética de germinación sin tratamientos, los niveles de mRNA para p36 fueron indetectables a las 0 y 12 h de imbibición bajo las condiciones utilizadas, ya que no se observó señal en los carriles correspondientes (Fig. 18A, 0 y 12 h). Sin embargo, este mRNA empezó a ser detectable a partir de las 20 h de imbibición (Fig. 18A, 20 h), y a partir de este punto la señal aumentó notablemente como se observa en el punto de las 32 h de imbibición (Fig. 18A, 32 h). Este fué el pico de máxima acumulación durante los tiempos analizados ya que a las 40 h de imbibición, la señal disminuyó a niveles semejantes a los de las 20 h de imbibición (Fig. 18A, 40 h). Esto contrasta con los datos anteriores donde se detectó la presencia relativamente constante de la proteína durante el mismo intervalo de germinación.

Se sabe que las hormonas vegetales juegan un papel indispensable en la elongación, división y diferenciación celular; procesos que también son indispensables para que se lleve a cabo la germinación, proceso mediante el cual se transformará el eje embrionario de una semilla en una plántula autótrofa. Estas hormonas modulan la expresión y/o función de algunas proteínas involucradas en sus vías de señalización. También se sabe que la expresión del gen homólogo que codifica para esta proteína en células de tabaco, es inducida por auxinas. Por ello se llevó a cabo el mismo análisis por *northern blot* del mRNA de p36 en presencia de auxinas exógenas y de un bloqueador del transporte de estas, con la finalidad de estudiar si sus niveles de acumulación son modulados por auxinas durante la germinación. Para este análisis se utilizaron auxinas exógenas como lo son el ácido indolacético (IAA) y el ácido 2,4-diclorofenixiacético (2,4-D); así como, el ácido naftilftalámico (NPA) que es un inhibidor del transporte polar de auxinas. Cuando se germinaron las plántulas en presencia de IAA y se analizó la acumulación del mRNA de p36 a intervalos cortos post-imbibición, se observó un retraso en el punto de máxima acumulación comparado con el control sin tratamiento. La mayor acumulación de este mRNA ocurrió a las 40 h post-imbibición (Fig. 18B, 40 h), comparado con el punto de

máxima acumulación del mismo a las 32 h en las plántulas sin tratamiento (Fig. 18A, 32 h). Con este tratamiento se observó una señal prácticamente indetectable del mRNA desde las 0 h hasta las 32 h de imbibición (Fig. 18B, 0-32 h). Este nivel de acumulación fué ligeramente menor en la parte del hipocotilo-ápice a las 48 h de imbibición (Fig. 18B, 48A).

El retraso en el punto de máxima acumulación se repitió cuando la germinación se llevó a cabo en presencia de otra auxina sintética, el 2,4-D. Se observó exactamente el mismo patrón de acumulación del mRNA de p36 pero hubieron dos diferencias significativas. Primero no se detectó señal en absoluto antes del punto máximo a las 40 h (Fig. 18C, 40h), y segundo, no se detectó señal en el hipocotilo-ápice a las 48 h (Fig. 18C, 48A).

Cuando se llevo a cabo la germinación en presencia del bloqueador del transporte de auxinas, el NPA, el mRNA de p36 fué prácticamente indetectable de las 0 a las 20 h post-imbibición (Fig. 18D, 0-20 h). Sin embargo a las 32 h se pudo observar la señal correspondiente al punto de máxima acumulación del mRNA (Fig. 18D, 32h), la cual volvió a ser indetectable a las 40 h y en el hipocotilo-ápice analizado a las 48 h (Fig. 18D, 40h y 48A, respectivamente). En estas condiciones, el tiempo de la acumulación máxima del mRNA de p36 es similar al del control sin tratamiento pero los cambios entre los intervalos de tiempo parecen ser más drásticos. Estos datos sugieren que los tratamientos con auxinas, sí afectan la acumulación del mRNA de p36, aunque de manera leve pues estos resultan en un retraso en el punto de máxima acumulación del mRNA comparado con la germinación normal en agua. Similarmente, el efecto del NPA es también mínimo o prácticamente nulo.

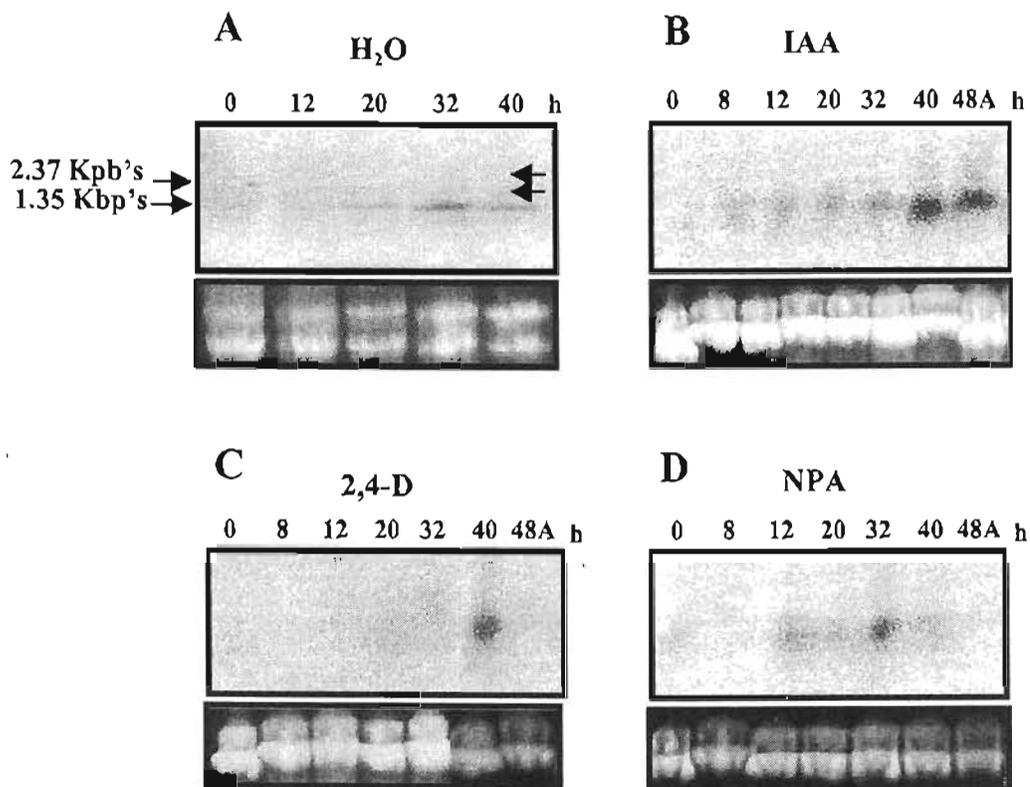


Fig. 18.- ANÁLISIS POR *NORTHERN BLOT* DEL RNA MENSAJERO QUE CODIFICA PARA p36 DURANTE DIVERSOS TIEMPOS DE GERMINACIÓN EN PRESENCIA DE H₂O, IAA, 2,4-D Y NPA. Se corrieron las muestras de RNA total de *P. vulgaris* en diversas etapas de germinación y bajo diferentes condiciones, en geles de agarosa que fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa como se describe en Materiales y Métodos. La hibridación se llevó a cabo utilizando como sonda el fragmento de 500 pb's obtenido con los oligonucleótidos Fwd1-Rv1. En (A): 0, eje embrionario de 0 h; 12, eje embrionario de 12 h de imbibición; 20, eje embrionario de 20 h de imbibición; 32, hipocotilo-ápice y radícula de 32 h de imbibición; y 40, hipocotilo-ápice y radícula de 40 h de imbibición; las flechas a la izquierda muestran la posición de migración de los marcadores de 1.35 y 2.37 Kpb's, las flechas a la izquierda de (A) muestran la posición de migración de los RNA ribosomales. En (B), (C) y (D): 0, eje embrionario de 0 h; 8, eje embrionario de 8 h de imbibición; 12, ejes embrionarios de 12 h de imbibición; 20, ejes embrionarios de 20 h de imbibición; 32, hipocotilo-ápice y radícula de 32 h de imbibición; y 40, hipocotilo-ápice y radícula de 40 h de imbibición; y 48A, hipocotilo-ápice de 48 h de imbibición. En (A), (B), (C) y (D), la figura inferior muestra la cantidad de RNA que fué

cargado en cada carril después de la electroforesis seguida por tinción con bromuro de etidio (30 µg/carril).

VI.6 SOUTHERN BLOT

El análisis por *Southern blot* se llevó a cabo con la finalidad de obtener datos que permitan concluir si hay más de un gen que codifica para p36 en el genoma de *P. vulgaris*. Las digestiones del DNA se llevaron a cabo con las enzimas *Bgl*II, *Ban*I, *Kpn*I y *Bam*HI. La hibridación se llevó a cabo con el fragmento de 940 pb's obtenido con los oligonucleótidos Fwd2-Rv3' a 50° C.

En la digestión que se llevó a cabo con la enzima *Bgl*II (Fig. 19, carril 1) se observó solo una banda de alto peso molecular que corresponde a la banda de DNA de mayor tamaño (no digerido), lo que indica que el gen que codifica para p36 no tiene secuencias de restricción para esta enzima y por tanto no se liberan fragmentos. En la reacción de digestión con la enzima *Ban*I (Fig. 19, carril 2) se observan dos bandas que corresponden a fragmentos liberados por un solo corte con la enzima de restricción en el gen de p36. En la digestión con la enzima *Kpn*I solo se observa una banda de alto peso molecular que también corresponde al DNA de mayor tamaño, lo que indica que el gen de p36 no tiene sitios de restricción para esta enzima (Fig. 19, carril 3). Y en la reacción de digestión de la enzima *Bam*HI se observan dos bandas que hibridaron con la sonda, lo que indica que hay un sitio de restricción para esta enzima en el gen de p36 (Fig. 19, carril 4), por lo que se liberan dos fragmentos. Estos datos coinciden con el duplicado del *Southern blot* (no se muestra dato).

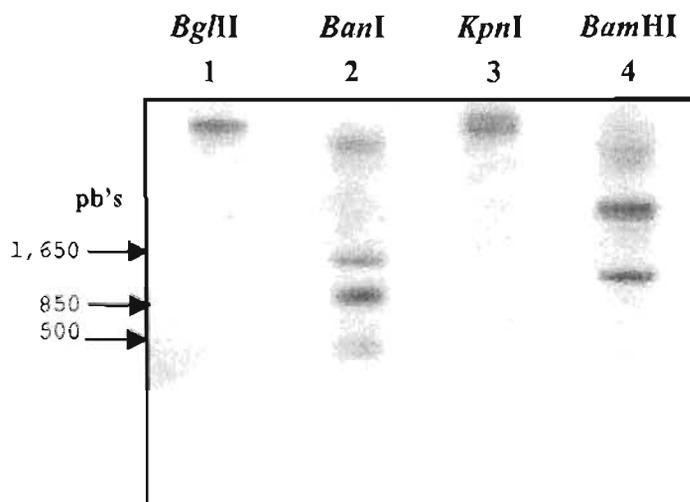


Fig. 19.- ANÁLISIS POR *SOUTHERN BLOT* DEL DNA GENOMICO DE FRIJOL DIGERIDO CON LAS ENZIMAS *Bam*HI, *Ban*I, *Bgl* II y *Kpn*I. Carril 1, digestión con la enzima *Bgl*II, carril 2, digestión con la enzima *Ban*I, carril 3, digestión con la enzima *Kpn*I y carril 4 digestión con la enzima *Bam*HI.

VI.7 CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN FRAGMENTO DE 580 pb's

La clonación y expresión de un fragmento que representa el 59.4% de la secuencia total del cDNA de p36 que incluye el extremo 3' correspondiente, se llevó a cabo con dos finalidades muy importantes: a) para obtener mejores anticuerpos que el anti-PA218 con el que contamos, y además para estar seguros de que podrán reconocer a p36 en estado nativo; y b) para poder tener suficiente proteína que nos permita preparar columnas de afinidad para capturar a los ligandos endógenos de p36 de *P. vulgaris*.

Después de la clonación, la selección de clonas positivas para el inserto de 580 pb's se llevó a cabo por medio de PCR. De las 7 clonas analizadas, 5 fueron positivas por este método (clonas 2, 4, 5, 6 y 7) (Fig. 20, carriles 2, 5, 6, 7 y 8). Debido a que este resultado sólo indica si el inserto está dentro del vector, pero no proporciona datos respecto a su orientación dentro del mismo, se procedió a purificar los plásmidos de cada clona con el estuche QIAprep®Miniprep (Invitrogen) para llevar a cabo digestiones de estos con la enzima *BanI*. Esta enzima hace un corte en el inserto y dos cortes en el vector, con los que se obtienen fragmentos de 660, 1059 y 1467 pb's cuando el inserto está en orientación correcta dentro del vector, como en el caso de las clonas 5 y 6 (Fig. 21, carriles 4 y 5), y fragmentos de 974, 1059 y 1149 pb's cuando el vector no está en orientación correcta, como en las clonas 2, 4 y 7 (Fig. 21, carriles 1, 2 y 6). Las clonas que tuvieron el inserto en fase, fueron secuenciadas para confirmar tanto que el inserto estuviera correctamente orientado en el vector, así como que el atg de inicio se encontrara en la secuencia amplificada.

Para llevar a cabo la expresión del fragmento de 580 pb's se probaron concentraciones de 0.5, 0.75, y 1 mM del inductor (IPTG). La concentración de 1 mM de IPTG resultó ser tóxica para la cepa, por lo cual no se observó crecimiento y la expresión de la proteína recombinante fué muy baja (no se muestra dato); con 0.5 mM IPTG se observó aumento en el crecimiento bacteriano, comparado con 1 mM pero la cantidad de proteína producida no fué suficiente para obtener las cantidades necesarias para la inmunización. Por lo tanto, se llevó a cabo el cultivo a temperatura ambiente adicionando el inductor desde el momento de la inoculación, ya que de esta forma se produce suficiente proteína para su análisis y purificación. Se hizo entonces una cinética de expresión de 12 h y se analizó a las 0, 3, 7, 9 y 12 h (Fig. 22, carriles 7-11). También se utilizó como control negativo la cepa BL21-DE3 transformada solo con el vector y se analizaron los mismos tiempos de 0, 3, 7, 9 y 12 h (Fig. 22, carriles 1-5), para confirmar que el fragmento expresado correspondía al inserto en el vector. Solamente bajo estas condiciones el cultivo tuvo un crecimiento casi normal, y aunque la proteína recombinante no se expresó a altos niveles, sí se logró purificarla en cantidades suficientes para llevar a cabo las inmunizaciones.

Para llevar a cabo la purificación de la proteína recombinante; se llevaron a cabo cultivos a escala mayor (1-3 L), se hicieron extracciones de proteínas solubles y se pasaron los extractos por columnas de níquel acoplado a Sefarosa para purificar la proteína recombinante por medio de la cola de histidinas con la que es expresada. Las

purificaciones no fueron completamente eficientes ya que otras proteínas también se eluyeron en la fracción de interés (Fig. 23). Por lo tanto, para poder llevar a cabo las inmunizaciones se corrió la proteína en un gel desnaturizante y se cortó la banda correspondiente a la proteína recombinante, se lavó con 1X PBS hasta eliminar por completo el ácido acético y se maceró hasta que fué capaz de pasar por la aguja de una jeringa para poder inmunizar a los ratones y el conejo.

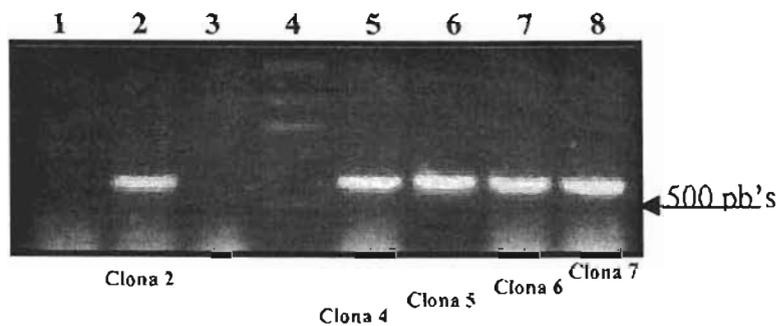


Fig. 20.- SELECCIÓN POR PCR DE LAS 7 COLONIAS TRANSFORMADAS CON EL FRAGMENTO DE 580 pb's. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a una temperatura de alineamiento de 55°C y se utilizaron las 7 colonias como templado. Carriles 1-3, clonas 1-3, respectivamente; carril 4, marcadores de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder™(Gibco); carriles 5-8 clonas 4-7, respectivamente. La flecha indica la posición de migración del marcador de 500 pb's.

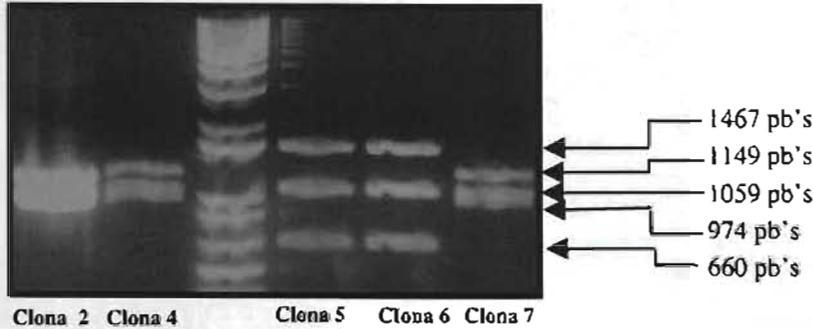


Fig. 21 .- DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE LAS CLONAS 2, 4, 5, 6 Y 7 CON LA ENZIMA *BanI* PARA DETERMINAR LA ORIENTACIÓN DEL INSERTO. Los plásmidos fueron purificados con el estuche QLAprep® (Qiagen) y digeridos toda una noche con la enzima *BanI*. Carril 1, digestión clona 2; carril 2, digestión clona 4; carril 3, marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder™; carril 4, digestión clona 5; carril 5, digestión clona 6; y carril 6, digestión clona 7. Las flechas muestran las bandas correspondientes a 660, 974, 1059, 1149 y 1467 pb's.

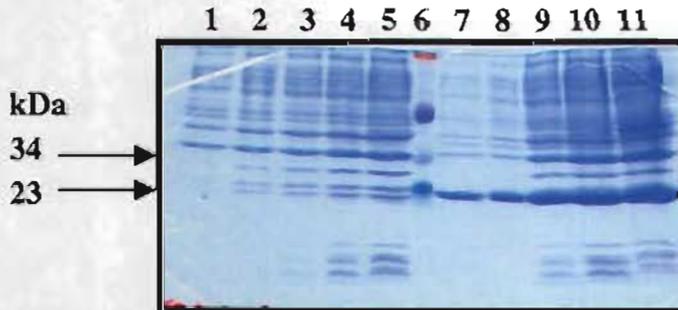


Fig. 22.- CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE. Extractos solubles de *E. coli* transformadas con el fragmento de 580 pb's, analizados en un gel de 12% de poliacrilamida desnaturalizante y teñido con azul de coomassie. La cinética de expresión se llevó a cabo por 12 horas; los tiempos analizados fueron de 0, 3, 7, 9 y 12 h para el cultivo control (vector solo sin inserto; carriles 1-5); y los mismos tiempos para el cultivo con el inserto de 580 pb's (carriles 7-11). Las flechas indican la posición de migración del marcador de 23 y 34 kDa.

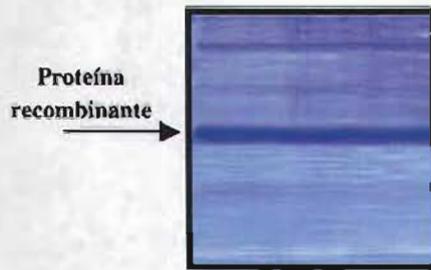


Fig. 23.- PATRÓN DE TINCIÓN POR AZUL DE COOMASSIE EN UN GEL DE 12% DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA POR UNA COLUMNA DE NÍQUEL ACOPLADO A SEFAROSA. Después de la purificación por columna de níquel acoplado a sefarosa, se analizó la proteína obtenida en geles de poliacrilamida desnaturalizante. La banda azul predominante corresponde a la proteína recombinante (flecha); sin embargo, se pueden detectar otras proteínas en el gel.

VI.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS LEVANTADOS EN TRES RATONES DE LA CEPA Balb-C Y UN CONEJO DE NUEVA ZELANDA, Y UN ANTICUERPO COMERCIAL ANTI-RACK1

Para confirmar que los anticuerpos levantados en los tres ratones y el conejo reconocen al antígeno que se utilizó para la inmunización, se hizo un análisis para inmunodetectar la proteína recombinante por *western blot*. Para ello, se utilizó la proteína recombinante expresada en la cepa BL21-DE3 de *E. coli*. Los anticuerpos se probaron a varias diluciones, pero la dilución de 1:1,500 fué la óptima. Se observó que el antisuero del conejo fué capaz de reconocer a la proteína recombinante (Fig. 24A, carril 1). De igual forma, los antisueros obtenidos de los ratones 2 y 3 fueron capaces de reconocer a la proteína recombinante purificada (Fig. 24A, carriles 2 y 3). No se observó ninguna reacción similar con el antisuero del ratón 1 (no se muestra dato). Paralelamente, se corrieron controles negativos utilizando solo los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG y anti-conejo IgG, así como otros anticuerpos primarios y no se observó ninguna reacción contra la proteína recombinante (no se muestra dato), lo que indica que la señal que se observa es específica. Interesantemente y confirmando que los anticuerpos levantados son eficaces inmunodetectando a la proteína recombinante, y que esta proteína es el homólogo de RACK1 en frijol, anticuerpos anti-RACK1 de humano fueron capaces de reconocer a la misma muestra de proteína recombinante purificada, con una señal específica del mismo peso molecular que el obtenido con los antisueros de conejo y ratones 2 y 3 (Fig. 24B).

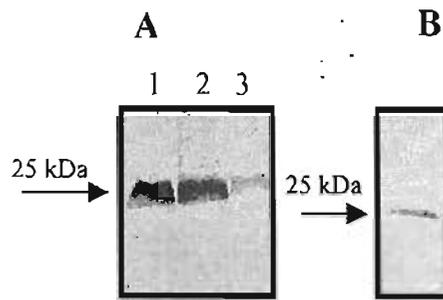


Fig. 24.- ANÁLISIS POR *WESTERN BLOT* CON LOS ANTISUEROS PROVENIENTES DE LOS RATONES Y EL CONEJO INMUNIZADOS CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DERIVADA DE p36, Y CON ANTI-RACK1 DE HUMANOS. En (A), el *western blot* se llevó a cabo con los anticuerpos levantados en los ratones de la cepa Balb-C y un conejo de Nueva Zelanda, a partir de un gel de 12% de poliacrilamida desnaturalizante conteniendo la proteína recombinante pura. Carril 1, inmunodetección con el antisuero proveniente del conejo inmunizado; carril 2, inmunodetección con el antisuero proveniente del ratón inmunizado 2; y carril 3, inmunodetección con el antisuero proveniente del ratón inmunizado 3. En (B), se muestra un *western blot* con anticuerpos comerciales anti-RACK1 de humanos, a partir de un gel de 12% de poliacrilamida desnaturalizante que contiene a la proteína recombinante pura.

VII. DISCUSIÓN

Las secuencias homólogas a RACK1 en plantas, muestran características estructurales en común, y con esta subfamilia en animales. En la base de datos del NCBI se encontraron 13 secuencias de plantas, homólogas a RACK1: G_p-like de *Nicotiana plumbaginifolia* (número de acceso: CAA96528); arcA de *Nicotiana tabacum* (números de acceso: T02340 y P49026); LeArcA1 y 2 de *Lycopersicon esculentum* (números de acceso: BAA76896 y BAA76895); BGB1 de *Brassica napus* (número de acceso: CAA83924); RWD de *Oryza sativa* (número de acceso: T03764); Msgb1 de *Medicago sativa* (número de acceso: CAA69934); G_p-like de *Glycine max* (número de acceso: T06784) y arcA de *Arabidopsis thaliana* (números de acceso: At3g18139, NP_175296, NP_173248 y AAB82647). Todas estas secuencias tienen 7 repeticiones del dipéptido WD; estas repeticiones forman una distribución idéntica entre las proteínas de esta subfamilia y además, su distribución es diferente a otras proteínas con dominios WD-40. En la secuencia de los 311 aminoácidos de p36 de frijol encontramos los siete dominios WD-40 completos, tal como está reportado para otros homólogos de RACK1. Otra característica importante es que la secuencia de aminoácidos de RACK1 de animales tiene dos péptidos que son indispensables para que RACK1 se una a PKC en estado activo. Las proteínas homólogas a RACK1 en plantas contienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas y relacionadas con estos dos péptidos de unión a PKC en RACK1. En frijol, p36 también presenta estos dos péptidos altamente conservados; el primer péptido (DVLSVAF) está conservado (100% identidad) en todas las secuencias homólogas a RACK1 conocidas en plantas, mientras que el segundo péptido (DIINALCF), guarda menor identidad entre plantas y animales (50-75%). Los datos obtenidos en frijol indican que la secuencia que codifica para p36 comparte características estructurales con proteínas homólogas a RACK1 en plantas y con RACK1 de animales, por lo que se tiene gran certeza de que p36 es un homólogo de estas proteínas en frijol, y por lo tanto puede estar desempeñando funciones similares a las de RACK1 de animales.

PKC es una proteína de la familia de las cinasas de serina-treonina dependientes de fosfolípidos, que regulan el crecimiento y diferenciación celular, pero hasta la fecha no se ha identificado ningún homólogo a PKC en plantas, indicando que podrían haber cinasas alternas que cumplan las funciones de PKC. Es muy posible que los mecanismos de transducción de señales que operan en plantas no sean tan distintos de los de animales pues se ha encontrado que tanto la profilina de frijol, como la actina de maíz, sufren de modificaciones por fosforilación en tirosinas (Guillén *et al.* 1999; Díaz-Camino *et al.* 2005). De igual manera, se sabe que existen homólogos de MAPK's en plantas (Pedley y Martin, 2004), así como cinasas duales de serina/treonina y tirosina (Trojanek *et al.*, 2004). Un indicativo de la función de una proteína, son las proteínas o ligandos endógenos con las que esta interactúa. Al conocer las funciones de algunos de estos ligandos endógenos, se puede determinar la función de la proteína de interés. Con esta finalidad se utilizaron los

anticuerpos anti-PA218; sin embargo, en el ensayo de inmunoprecipitación no se pegó p36 al anticuerpo; esto fué un indicativo de que probablemente los anticuerpos no reconocen a p36 en estado nativo, que es la forma en la cual se requiere a la proteína para precipitarla con las proteínas con las que está interactuando. Para confirmar si en realidad los anticuerpos anti-PA218 no reconocían a p36 en estado nativo, se hicieron análisis de extractos nativos y desnaturalizados. En el *western blot* de la fracción nativa se observó una banda bien definida (Fig. 15A, carril 1), que no es una reacción específica del anticuerpo anti-PA218 con p36; esta más bien podría deberse a una reacción del anticuerpo con lectinas presentes en los ejes embrionarios a través de su región de carbohidratos (Villanueva, 2002), ya que en los extractos siguientes la reacción fué muy baja y aumentó conforme se desnaturalizó la muestra. Esto sugiere que inicialmente hay una reacción inespecífica del anticuerpo, y a medida que las proteínas se van desnaturalizando, esta reacción inespecífica disminuye. Inicialmente, p36 está probablemente inaccesible para el anticuerpo y se vá haciendo más accesible a medida que aumenta la desnaturalización. Por lo tanto, este resultado y el análisis por *dot-blot* (Fig. 16), junto con los resultados de la columna de afinidad, refuerzan la idea de que el anticuerpo anti-PA218 no se une a la p36 nativa. Por este motivo se expresó un fragmento de 580 pb's del cDNA que codifica a p36, y esta proteína recombinante fué utilizada para hacer anticuerpos específicos en tres ratones y un conejo. Los anticuerpos de dos ratones y del conejo reconocen a la proteína recombinante de 25 kDa (Fig. 24A), pero se requiere analizar si estos también reconocen a p36 de extractos de *Phaseolus vulgaris* o de otras fuentes. Interesantemente, anticuerpos comerciales anti-RACK1 de humanos reconocieron a la proteína recombinante de frijol en un *western blot*, indicando que existe un alto grado de secuencias idénticas en ambas proteínas (Fig. 24B). Los anticuerpos comerciales fueron levantados contra los aminoácidos 131-317 del carboxilo terminal de RACK1 de humanos, y este fragmento tiene 64% de identidad con el fragmento correspondiente de p36 (Fig. 25), que es el mismo que fué usado para producir los anticuerpos específicos contra p36.

Pv36	119	-WNTLGECKYTIQDSDAHSDWVSCVRFSPSTLQPTIVSASWDRTVKVWNLTNCKLRNTLA
HsRACK1	131	LWNTLVGCKYTVQD-ESHSEWVSCVRFSPNSNPIIVSCGWDKLVKVVNLANCKLKTNHI
Pv36	177	GHSGYVNTVAVSPDGLCASGGKDGVI LLWDLAEGKRLYSLDAGSIIHALCFSPNRYWLC
HsRACK1	190	GHTGYLNTVTVSPDGLCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLTDGGDIIINALCFSPNRYWLC
Pv36	238	AATEQSIKIWDLESKSIIVDELKVDLKTEADGTTGGNTNKKVIYCTSLNWSADGSTLFSG
HsRACK1	250	AATGPSIKIWDLEKIIIVDELKQEVISTSS-----KAEPQCTSLAWSADGQTLFAG
Pv36	298	YTDGVRVVAIGRY--
HsRACK1	302	YTDNLVRVWQVTIGTR

Fig. 25.- ALINEAMIENTO DE LOS AMINOÁCIDOS 131-317 DE RACK1 DE HUMANOS CON EL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE DE p36. El alineamiento se hizo con el programa Search Launcher. La secuencia de RACK1 de humanos corresponde a los aminoácidos 131-317 utilizados para hacer los anticuerpos anti-RACK1 (Santa Cruz Biotech.). La secuencia de p36 de frijol, corresponde a la proteína recombinante usada para producir los anticuerpos anti-p36. La identidad entre las dos secuencias es de 64 %.

Los niveles de acumulación máxima, pueden ser indicativos de las etapas específicas en las cuales las proteínas son requeridas funcionalmente. El análisis por *northern blot* del mRNA de p36 (Fig. 18A), indicó que la acumulación de éste se modula de manera concomitante con la germinación, y sugiere el desempeño de un papel importante durante las primeras etapas de este proceso. Sin embargo, este resultado no concuerda con el análisis de la acumulación de la proteína por *western blot* durante la germinación (Fig. 17A) en el cual se observa un nivel basal de p36 en los tiempos analizados (0-40 h post-imbibición). Estos resultados contrastantes pueden explicarse tomando en cuenta que puede existir más de un gen que codifica para p36 y por tanto, lo que se observa en el *western blot* es la acumulación de una isoforma en el tiempo de 0 h, que se empieza a degradar al mismo tiempo que la segunda isoforma comienza a expresarse y a observarse a nivel de mensajero en el *northern blot*, por lo que se obtiene la cantidad constante de proteína a través del tiempo de análisis. Otra posibilidad es que el genoma de *Phaseolus vulgaris* sólo contenga un gen que codifica para p36 y que en las etapas del desarrollo de la semilla, p36 se expresa y es almacenada. Por ello a las 0 h se detecta un nivel alto de proteína pero no de su mRNA. De ahí que, al inicio de la imbibición la proteína almacenada empieza a degradarse y al mismo tiempo el mRNA de p36 comienza a expresarse (Fig. 26), a fin de que la proteína sea mantenida a un nivel constante durante esta etapa. Este resultado concuerda con los datos obtenidos por Nielsen, *et al.*, 2001 durante el desarrollo y germinación de semillas de soya, donde el punto máximo de acumulación del mRNA para la proteína tipo G_{β} (la cual es más bien el homólogo de RACK1 de acuerdo al nivel de identidad de su secuencia) es observado en las primeras etapas del desarrollo de la semilla, y deja de expresarse paulatinamente hasta un nivel indetectable en la semilla seca. Cuando inicia la imbibición, el mRNA vuelve a ser

detectado y su máximo nivel se observa cuando los cotiledones son de color amarillo-verde (al término de la germinación), y deja de observarse cuando la planta ya es autótrofa. Cabe destacar que el punto máximo de acumulación del mRNA durante el desarrollo de la semilla corresponde al punto de mayor almacenamiento de proteína; mientras que el punto de mayor acumulación del mRNA durante la germinación se caracteriza por haber una degradación intensa de proteínas de almacenaje. Estos resultados sostienen la propuesta de que p36 se almacena durante en el desarrollo de la semilla y es expresada después durante la germinación.



Fig. 26.- MODELO DE EXPRESIÓN DE p36. El modelo muestra el posible patrón de expresión a nivel de mRNA y proteína de p36 en las primeras 48 h de imbibición. Las diferencias entre los resultados del *western blot* (Fig. 17A) y del *northern blot* (Fig. 18A) de la cinética de germinación pueden deberse a la acumulación de la proteína desde las primeras etapas del desarrollo de la semilla, que a las 0 h no se sintetiza, pero cuando inicia la imbibición su expresión es activada de nuevo, al mismo tiempo que la proteína acumulada se va degradando conforme inicia la imbibición.

Se sabe que *arcA* de tabaco es inducida en células en suspensión en respuesta a la auxina sintética 2,4-D (Ishida, *et al.*, 1993), y que se expresa mayoritariamente en tejidos con alta actividad biosintética y división celular activa. Sin embargo, cuando se aplicó 25 mM 2,4-D y 50 mM IAA exógenamente a semillas en germinación de *P. vulgaris*, se observó un retraso en el punto de máxima acumulación que pasó de 32 a 40 h (Fig. 18B y C). Adicionalmente, en el caso del IAA, este tiempo de máxima acumulación se mantuvo hasta las 48 h en el hipocotilo-ápice. Se sabe que a bajas concentraciones, las auxinas promueven la germinación, pero a altas concentraciones esta es inhibida; de igual forma, a bajas concentraciones estimulan el crecimiento de la raíz y a altas concentraciones estimulan el crecimiento del brote (Maher y Martindale, 1980). Las concentraciones de auxinas sintéticas que inhiben la germinación o la hacen menos eficiente, varían de una especie a otra, y en este caso particular, se puede decir que la concentración usada de IAA fué baja y la de 2,4-D fué alta. A pesar de ello, en ninguno de los dos casos se inhibió la germinación y solo ocurrió un retraso en el punto máximo de acumulación del mRNA para p36. Se ha sugerido que la ineficiencia para germinar causada por las concentraciones

elevadas de auxinas sintéticas, puede ser consecuencia de un retardamiento en la toma de agua, inhibición de la división celular, disminución de la elongación celular, pérdida de la estructura celular y/o desbalance en la actividad metabólica, que parcial o completamente, inhibe los procesos de la germinación (Shaddad, *et al.*, 1990). Las concentraciones de auxinas sintéticas utilizadas no inhibieron la germinación, pero probablemente afectaron algunos procesos antes y durante la germinación. El hecho de encontrar el retardamiento en el punto de máxima acumulación del mRNA de p36 puede ser debido a que la expresión del mRNA esté regulada directamente dentro de la vía de transducción de señales de las auxinas. Alternativamente, el retraso en la acumulación del mRNA para esta proteína pudiera ser simplemente un reflejo del retraso de procesos generales durante la germinación, causados por el IAA y el 2,4-D exógenos. Interesantemente, existe también una diferencia en el patrón de acumulación del mRNA de p36 con ambos tratamientos, ya que la acumulación máxima se prolonga hasta las 48 h con el IAA en el hipocotilo-ápice y con el 2,4-D no hay mRNA para p36 detectable a las 48 h. Esto sugiere que tanto el IAA como el 2,4-D aplicados exógenamente podrían participar en la regulación de mecanismos diferentes en el caso que la expresión de p36 estuviera directamente regulada dentro de estas vías. Contrariamente a lo observado en este trabajo, inicialmente *arcA* fué identificado en un tamizado diferencial en células BY-2 de tabaco, como un cDNA que fué inducido por la auxina sintética 2,4-D. La respuesta fisiológica de las células a la auxina fué la inducción de la división celular donde el mRNA de *arcA* fué identificado mayoritariamente en tejidos en división celular activa. Esto sugirió que la expresión de *arcA* podría ser importante para la división celular en células vegetales (Ishida *et al.*, 1993). Sin embargo, esta respuesta no fué observada en el homólogo *Msgb1* de alfalfa que no es regulado por auxinas, y desempeña un papel importante en la división celular mediada por citocininas. Cabe destacar que el análisis de *Msgb1* se hizo en plántulas, mientras que el de *arcA* de tabaco fué hecho en células en suspensión, lo que puede interferir en la extrapolación de ambos resultados. También es importante mencionar que *arcA* en células en suspensión de tabaco no fué regulado por citocininas (McKhann *et al.*, 1997). Estos resultados indican que, aunque este tipo de proteínas vegetales pueden llevar a cabo una función relacionada con la división celular controlada por hormonas en células en suspensión, en el caso de la planta completa, su expresión es diferente y podría estar regulada por hormonas distintas a las auxinas; como por ejemplo, las citocininas. También es necesario llevar a cabo un análisis de la expresión de p36 en células en suspensión de frijol con la finalidad de conocer si bajo estas condiciones p36 se comporta como *arcA* de tabaco.

El inhibidor del transporte polar de auxinas (NPA) fué también utilizado durante la germinación de *P. vulgaris*; sin embargo, no se observó modificación considerable en el patrón de acumulación del mRNA de p36 (Fig. 18D). Se sabe que durante el desarrollo y germinación de las semillas el transporte de auxinas es activo, y que la inhibición del transporte tiene efecto en el desarrollo de la plántula. Los resultados demostraron que el

bloqueo en el transporte polar de auxinas no afectó la acumulación del mRNA que codifica para p36. Esto aunado al poco o nulo efecto en los niveles de mRNA acumulado como consecuencia del tratamiento con las auxinas, sugiere que la expresión de p36 a nivel transcripcional no está regulada por auxinas, al contrario de como sucede con *arcA* de tabaco donde la expresión del mRNA para esta proteína es activada por las auxinas.

En algunos genomas de plantas se ha identificado más de una copia del gen que codifica para homólogos de RACK1. Sin embargo, el análisis por *Southern blot* con la sonda de 936 pb's del cDNA que codifica para p36, reveló muy pocas bandas de digestión que hibridaron con la sonda marcada a la astringencia utilizada. Esto indica que hay solo uno o dos genes que codifican para p36 en el genoma de *P. vulgaris*. En el caso de *Bam*HI que no tiene sitios de restricción en la secuencia de 936 pb's conocidos, se observan dos fragmentos que hibridaron con la sonda, por lo que podría tener un sitio de restricción en el fragmento que aún no se conoce de la secuencia o en intrones dentro del gen. Por otro lado, la enzima *Bgl*III y *Kpn*I tienen un sitio de restricción dentro de la secuencia de los 936 pb's, y en ambos casos sólo se observa una banda de alto peso molecular que fué detectada por la sonda, lo que indica que la enzima no cortó el DNA, probablemente porque la reacción de digestión no fué eficiente; sin embargo, se llevaron a cabo varias repeticiones de este experimento y en todos los casos se observó el mismo resultado. El bajo número de genes que codifican a p36 es similar a los resultados encontrados en soya (Nielsen, *et al.*, 2001); *Arabidopsis* y maíz (Weiss *et al.*, 1994), y alfalfa (McKhann, *et al.*, 1997). Adicionalmente, se sabe que algunos genes de frijol son representados por pocas copias en el genoma. Tal es el caso de la profilina que solo tiene una o dos copias y sus múltiples isoformas son reguladas a nivel postraduccional por fosforilación en tirosinas (Guillén *et al.* 1999). Por ello, no podría descartarse que p36 tuviera características similares.

La función específica de las proteínas homólogas a RACK1 en plantas aún no ha sido determinada en ninguna de las especies en las que estas se han identificado. Por tanto una prioridad a corto plazo es elucidar la/las posibles funciones de esta proteína en sistemas vegetales, ya que su blanco característico (PKC) en animales, no se ha identificado en plantas hasta la fecha. Algunos de los estudios necesarios para determinar la función de p36 requieren de técnicas que no son aplicables en el sistema que se utilizó en este trabajo (frijol), por lo que el uso de sistemas alternos como el caso de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* serían de gran ayuda en la determinación de la función y localización de p36.

VIII. CONCLUSIONES

- Los anticuerpos anti-PA218 no reconocen a p36 en estado nativo en *western blot* y columnas, por lo que no serían útiles en ensayos en los que se requiriera reconocer a p36 en estado nativo.
- A partir de reacciones de RT-PCR y RACE 3' se obtuvieron 936 pb's del cDNA que codifica para p36; la traducción de esta secuencia reveló un total de 311 aminoácidos.
- La secuencia en aminoácidos de p36 tiene 96, 85 y 83% de identidad con las secuencias de la probable G_β de *G. max*, *arcA* de *Arabidopsis* y *N. tabacum* respectivamente. A nivel de nucleótidos las identidades son de 89, 80 y 75% respectivamente con las mismas secuencias. Con la G_β canónica de *Arabidopsis* p36 tiene solo 21% de identidad a nivel de aminoácidos, pero con RACK1 de *H. sapiens* presenta 67 y 76% de identidad a nivel de aminoácidos y nucleótidos respectivamente; por lo tanto, p36 es una proteína homóloga a RACK1 de animales.
- La secuencia obtenida en aminoácidos presenta siete dominios WD-40. Además, tiene dos péptidos que tienen alta identidad con los péptidos en RACK1 de humanos, que se conoce son indispensables para la unión a la PKC activa.
- p36 se detectó durante la germinación en niveles constantes durante los tiempos analizados de 0-48 h, pero a nivel de mRNA se observó un aumento gradual desde las 0 h y hasta las 32 h de imbibición, que de igual forma descendió hasta no detectarse a las 48 h de imbibición.
- El IAA y el 2,4-D aplicadas exógenamente durante la germinación retrasan el punto de máxima acumulación de p36, de 32 a 40 h de imbibición. El inhibidor del transporte polar de auxinas (2,4-D), no tuvo efecto en la acumulación del mRNA de p36.
- El IAA además de retrasar el punto de máxima acumulación de mRNA de 32 a 40 h, lo mantiene hasta las 48 h en el hipocotilo-ápice.
- Un fragmento de 580 pb's del cDNA de p36 fué expresado en forma soluble en células de *E. coli* y utilizado para producir anticuerpos específicos contra p36. Los anticuerpos específicos contra el fragmento de p36 reconocen a la proteína recombinante en *western blot*. Adicionalmente, anticuerpos anti-RACK1 diseñados contra el carboxilo terminal de humanos reconocen eficientemente a la proteína recombinante de p36 expresada en *E. coli*.

- p36 es codificada por sólo uno o dos genes en *P. vulgaris*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre J, Lassalles J, Kado R** (1990). Opening Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **343**:567-570
- Allen G, Muir SR, Sanders D** (1995). Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**:735-737
- Assman S** (1995). Cyclic AMP as second messenger in higher plants. *Plant Physiol.* **108**:885-889
- Bolwell P** (1995). Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *Trends Biochem. Sci.* **20**:492-495
- Bowler C, Chua N** (1994). Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* **6**:1529-1541
- Chen Q, Brglez I, Boss W** (1991). Inositol phospholipids as plant second messengers. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **45**:159-175
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159
- Corpet F** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**:10881-10890
- Davenport R** (2002). Glutamate Receptors in Plants. *Annals Botany* **90**:549-557
- Díaz-Camino C, Conde R, Ovsenek N, Villanueva M** (2005). Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* **412**:557-565
- Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A** (2002). ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Applied Bioinf.* **1**:107-108
- Gilroy S, Trewavas A** (1994). A decade of plant signals. *BioEssays* **16**:677-682
- Guillén G, Valdés-López V, Noguez R, Olivares J, Rodríguez-Zapata LC, Pérez H, Vidali L, Villanueva MA, Sánchez 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.* **5**:497-508
- Harmon A, Gribskov M, Harper J** (2000). CDPKs—a kinase for every Ca^{2+} signal?. *Trends Plant Sci.* **5**:154-159
- Hwang I, Chen H-C, Sheen J** (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**:500-515
- Inzé D, Montagu M** (1995). Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.* **6**:153-158
- Ishida S, Takahashi Y, Nagata T** (1993). Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein β subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11152-11156
- Islas-Flores T** (2002). Caracterización de la subunidad β de una proteína G heterotrimérica en ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris*. Tesis Licenciatura UAEM, Cuernavaca, Morelos, México.

- Iwasaki Y, Komano M, Ishikawa A, Sasaki T, Asahi T** (1995). Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant Cell Physiol.* **3**:505-510
- Jones H, Smith S, Desikan R, Plakidou-Domock S, Lovegrove A, Hooley R** (1998). Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* **10**:245-254
- Kaydmov C, Tewes A, Adler K, Manteuffel R** (2000). Molecular characterization of cDNAs encoding G protein α and β subunits and study of their temporal and spatial expression patterns in *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Biochim. Biophys. Acta* **1491**:143-160
- Kwak J, Kim S, Lee S, Oh S-A, Byoun C-H, Han J-K, Nam H** (1997). cDNA clone with high similarity to a mammalian receptor for activated protein kinase C. *Planta* **201**:245-251
- Laemmli U** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Laubinger S, Fittinghoff K, Hoecker U** (2004). The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:2293-2306
- Lease K, Wen J, Li J, Doke J, Liscum E, Walker J** (2001). A Mutant *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein subunit affects leaf, flower, and fruit development. *Plant Cell* **13**:2631-2641
- Leckie C, McAinsh M, Montgomery L, Priestley A, Staxen I, Webb A, Hetherington A** (1998). Second messengers in guard cells. *J. Exp. Bot.* **49**:339-349.
- Maher E, Martindale S** (1980). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochem. Genet.* **18**:1041-1053
- Mason M, Botella J** (2001). Isolation of a novel G-protein γ -subunit from *Arabidopsis thaliana* and its interaction with G_{β} . *Biochim. Biophys. Acta* **1520**:147-153
- McCarty D, Chory J** (2000). Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell Press* **103**:201-209
- McKhann H, Frigier F, Petrovics G, Coba de la Peña T, Jurkevitch E, Brown S, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M** (1997). Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division? *Plant Mol. Biol.* **34**:771-780.
- Møller S, Chua N-H** (1999). Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J. Mol. Biol.* **293**:219-234
- Munnik T** (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* **6**:227-233
- Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua N-H** (1993). Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**:937-952

- Nielsen N, Beilinson V, Bassüner R, Reverdatto S (2001).** A G_β-like protein from soybean. *Physiol. Plantarum* **111**:75-82
- Nocker S, Ludwig P (2003).** The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genom.* **4**:1-11
- Obrdlik P, Neuhaus G, Merkle T (2000).** Plant heterotrimeric G protein β subunit is associated with membranes via protein interactions involving coiled-coil formation. *FEBS Lett.* **476**:208-212
- Pawson T (2003).** Home page for Pawson Lab. Samuel Lunenfeld Research Institute. Domains information Website: <http://www.mshri.on.ca/pawson/index.html>
- Pawson T, Raina M, Nash P (2001).** Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett.* **513**:2-10
- Pedley K, Martin G (2004).** Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the pto-mediated defense response of tomato. *J. Biol. Chem.* **279**:49229-492350
- Ron D, Chen C-H, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D (1994).** Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the β subunit of G-proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 839-843
- San Román-Roque C (2001).** Identificación y caracterización de dos proteínas relacionadas con la transducción de señales, presentes en el embrión de las semillas maduras de *Phaseolus vulgaris*. **Tesis de Maestría.** IBT-U.N.A.M.
- Seo H, Watanabe E, Tokutomi S, Nagatani A, Chua N-H (2004).** Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **18**:617-622
- Shaddad A, Radi A, Zidan M, Hamada A (1990).** Effect of various concentrations of 2,4-D and 2,4,5-T on seed germination, dry matter yield and transpiration rate of some economic plants. *J. Islamic Acad. Sci.* **3**:124-130
- Smith R, Wiese B, Wojzynski M, Davison D, Worley K (1996)** BCM Search Launcher--an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the world wide web. *Genome Res.* **6**:454-62
- Stone J, Walker J (1995).** Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* **108**:451-457
- Subramanian C, Kim B-H, Lyssenko N, Xu X, Johnson C, Arnim A (2004).** The *Arabidopsis* repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: Mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**:6798-6802
- Svoboda P, Novotny J (2002).** Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **59**:501-512
- Tatusova T, Madden T (1999).** Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:247-250

- Terryn N, Van Montagu M, Inzé D** (1993). GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* **22**:143-152
- Tichtinsky G, Vanoosthuysse V, Cock J, Gaude T** (2003). Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends Plant Sci.* **8**:231-237
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354
- Trewavas, Malhó R** (1997). Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. *Plant Cell* **9**:1181-1195
- Trojanek J, Klimecka M, Fraser A, Dobrowolska G, Muszynska** (2004). Characterization of dual specificity protein kinase from maize seedlings. *Acta Biochim. Pol.* **51**:635-647
- Tuteja N, Chandra M, Tuteje R, Misra MK** (2004). Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J. Biomed. Biotech.* **4**:227-237
- Ullah H, Chen J-G, Temple B, Boyes D, Alonso J, Davis K, Ecker J, Jones A** (2003). The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* **15**:393-409
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **5**:67-74
- Villanueva MA** (2002). Elimination of artifacts on native western blots arising from endogenous lectin activity. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **50**:141-149
- Weiss CA, Garnaat CW, Mukai K, Hu Y, Ma H** (1994). Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein (β -subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9554-9558