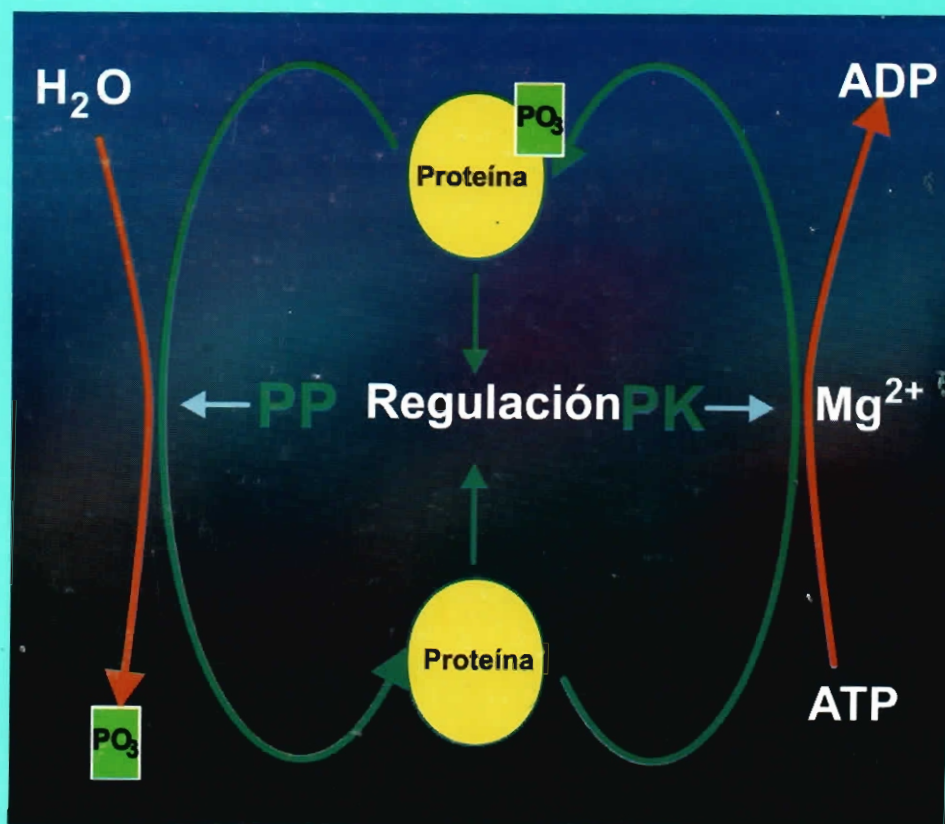


DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en raíces transformadas de *Catharanthus roseus* (L) G. Don



Luis Carlos Rodríguez Zapata

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

**Fosforilación de proteínas en residuos de
tirosina en raíces transformadas de
Catharanthus roseus (L) G. Don**

**Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:**

Luis Carlos Rodríguez Zapata

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**Mérida Yucatán, México
1998.**

Lista de abreviaturas

Abl. Leucemia de Abelson
ACTH. Hormona adrenocorticotrópica
cADN. Acido dexosirribonucleico complementario
anti-PY. Anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina
ASV. Virus del sarcoma de aves
Btk. Tirosina cinasa de células B
cdc25. Ciclo de división celular 25
CD45. Antígeno común de leucocitos
CDPK. Proteína cinasa con dominio similar a la calmodulina
C-src. C-src cinasa
EGF. Factor de crecimiento epidérmico
ERS. Sensor de respuesta a etileno
ERK1. Cinasa regulada por señales extracelulares tipo 1
ETR1. Resistente a etileno
FGF. Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH. Hormona folículo estimulante
GAP. Proteína activadora de la GTPasa de ras
GTP. Guanosina trifosfato
hsc70. Proteína de choque térmico 70
KAPP. Proteína fosfatasa asociada a cinasa
KI. Dominio de interacción de cinasa
LAR. Molécula relacionada con LCA
LCA. Antígeno común de leucocitos tipo CD45
LH. Hormona luteinizante
MAP cinasa. Proteína cinasa activada por mitógenos
OGA. Acido oligogalacturónico
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3-K. Fosfatidilinositol-3-cinasa
PLC γ 1. Fosfolipasa C- γ 1
PTP. Proteína tirosina fosfatasa
PTK. Proteína tirosina cinasa
PY. Fosfotirosina
RLK. Proteína cinasa similar a receptores

RR-SRC. péptido sintético derivado de la pp60^{src} cuya secuencia posee un sitio de fosforilación

SDS-PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SH. Complejo homólogo a *src*

Src. Sarcoma de rous

TGF. Factor de crecimiento de transformación

TSH. Tirotropina

VH1. Virus de la *Vaccinia* H1

AMINOACIDOS

Ala. Alanina

Arg. Arginina

Asp. Acido aspártico

Glu. Acido glutámico

Gly. Glicina

Ile. Isoleucina

Leu. Leucina

Tyr. Tirosina

A Dios,
A mis padres por todo su amor
y enseñanzas,
A mis hermanos, por su fe en mí,
A toda mi familia, al haberme ayudado
durante toda mi vida,
Les dedico este escrito con todo
mi amor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor en la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Fogarty International Research Collaboration Award (RO3TW00263) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (3016-N9306). Luis Carlos Rodríguez Zapata es becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (88205).

Agradezco de manera muy especial:

Al Dr. Victor Manuel Loyola Vargas, al Dr. Luis Gonzalez de la Vara, al Dr. Victor Baizabal Aguirre, a la Dra. Lorenza Gonzalez Mariscal Muriel, a la Dra. Renata Rivera Madrid y al Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández, por sus excelentes sugerencias y la revisión crítica con la que enriquecieron el presente trabajo.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, por su gran ejemplo de superación, por su apoyo incondicional, por su gran interés en mi formación académica y la revisión crítica del trabajo.

A las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., por permitirme realizar este trabajo, especialmente en la Unidad de Biología Experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Fogarty International Research Collaboration Award, por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Contenido

	Resumen	13
	Abstract	15
	Introducción	17
CAPITULO 1	Generalidades	21
CAPITULO 2	Proteína tirosina cinasas en células animales	25
CAPITULO 3	Proteína tirosina fosfatasa en células animales	31
CAPITULO 4	Fosforilación de proteínas en diversos residuos de aminoácidos en plantas	37
CAPITULO 5	Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en plantas	45
CAPITULO 6	Modelo de estudio: <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	49
CAPITULO 7	Evidence of protein-tyrosine kinase activity in <i>Catharanthus roseus</i> roots transformed by <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	53
CAPITULO 8	Detection of tyrosine phosphatase activity in <i>Catharanthus roseus</i> hairy roots	67
CAPITULO 9	Discusión general	77
CAPITULO 10	Conclusión general	87
CAPITULO 11	Perspectivas generales	89

Resumen

La percepción y transmisión celular de señales externas se lleva a cabo a través de receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática. La transmisión de la señal externa se inicia con la unión de una molécula señal (ligando) con su respectivo receptor. Una vez que el receptor ha sido activado se inicia una serie de reacciones intracelulares que regulan respuestas determinadas. Tales respuestas están controladas por diferentes mecanismos; uno de los más importantes es la fosforilación de proteínas. Tanto en procariontes como en eucariontes, se sabe que la fosforilación de proteínas tiene una función importante en la regulación de procesos involucrados en la transducción de señales, así como en la regulación de actividades enzimáticas.

Las proteínas pueden fosforilarse en residuos de treonina, serina, histidina y tirosina. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de la fosforilación en residuos de tirosina en células vegetales. Para ello se utilizó como modelo experimental raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

Los resultados indican que en la fracción membranal y en la soluble, obtenidas de extractos de las raíces transformadas de *C. roseus*, se encuentran varias proteínas capaces de ser fosforiladas *in vitro* empleando [³²P]-γ-ATP. En la fracción membranal se detectaron fosfoproteínas con pesos moleculares entre 10 y 173 kDa, mientras que en la fracción soluble se detectaron fosfoproteínas con pesos moleculares entre 37 y 116 kDa. Al inmovilizar las proteínas fosforiladas en membranas de nylon y posteriormente ser tratadas con KOH, se observaron varias proteínas membranales resistentes al tratamiento alcalino, con pesos moleculares de 10, 18, 25, 40 y 55 kDa; por otro lado en la fracción soluble se detectó solamente una proteína resistente a este tratamiento, con un peso molecular de 63 kDa. También se observó que las proteínas membranales con pesos moleculares de 40, 55 y 173 kDa y las proteínas solubles con pesos moleculares de 43, 47, 63, 103 y 116 kDa, son reconocidas por anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina, lo que indica que tales proteínas se fosforilan específicamente en residuos de tirosina.

Con la finalidad de detectar posibles PTKs presentes en los extractos celulares, se caracterizó la capacidad de las fosfoproteínas de autofosforilarse en residuos de tirosina. En la fracción soluble se observaron proteínas con pesos moleculares de 37, 43, 47, 63 y 72 kDa y en la fracción membranal proteínas con pesos moleculares de 35 y 40 kDa que dan señal positiva en un ensayo de fosforilación *in situ*. Este resultado sugiere que estas proteínas se autofosforilan en residuos de tirosina.

Para comprobar la actividad de tirosina cinasa, los extractos membranal y soluble, fueron utilizados para determinar la capacidad de estas proteínas de fosforilar al péptido RR-SRC. Este péptido contiene en su secuencia un único sitio de fosforilación en un residuo de tirosina. El resultado de este experimento indicó que tanto la fracción membranal como la soluble presentan actividad de PTK. Asimismo, las actividades de PTK fueron inhibidas por genisteína, un inhibidor específico de algunas cinasas de tirosina.

Debido a que los resultados anteriores indican la presencia de proteínas con actividad de PTK en las raíces transformadas de *C. roseus*, decidimos determinar la presencia de proteínas con actividad de tirosina fosfatasa denominadas proteína tirosina fosfatasas (PTP). Se conoce que el ortovanadato de sodio inhibe la actividad de las PTPs. Para comprobar la presencia de PTP en los extractos celulares de *C. roseus*, se utilizó ortovanadato de sodio en un ensayo de fosforilación *in vitro* para determinar si al inhibir a las PTPs se incrementaba la fosforilación en tirosina en las proteínas. El resultado indicó que dos proteínas solubles de 43 y 63 kDa incrementaron su capacidad de fosforilación en residuos de tirosina en presencia de ortovanadato sodio y ninguna proteína membranal incrementó su capacidad de fosforilación en residuos de tirosina en presencia de ortovanadato de sodio.

La fracción membranal y la soluble fueron utilizadas para determinar su capacidad para desfosforilar al RR-SRC [PY]. Tanto la fracción membranal como la soluble presentaron actividad de PTP. Las actividades de tirosina fosfatasa fueron inhibidas o activadas al incubar los extractos celulares con ortovanadato de sodio o β -mercaptoetanol, respectivamente.

En conclusión nuestros datos demuestran la presencia de proteína tirosina cinasas y proteína tirosina fosfatasas en las raíces transformadas de *C. roseus*.

Abstract

It is well known that cells perceive and transmit external signals through specific receptors localized on the plasma membrane. Upon stimulation these receptors transduce and amplify the signals towards inside the cell. When signaling occurs, the cell can use several mechanisms to control it; one of those is protein phosphorylation. In prokaryotes and eukaryotes, protein phosphorylation has a crucial role in both the regulation of processes involved in signal transduction and the regulation of enzymatic activity.

Proteins can be phosphorylated on tyrosine, serine and/or threonine residues. *Catharanthus roseus* hairy roots were used as the experimental model to prove the presence of tyrosine kinase activity in plant cells.

Our results show the presence of several proteins that are phosphorylated *in vitro* using [³²P]γ-ATP as the phosphate donor. In the particulate and soluble fractions several phosphoproteins with molecular masses between 10 and 173 kDa and between 37 and 116 kDa were found, respectively. When the phosphorylated proteins were immobilized on nylon membranes and treated with 1M KOH, several proteins in the particulate fraction were found to be alkaline resistant (10, 18, 25, 40 and 55 kDa). In the soluble fraction only one protein of 63 kDa was observed to be resistant to alkaline treatment. In both fractions, several proteins were recognized by monoclonal antibodies against tyrosine. Molecular masses of the proteins from the particulate fraction were 40, 55 and 173 kDa and those in the soluble fraction 43, 47, 63, 103, and 116 kDa.

One of the criteria to identify protein tyrosine kinases is the ability to autophosphorylate in tyrosine. In an *in situ* phosphorylation assay proteins with molecular masses of 37, 43, 47, 63, and 72 kDa in the soluble fraction and 35 and 40 kDa proteins in the particulate fraction gave positive signal, suggesting an autophosphorylation event on tyrosine residues.

Tyrosine kinase activity was assayed using the synthetic peptide RR-SRC (sequence derived from the pp60^{src} protein) in soluble and particulate fractions. This peptide has a unique site of phosphorylation corresponding to a tyrosine residue (Arg-Arg-leu-Ile-Glu-Asp-Ala-Glu-Tyr-Ala-Ala-Arg-Gly). Our results indicate that both fractions contain tyrosine kinase activity. When incubated with genistein, a specific tyrosine kinase inhibitor, the tyrosine kinase activities were inhibited in both fractions.

We decided to look for the presence of protein tyrosin phosphatase activity in our system. In order to do this, a set of different experiments were designed. We used sodium orthovanadate, a specific PTP inhibitor, to test whether this inhibitor would increase tyrosine phosphorylation in the particulate and soluble fractions of *C. roseus* hairy roots. We observed that two soluble proteins (43 and 63 kDa) were found to have a higher levels of phosphotyrosine content in the presence of sodium orthovanadate. We did not find any protein that its phosphorylation in tyrosine residues increase in presence of sodium orthovanadate in the particulate fraction.

In addition, membrane and cytosolic fractions were used to determine their ability to dephosphorylate the RR-SRC [PY] peptide. Tyrosine phosphatase activity was observed in both fractions. Tyrosine phosphatase activities were inhibited or activated

when the cell extracts were incubated with sodium orthovanadate or β -mercapthoetanol, respectively.

In conclusion we were able to demonstrate the presence of protein tyrosine kinase and protein tyrosine phosphatase activities in hairy roots of *C. roseus*.

Introducción

En los organismos pluricelulares, el mantenimiento de la homeostasis celular requiere de un continuo flujo de información entre las células que lo integran. Este flujo de información es necesario para coordinar y regular el desarrollo y la organización dentro de los tejidos, para controlar el crecimiento y la división celular, y para responder a señales químicas del medio ambiente (Hernández-Sotomayor, 1995). En estos complejos organismos la comunicación celular se realiza a través de diversas moléculas transductoras que actúan como señales extracelulares (Lodich *et al.*, 1995).

En los sistemas de animales las señales extracelulares se clasifican en señales endócrinas, parácrinas y autócrinas. Las señales endócrinas actúan en un sitio distante y diferente a su sitio de síntesis (células endócrinas), siendo usualmente transportadas a través de la sangre, hasta llegar a su sitio de acción (células blanco). Las moléculas extracelulares que funcionan como señales son denominadas hormonas. Las señales parácrinas actúan a corta distancia, de una célula a otra. Las moléculas involucradas en este tipo de señalización son conocidas como neurotransmisores y/o neurohormonas. Finalmente, las señales autócrinas se caracterizan por estimular a la misma célula en que se sintetiza, muchos factores de crecimiento actúan de esta manera (Lodich *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Ejemplos de algunos receptores y sistemas de transducción.

Sistema de transducción	Receptores	
	activadores	inhibidores
ADENILATO CICLASA	ACTH LH FSH Glucagon β -adrenérgico TSH Prostaglandina E1	Adenosina Dopamina Prostaglandina E2 α_2 -adrenérgico GABA-B
CANALES IONICOS	Acetilcolina GABA-A	
RECEPTORES ACOPLADOS A TIROSINA CINASAS	Interferón Eritropoietina	
GUANILATO CICLASA	Factor naturítico atrial	
TIROSINA CINASAS	Insulina FCE FCDP FCF	
TIROSIN FOSFATASAS	CD45	
TREONINA/SERINA CINASAS	TGF β	

CAPITULO 1

Generalidades

La fosforilación de proteínas fue descubierta en el año de 1906 cuando se observó por primera vez que las moléculas de fosfato se enlazan covalentemente a las proteínas. Durante años este descubrimiento impulsó a diversos grupos de investigación a determinar cuales aminoácidos se modifican por fosforilación; estos estudios identificaron a los residuos de serina, treonina y en pequeñas cantidades residuos de lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y cisteína como aceptores de las moléculas de fosfato (Hunter y Cooper, 1985). En ese tiempo no se logró determinar la existencia de la fosforilación en residuos de tirosina, ya que tal fosforilación posee la característica de ser un evento postraduccional muy raro y por lo consiguiente presentarse en cantidades bajas. Por ejemplo, se ha visto que el contenido de fosfotirosina en un tejido normal de células de animales, está entre 0.02 y 0.06% del total de las fosforilaciones (fosforilaciones en residuos de serina y treonina). Esta característica ha dificultado su detección en comparación con la fosforilación en residuos de serina y treonina. No fue hasta el año de 1979, cuando Eckhart *et al.*, descubrieron la primera proteína tirosina cinasa (PTK) de un retrovirus transformante que se fosforila en residuos de tirosina. Esta proteína fue aislada por métodos inmunológicos utilizando suero inmune obtenido de conejos que recibieron trasplantes de tumores inducidos por el virus del sarcoma de aves (ASV). Con este suero fue posible precipitar la proteína y posteriormente sintetizarla *in vitro* a partir de la región del ARN viral que contiene al gen *v-src* (virus del sarcoma de Rous). Asimismo, se estableció que la proteína presentaba moléculas de fósforo unidos; a esta proteína se le denominó pp60^{v-src}, por ser una fosfoproteína y tener la capacidad de fosforilarse y fosforilar a otras proteínas en residuos de tirosina (Hunter y Cooper, 1985; Aranda-Anzalda, 1988).

En la actualidad, se sabe que la fosforilación neta en los residuos de tirosina es regulada por la actividad de las PTKs y las PTPs (Hernández-Sotomayor y Carpenter, 1993; Sun y Tonks, 1994). La primera proteína tirosina fosfatasa caracterizada fue descubierta por Tonks *et al.* (1988) y fue denominada como PTP 1B. Esta proteína presenta una secuencia de aminoácidos diferente a la familia de las proteína serina/treonina fosfatasas (Fischer *et al.*, 1991; Walton y Dixon, 1993).

En particular, se sabe que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina regula la estructura y la actividad de diversas enzimas (Verhey *et al.*, 1993), ya que se ha visto, que al bloquear la actividad de las PTKs y de las PTPs en las células, conduce a procesos como la transformación oncogénica, crecimiento y diferenciación celular anormal (Sun y Tonks, 1994; Fauman y Saper, 1996).

Hasta el momento no se tiene un panorama completo de la interacción entre cinasas, fosfatasas, sus sustratos y sus efectores. Sin embargo, se han identificado y aislado a través de métodos bioquímicos y de biología molecular, una gran diversidad de PTKs y PTPs (Hunter, 1989; 1995). Con la información que se tiene, estas enzimas

pueden clasificarse en dos grandes grupos que pueden presentar actividad de PTK o de PTP: receptores transmembranales y proteínas citosólicas.

Hasta ahora son muy pocos los estudios sobre la presencia de proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina en las plantas. Sin embargo, el estudio de la transducción de señales, reguladas por fosforilación y desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina, podría ayudar a comprender el mecanismo de regulación de varias proteínas involucradas en la biosíntesis de los alcaloides indólicos. Es por esto que el objetivo general de este trabajo es determinar la presencia de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, planteandose los siguientes objetivos particulares:

- Demostrar la presencia de fosfoproteínas utilizando [³²P]γ-ATP.
- Inmunodetectar la fosforilación en residuos de tirosina a través de anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina.
- Identificar la fosforilación específica en residuos de tirosina por hidrólisis alcalina.
- Identificar que proteínas fosforiladas en tirosina presentan autofosforilación.
- Determinar la presencia de actividad de proteína tirosina cinasas utilizando sustratos artificiales e inhibidores específicos contra proteína tirosina cinasas.
- Determinar la presencia de proteína tirosina fosfatasas empleando sustratos artificiales e inhibidores específicos contra proteína tirosina fosfatasas.

REFERENCIAS

Aranda-Anzalda A. (1988) En la frontera de la vida: los virus. Fondo de cultura económica. p. 112.

Eckhart W., M.A. Hutchinson y T. Hunter (1979)*****. *Cell* **18**: 925-933.

Fauman E.B. y M.A. Saper (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochem. Sci.* **21**: 413-417.

Fischer E.H., H Charbonneau y N.K Tonks (1991) Protein tyrosine phosphatase: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**: 401-406.

Hernández-Sotomayor S.M.T. y G. Carpenter (1993) Non-catalytic activation of phospholipase C-γ1 *in vitro* by epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* **293**: 507-511.

Hunter T. (1989) Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues. *Curr. Opin. in Cell Biol.* **1**: 1168-1181.

Hunter T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**: 225-236.

Hunter T. y J.A. Cooper (1985) Protein-tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 897-930.

Sun H. y N.K. Tonks (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatase and kinases in cell signaling. *Trends in Biochem. Sci.* **19**: 480-485.

Tonks N.K., C.D. Diltz y E.H. Fischer (1988)*****. *J. Biol. Chem.* **263**: 6722.

Verhey S., J.C. Gaiser y T.L. Lomax (1993) Protein kinases in zucchini: characterization of calcium-requiring plasma membrane kinases. *Plant Physiol.* **103**: 413-419.

Walton K.M. y J.E. Dixon (1993) Protein tyrosine phosphatase. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 101-120.

CAPITULO 2

Proteína tirosina cinasas en células animales

RECEPTORES TRANSMEMBRANALES CON ACTIVIDAD DE PTK

En las células animales la respuesta biológica a señales extracelulares es regulada por la unión y activación de receptores transmembranales específicos (Ullrich y Schlessinger, 1990; Lemmon y Schlessinger, 1994; Drayer y van Haastert, 1994). Los receptores se clasifican en diferentes familias en base a sus similitudes estructurales y modo de acción con el que desencadenan la señal de transducción. Una de estas familias corresponde a los receptores transmembranales con actividad de PTK. Estos receptores transmembranales se agrupan en cuatro grandes subgrupos. Los prototipos de cada uno de los subgrupos están representados por el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGF, clase I), el receptor para la insulina (clase II), el receptor para el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, clase III) y el receptor para el factor del crecimiento de fibroblastos (FGF, clase IV) (Figura 2) (Ullrich y Schlessinger, 1990; Drayer y van Haastert, 1994).

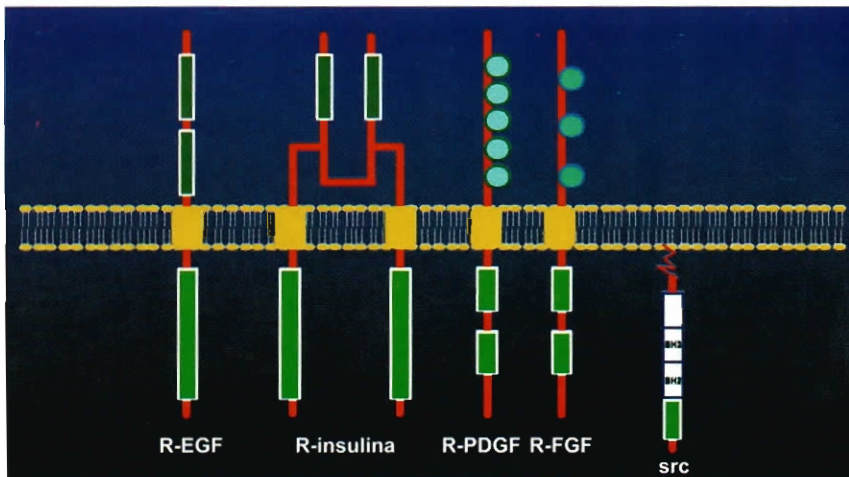


Figura 2. Representación de la estructura primaria de la proteína tirosina cinasa. (■) región de tirosina cinasa; (●) región transmembranal; (■) región rica en residuos de cisteína; (■) región similar a las inmunoglobulinas (Ullrich y Schlessinger, 1990).

Los receptores transmembranales del tipo descrito en la figura 1, presentan una región extracelular altamente glucosilada, la cual posee el sitio de unión a su respectivo ligando, un dominio transmembranal (con gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos) y una región citoplasmática con actividad de PTK (Ullrich y Schlessinger, 1990; Drayer y van Haastert, 1994). La región extracelular del receptor para el EGF y el receptor para la insulina, tienen un dominio rico en residuos de cisteína, mientras que el dominio extracelular del receptor para PDGF y el receptor del FGF poseen estructuras similares a las inmunoglobulinas (Figura 2) (Ullrich y Schlessinger, 1990; Drayer y van Haastert, 1994).

Existen evidencias de que los receptores presentan varios sitios de autofosforilación en residuos de tirosina en la región citoplasmática, y que además tienen la función de amplificar la señal hacia otras proteínas que funcionan como sustratos para los receptores (Ullrich y Schlessinger, 1990; Drayer y van Haastert, 1994; Kazlauskas y Cooper, 1989).

Los receptores, al ser activados por la unión de su ligando, transducen y amplifican la señal a través de la activación y fosforilación de algunas proteínas en residuos de tirosina. Entre las proteínas fosforiladas se encuentran la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1), con un peso molecular de 145 kDa. Esta enzima hidroliza al fosfatidilinositol bisfosfato para generar dos segundos mensajeros: el inositol trisfosfato y el diacilglicerol. Una segunda proteína que se activa por fosforilación en residuos de tirosina es la proteína activadora de la GTPasa de *ras* (GAP) (Ullrich y Schlessinger, 1990; Drayer y van Haastert, 1994). Otra proteína que funciona como sustrato de estos receptores es la fosfatidilinositol-3 (PI-3) cinasa. La PI-3 cinasa está conformada por una subunidad catalítica de 110 kDa y una subunidad regulatoria de 85 kDa.

Existen evidencias que sugieren que la función principal de la PI-3 cinasa es fosforilar al anillo del inositol en la posición 3 produciendo PI 3,4,5- P_3 (Drayer y van Haastert, 1994; Rameh *et al.*, 1995). La PLC- γ 1, la GAP y la PI-3 cinasa comparten una secuencia conservada de aproximadamente 100 aminoácidos llamada SH2 (complejo homólogo a *src*), que interactúa con los residuos de fosfotirosina en las proteínas (Pawson, 1995). Se ha demostrado que la fosforilación *in vitro* en residuos de tirosina y la asociación de la PLC- γ 1 con el receptor para el EGF, causan cambios en la actividad de la PLC- γ 1 (Hernández-Sotomayor y Carpenter, 1993).

Existen reportes que sugieren que los receptores con actividad de PTK pueden ser regulados por un mecanismo de oligomerización (Ullrich y Schlessinger, 1990). Se ha observado que algunos ligandos, como el EGF, al unirse a su respectivo receptor, provocan un cambio conformacional en el receptor, el cual da como resultado una autofosforilación y la interacción intermolecular con otros receptores (Ullrich y Schlessinger, 1990). Por otra parte, Ballotti *et al.*, (1989) reportaron que la autofosforilación *in vitro* o *in vivo* del receptor para el EGF y el receptor para insulina, puede ocurrir a través de una fosforilación intermolecular cruzada.

PROTEINA TIROSINA CINASAS CITOSOLICAS

Muchas proteína tirosina cinasas tienen la característica de no presentar el dominio extracelular ni el dominio transmembranal, siendo PTKs intracelulares (Cuadro 2).

Hasta la fecha, se ha determinado una gran cantidad de proteínas intracelulares, de las cuales la mayoría son un producto de proto-oncogenes y de oncogenes. Agrupándose tales proteínas en diferentes subfamilias, la subfamilia SRC (sarcoma de Rous), la subfamilia CSK (C-src cinasa), la subfamilia BTK (Tirosina cinasa de células B), y la subfamilia ABL (Leucemia de Abelson). Sin embargo, el prototipo de esta gran familia, es la subfamilia SRC que se encuentra integrada por la proteínas intracelulares *Src*, *Yes*, *Yrk*, *Fyn*, *Fgr*, *Blk*, *Hck*, *Lyn* y *Lck* (Resh, 1994; Superti-Furga y Courtneidge, 1995) (Cuadro 2).

Una característica que tienen las PTKs citosólicas es la de ser estructuralmente similares (Figura 2). Por lo cual, sus mecanismos de regulación son también similares. Existen evidencias de que estas proteínas poseen una gran cantidad de aminoácidos básicos (aproximadamente 15 residuos de aminoácidos). Los residuos básicos interactúan electrostáticamente con las cargas negativas de los fosfolípidos, permitiendo su asociación de la proteína con los fosfolípidos de la membrana plasmática. Asimismo, se ha visto que la proteína *src* puede ser modificada por una miristilación co-traduccional en una glicina, en la secuencia Met-Gli-X-X-Ser/Tre, lo que le permite su anclaje en la membrana plasmática (Resh, 1994). Se conoce que durante la síntesis de la proteína *src*; el residuo de metionina es eliminado por una metionina aminopeptidasa y entonces el miristato se une covalentemente, a través de uniones amida, al extremo amino terminal de una glicina, siendo la enzima encargada de catalizar la reacción, la N-miristil-transferasa (Resh, 1994).

Posteriormente se identificó una región de tamaño variable en las PTKs citosólicas de la subfamilia SRC. Se ha descrito que esta región en *Lyn*, *Hck*, *Lck* y *Blk*, se encuentra conformada de 40 a 50 aminoácidos, mientras que en *Src*, *Yes*, *Fyn*, *Yrk* y *Fgr* está compuesta de 70 aminoácidos (Superti-Furga y Courtneidge, 1995). En la región variable, se han encontrado dos dominios conocidos con la abreviación de SH3 y SH2 (complejo homólogo a *src*). Estas regiones se encuentran conservadas entre los miembros de la subfamilia. Estudios de cristalografía han demostrado que la proteína tirosina cinasa *lck*, posee ambos dominios en el extremo carboxilo terminal y se encuentran separados por solo dos aminoácidos. La función principal que desempeña el dominio SH2, es el reconocimiento de las fosfotirosinas contenidas en la proteína-sustrato. El dominio SH3 tiene la capacidad de reconocer y unirse a una región rica en prolina contenida en la proteína-sustrato, estabilizando la interacción existente entre la región SH3 y la proteína-sustrato (proteínas del citoesqueleto) (Superti-Furga y Courtneidge, 1995).

Cuadro 2. Ejemplos de algunas proteína tirosina cinasas intracelulares.

FAMILIA	SUBFAMILIA	PROTÓTIPO	OTROS MIEMBROS
	SRC	Src (sarcoma Rous)	Yes Yrk Fgr Blk Hck Lyn Lck
Tirosina cinasas intracelulares	CSK	Csk (c-src cinasa)	Matk Hyl Lsk Ctk Ntk
	ABL	Abl (leucemia de Abelson)	Arg
	BPK	Btk (tirosina cinasas de células B)	Atk/Bpk Itk/Tsk Tec Src28C

Las PTKs citosólicas tienen un dominio catalítico situado en el extremo carboxilo terminal, el que tiene la función de catalizar la unión del fosfato a la proteína. El dominio catalítico se encuentran dividido en 11 regiones (I-XI). Se ha demostrado que los miembros de la subfamilia SRC poseen una secuencia conservada, RAAHRDL ó RSAHRLD, en la región VI. Otra característica que tiene esta subfamilia es la presencia de un sitio de autofosforilación en un residuo de tirosina entre la regiones VII y VIII, sitio conocido como lóbulo de activación. Asimismo, poseen la secuencia conservada IEDNEYTAR que incluye un sitio de fosforilación en tirosina (Superti-Furga y Courtneidge, 1995).

Hasta el momento se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo de regulación de la proteína Src. Hunter (1987) reporta que la mutación del residuo de tirosina 527 localizado en el extremo carboxilo terminal de Src de pollo, genera una proteína oncogénica. Asimismo se ha reportado que en las células de mamíferos la fosforilación del residuo de tirosina 527, da como resultado la interacción intramolecular entre la proteína src y su dominio SH2 (Cooper y Howell, 1993). Por otra parte, se ha observado que la mutación del dominio SH2 de la proteína c-Src tiene una función importante en la conversión de c-Src a una proteína transformante

(Cooper y Howell, 1993). Estos resultados sugieren que la fosforilación del residuo de tirosina permite su interacción intramolecular con el dominio SH2, adoptando una conformación asociada a una baja actividad catalítica.

Por otra parte, se requiere el dominio SH3 de la proteína Src para estabilizar tal conformación, siendo necesario para su actividad (Superti-Furga y Courtneidge, 1995). Evidencias recientes señalan que el dominio SH3 contiene una gran cantidad de residuos aromáticos, lo que lo convierte en un dominio hidrofóbico. Los aminoácidos aromáticos son necesarios para interactuar intramolecularmente con las proteínas que funcionan como sustratos (Superti-Furga y Courtneidge, 1995). Se sospecha que al desfosforilarse el residuo de tirosina 527, la proteína toma una conformación abierta, exponiendo sus dominios SH2 y SH3 y por consiguiente aumentando su actividad de PTK. Estos dominios poseen la capacidad de reconocer y estabilizar la unión con el sustrato (Superti-Furga y Courtneidge, 1995).

También se ha demostrado en la proteína *src*, mediante estudios de mutación puntual en la que la tirosina 527 es sustituida por un residuo de fenilalanina, la existencia de fosforilación en el residuo de tirosina 416. La fosforilación del residuo de tirosina 416 no es requerido para la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, existen evidencias que indican que la fosforilación de la tirosina 416 produce cambios en la eficiencia de transformación de la célula. Asimismo, existen evidencias que indican que la tirosina 416 de la proteína *c-Src*, es un sitio importante de autofosforilación *in vitro*. Se cree que la autofosforilación de este residuo de tirosina, puede llevarse a cabo a través de una interacción intramolecular (Superti-Furga y Courtneidge, 1995).

REFERENCIAS

Balloti R., R. Lammers, I.C. Scimeca, T. Dull, J. Schlessinger, A. Ullrich y E. van Obberghen (1989) Intermolecular transphosphorylation between insulin receptors and EGF-insulin receptor chimeras. *EMBO J.* **8**: 3303-3309.

Cooper J.A. y B. Howell (1993) The when and how of Src regulation. *Cell* **73**: 1051-1054.

Drayer A.L. y P.J.M. van Haastert (1994) Transmembrane signaling in eukaryotes: a comparison between higher and lower eukaryotes. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1239-1270.

Hernández-Sotomayor S.M.T. y G. Carpenter (1993) Non-catalytic activation of phospholipase C- γ 1 *in vitro* by epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* **293**: 507-511.

Hunter T. (1987) A tail of src's: mutatis mutandis. *Cell* **49**: 1-4.

Kazlauskas A. y J.A. Cooper (1989) Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinases insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* **58**: 1121-1132.

Lemmon M.A. y J. Schlessinger (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in Biol. Sci.* **19**: 459-463.

Pawson T. (1995) Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**: 573-580.

Rameh L.E, C. Ching-Shih y L.C. Cantley (1995) Phosphatidylinositol (3,4,5) P₃ interacts with SH2 domain and modules PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* **83**: 821-830.

Resh M.D. (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of matter. *Cell* **76**: 411-413.

Superti-Furga G. y S.A. Courtneidge (1995) Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *BioEssays* **17**: 321-330.

Ullrich A. y J. Schlessinger (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.

CAPITULO 3

Proteína tirosina fosfatasas en células animales

RECEPTORES TRANSMEMBRANALES CON ACTIVIDAD DE PTP

Las proteínas de la familia de las proteína tirosina fosfatasas poseen una estructura similar a la de los receptores para los factores de crecimiento; son proteínas integrales de la membrana plasmática, siendo denominadas proteína tirosina fosfatasas (PTP) (Figura 3). Las PTP presentan una región extracelular, una región transmembranal y una región intracelular; esta última contiene dos regiones catalíticas. El prototipo de esta familia es la proteína CD45 (antígeno común de leucocitos) (Fischer *et al.*, 1991). Se ha reportado que la CD45 tiene una importante función en la activación de los linfocitos. La CD45 transmite una señal a través de la activación por desfosforilación de la proteína tirosina cinasa p56^{lck} en el residuo de tirosina 505. La CD45 tiene también la capacidad de desfosforilar y activar a la p59^{fm} (Walton y Dixon, 1993).

La CD45 es una glucoproteína membranal que presenta una región extracelular que contiene una gran cantidad de sitios de glucosilación; además, contiene secuencias ricas en residuos de cisteína. La región extracelular de la CD45 tiene un esfingolípidio en que se le une covalentemente un miristato (Fischer *et al.*, 1991). El dominio transmembranal posee una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos lo que le permite integrarse y moverse en la membrana plasmática (Figura 3). Por otra parte, la región intracelular posee dos dominios con actividad intrínseca de PTP separados, uno del otro, por una secuencia de aproximadamente 58 aminoácidos. Estos dominios se encuentran localizados en el carboxilo terminal de la glucoproteína (Fischer *et al.*, 1991). Experimentos realizados con la proteína tirosina fosfatasa LCA (antígeno común de leucocitos tipo CD45), indican que al mutar los residuos de cisteína en el primer dominio, se inhibe su actividad de PTP. Sin embargo, con la mutación de las cisteínas del segundo dominio, la capacidad catalítica de la enzima no se altera. Estos experimentos sugieren que el segundo dominio es catalíticamente inactivo (Walton y Dixon, 1993). Se piensa que el segundo dominio puede tener un efecto regulatorio sobre el primer dominio. Streuli *et al.*, (1989) encontraron que la eliminación del segundo dominio en la proteína LAR (molécula relacionada con LCA), altera la especificidad por el sustrato. Sin embargo, aún existen dudas de que el segundo dominio tenga la función de dar la especificidad por el sustrato, ya que otros autores han reportado que la mutación del segundo dominio de LAR, no afecta la especificidad de la enzima por su sustrato (Walton y Dixon, 1993).

A partir de la identificación de la CD45, se han clonado e identificado 15 distintas PTP en una gran variedad de especies, encontrándose una heterogeneidad muy grande en la región extracelular, lo que sugiere que estas proteínas pueden responder a una gran diversidad de ligandos (Hernández-Sotomayor, 1995). Por ejemplo, el dominio extracelular de la PTP μ contiene un dominio MAM (membrina, antígeno A5, PTP μ), un dominio similar al de las inmunoglobulinas y una secuencia de

fibronectina tipo III. La función de las PTP μ es mediar la interacción homofílica entre las células y regular el crecimiento celular. Mientras tanto la PTP ζ posee en su dominio extracelular una región de anhidrasa carbónica, que reconoce a otra célula neural (Fauman y Saper, 1996).

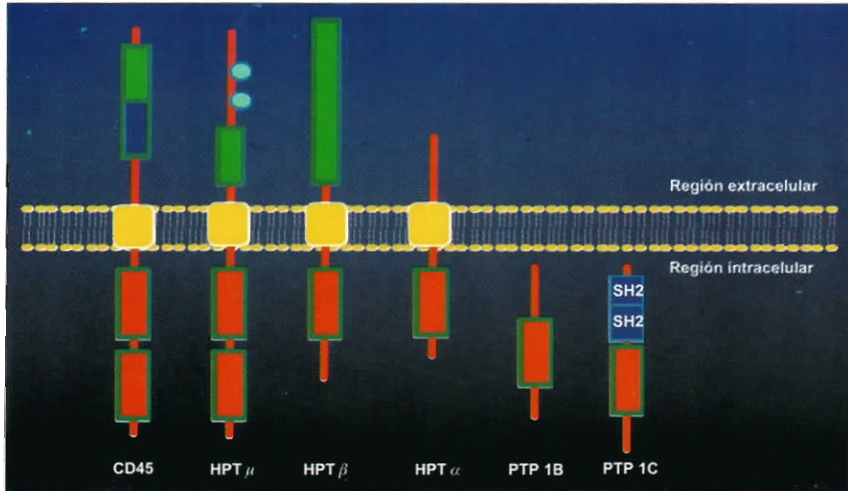


Figura 3. Representación de la estructura primaria de la proteína tirosina fosfatasa. Región extracelular: dominio similar a fibronectina; (■) dominio similar al de las inmunoglobulinas; (■). Región transmembranal: (■). Región intracelular: dominio catalítico de proteína tirosina fosfatasa (■). (Walton y Dixon, 1993).

Se ha visto que el dominio catalítico de las PTP contiene un residuo de cisteína y de arginina separados por 5 aminoácidos (Cx₅A). Estos aminoácidos son importantes en la catálisis enzimática. Se ha visto que la cisteína funciona como un centro nucleofílico aceptor del fosfato que proviene del aminoácido fosforilado, formándose una fosfocisteína. Por su parte, la arginina estabiliza tal interacción a través de puentes de hidrógeno que se unen a los oxígenos del fosfato. Se piensa que un tercer residuo, el ácido aspártico, actúa como un donador de protones que se une a los oxígenos de la molécula de fosfato, generando hidroxilos no cargados. Posteriormente, el fosfato es transferido a una molécula de agua, restaurando la conformación de la enzima (Figura 4) (Fauman y Saper, 1996).

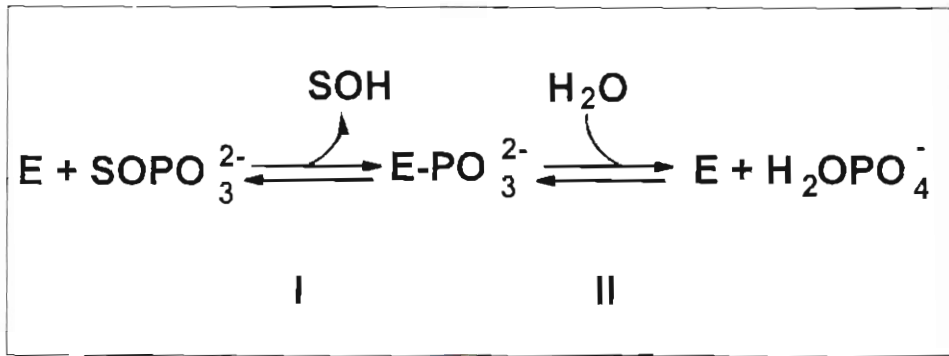


Figura 4. Reacción general de una proteína fosfatasa. S, es el sustrato que tiene un aminoácido fosforilado; E, proteína tirosina fosfatasa. Este sustrato es liberado como un alcohol protonado (paso I). La hidrólisis de la fosfoenzima genera una molécula de fosfato (paso II).

PROTEINA TIROSINA FOSFATASAS CITOSOLICAS

Muchas proteína tirosina fosfatasas no tienen dominio extracelular ni dominio transmembranal por lo que se les han clasificado como PTPs intracelulares. El prototipo de estas proteína fosfatasas es la proteína tirosina fosfatasa aislada de la placenta humana, denominada PTP 1B (Figura 2 y Cuadro 3). Esta proteína contiene un dominio catalítico localizado en el extremo del amino terminal y ocupa casi el 55% de la secuencia total de la proteína (Walton y Dixon, 1993). En el carboxilo terminal de la PTP 1B se encuentra una secuencia hidrofóbica que tiene una función importante para su anclaje en las membranas del retículo endoplasmático (Fauman y Saper, 1996).

Algunas PTPs intracelulares, como la PTP 1C y la PTP 1D, presentan dos regiones SH2. Estas regiones permiten el reconocimiento y la unión a residuos de fosfotirosina contenidas en la proteína-sustrato. Pluskey *et al.*, (1995), determinaron

que al ser ocupadas ambas regiones SH2 en la proteína SH-PTP2, ésta incrementan la afinidad por su sustrato.

Otro grupo de PTPs intracelulares, como la PTP MEG1 (megacariocito) y la PTP H1, contienen regiones homólogas a proteínas asociadas a citoesqueleto. Se ha reportado que algunas proteínas del citoesqueleto están fosforiladas en tirosina, por lo tanto podrían ser sustratos importantes para este grupo de PTPs (Walton y Dixon, 1993).

Cuadro 3. Proteína tirosina fosfatasa

PTP	ORGANISMO	TIPO	TAMAÑO*	No. DE DOMINIOS DE CATALITICOS
CD45	Humano Rata Ratón	R tipo I R tipo I R tipo I	1,120-1,281	2
LAR	Humano	R tipo II	1,881	2
DLAR	<i>Drosophila</i>	R tipo II	1,997	2
DPTP	<i>Drosophila</i>	R tipo II	1,439	2
HPTP β	Humano	R tipo III	1,975	1
RPTP α	Ratón	R tipo IV	793	2
HPTP α	Humano	R tipo IV	774	2
HLRP	Humano	R tipo IV	793	2
LRP	Ratón	R tipo IV	793	2
HPTP ϵ	Humano	R tipo IV	681	2
HPTP δ	Humano	R tipo II?	>1,523	2
HPTP γ	Humano	R tipo ?	>610	2
RPTP γ	Humano	R tipo ?	>530	2
HPTP ζ	Humano	R tipo ?	>613	2
RPTP β	Humano	R tipo ?	>530	2
PTP 1 B	Humano	NR PTP	435	1
PTP 1	Rata	NR PTP	432	1
TC-PTP	Humano	NR PTP	415	1
Yop 2b	<i>Yersinia</i>	NR PTP	468	1
VH1	<i>Vaccinia virus</i>	NR PTP	171	1
cdc25	<i>S. pombe</i>	NR PTP	550	1

* Número de residuos de aminoácidos. R, receptor; NR, no receptores.

REFERENCIAS

Fauman E.B. y M.A. Saper (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochem. Sci.* **21**: 413-417.

Fischer E.H., H Charbonneau y N.K Tonks (1991) Protein tyrosine phosphatase: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**: 401-406.

Hernández-Sotomayor T. (1995) Transducción de señales y la fosforilación en residuos de tirosina. *Ciencia* **46**: 533-541.

Pluskey S., T.J. Wandless, C.T. Walsh y S.E. Shoelson (1995) Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **270**: 2897-2900.

Streuli M., N.X. Krueger, A.Y. Tsai y H. Saito (1989) Distinct functional roles of the intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LCA and LAR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8698-2407.

Walton K.M. y J.E. Dixon (1993) Protein tyrosine phosphatase. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 101-120.

CAPITULO 4

Fosforilación de proteínas en diversos residuos de aminoácidos en plantas

La supervivencia de los organismos superiores depende de su habilidad de coordinar complejos cambios durante su desarrollo y responder a diversos estímulos de su medio ambiente. Las plantas presentan ciertas desventajas con respecto a otros organismos, ya que estas son incapaces de escapar a situaciones ambientales desfavorables (Bowler y Chua, 1994). Sin embargo, se conoce que comparten ciertos mecanismos básicos de transducción de señales encontrados en células de mamíferos, como son el uso de segundos mensajeros y la fosforilación-desfosforilación de proteínas (Bowler y Chua, 1994). En la actualidad, existe un avance importante en la identificación, tanto por métodos bioquímicos, como de biología molecular, de la presencia de proteínas fosforiladas en plantas. Algunas de estas proteínas fosforiladas, son proteínas transmembranales o solubles que poseen actividad de cinasa, las cuales regulan diferentes procesos celulares; sin embargo, no se conoce la función de la mayoría de las proteínas identificadas en las plantas.

RECEPTORES EN PLANTAS

Recientemente se ha reportado la existencia de proteínas cinasas similares a los receptores de animales, denominados RLKs (proteínas cinasas similares a receptores) en plantas superiores. Los RLKs son proteínas membranales que presentan un dominio extracelular que varía en su composición química, un dominio transmembranal (con una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos) y una región intracelular con actividad de proteína cinasa capaz de fosforilar en residuos de serina o de treonina (Sussman, 1994; Walker, 1994; Braun y Walker, 1996). El dominio intracelular posee la capacidad de autofosforilarse en residuos de serina y de treonina (Figura 5). Se han reportado evidencias de que la autofosforilación de los RLKs ocurre a través de un mecanismo de transfosforilación (Braun y Walker, 1996).

Por el momento, el avance en la identificación de las proteínas involucradas en la transducción de señales de los RLK no ha sido muy estudiada. Sin embargo, entre los pocos avances que se tienen se encuentra la observación en *Arabidopsis thaliana* de que la proteína RLK5 interactúa con una proteína fosfatasa, designada KAPP (proteína fosfatasa asociada a cinasa), ocasionando la desfosforilación de dicho receptor. La KAPP posee una señal de anclaje en el extremo amino-terminal, una región de interacción para la región de cinasa del RLK5 denominada KI (dominio de interacción de cinasa) y una región catalítica de proteína fosfatasa tipo 2C (Stone *et al.*, 1994).

A la fecha, aún se desconoce en que procesos se encuentran involucrados la activación de este tipo de receptores; sin embargo, en *Brassica* spp., se ha observado

que tienen una función importante en procesos como la auto-incompatibilidad (Braun y Walker, 1996).

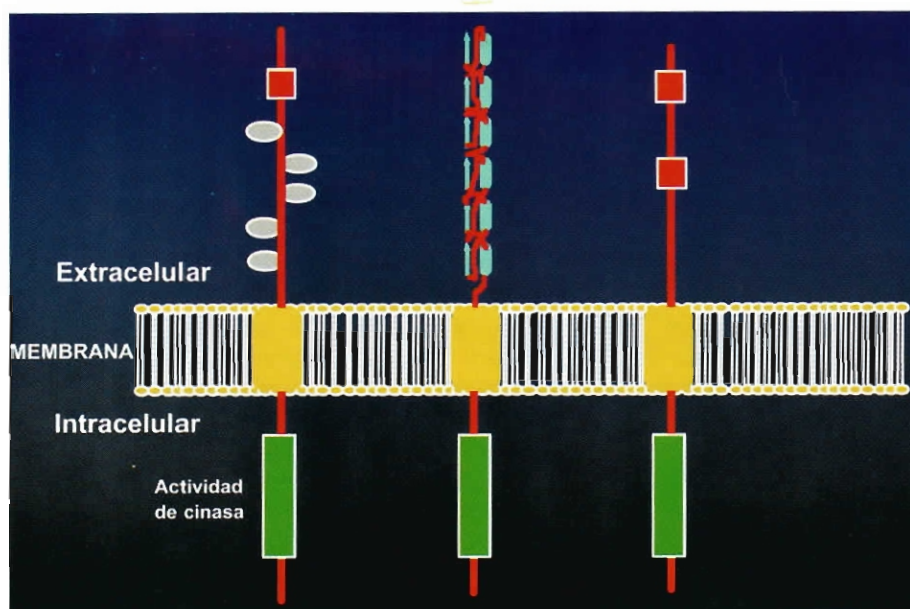


Figura 5. Representación de la estructura primaria de la proteína cinasa similar a los receptores (RLK). (■) región catalítica; (■) región transmembranal; (■) región rica en residuos de leucina; (■) región rica en residuos de cisteína; (■) región similar al factor de crecimiento epidérmico (Walker, 1994).

Por otra parte, se ha encontrado que el mecanismo que transduce la señal iniciada por etileno es a través de un receptor denominado ETR1 (resistente a etileno). Este receptor es semejante al sistema de dos componentes presente en organismos procarióticos. Estudios moleculares indican que el ETR1 posee en el extremo amino terminal un dominio sensorial con actividad de histidina cinasa unido a un dominio regulador de respuesta presente en el extremo carboxilo terminal (Zarembinski y Theologis, 1994; Woltering y de Vrije, 1995). Hasta ahora no se conoce el mecanismo de activación del receptor ETR1. Sin embargo, se piensa que al unirse el ligando al receptor ETR1, el receptor se activa por autofosforilación a través de un residuo de histidina que se encuentra en el dominio de histidina cinasa. Después, el fosfato unido al residuo de histidina, es transferido a un residuo de aspartato localizado en el dominio regulador de respuesta (Figura 6) (Chang, 1996).

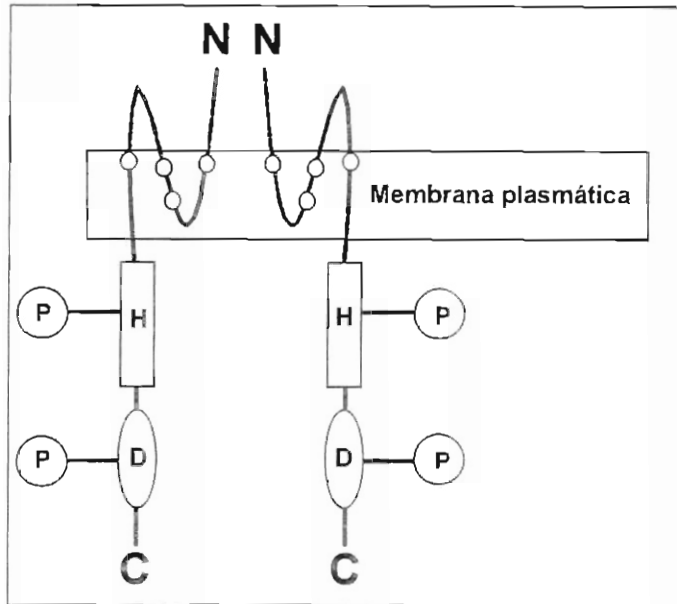


Figura 6. Posible representación de la estructura primaria del receptor para el etileno. (N) Región transmembranal con tres posibles dominios transmembranales seguida de una región citoplasmática compuesta de un (H) dominio sensorial con actividad de proteína histidina cinasa que contiene un residuo de histidina y un (D) dominio regulador con un residuo de aspartato (Chang, 1996).

Existen evidencias que indican que el receptor ETR1 no es la única proteína involucrada en el mecanismo de señalización del etileno. Recientemente, Hua *et al.* (1995), encontraron una proteína denominada ERS (sensor de respuesta a etileno) cuya composición de aminoácidos es similar a la secuencia de aminoácidos de ETR1. A su vez, estudios de mutación indican que la proteína ERS posiblemente actúa después de ETR1 o posiblemente junto con ETR1, sensando la señal dichas proteínas del etileno.

PROTEINA CINASAS CON DOMINIO SIMILAR A LA CALMODULINA

Se han caracterizado y clonado diversas proteínas cinasas en varias especies de plantas; entre ellas, las proteínas cinasas con dominio similar a la calmodulina (CDPK) (Bögre *et al.*, 1988; Verhey *et al.*, 1993; DasGupta, 1994; Breviario *et al.*, 1995; Lindzen y Choi, 1995). Las CDPKs poseen una estructura similar a las proteínas cinasas dependientes de calcio/calmodulina presentes en sistemas animales. Estas CDPKs tienen un dominio regulador capaz de unir calcio denominado CaM-LD (dominio similar a la calmodulina), un dominio catalítico y una secuencia situada en el

extremo amino terminal que varía en tamaño. Entre el dominio regulador y el dominio CaM-LD, se encuentra una secuencia compuesta de aproximadamente 31 aminoácidos denominada dominio de unión. Se ha observado que el dominio de unión tiene una función autoinhibitoria. En ausencia de calcio este dominio interactúa intramolecularmente con el dominio catalítico, causando cambios en la actividad catalítica de la enzima (Figura 7) (Huang *et al.*, 1996).

Estudios moleculares han demostrado que en las plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a condiciones de estrés hídrico y de salinidad se induce la expresión de CDPKs (Urao *et al.*, 1994). Asimismo, se han obtenido evidencias bioquímicas de la existencia de varias proteínas básicas, que transportan fosfolípidos en pétalos de *Petunia hybrida* (Neumann *et al.*, 1995) y en semillas de *Momordica charantia* (Chang *et al.*, 1995), que son fosforiladas por CDPKs, así como la fosforilación *in vitro*, en presencia de calcio, de proteínas membranales de 26, 50 y 83 kDa en *Cucurbita pepo* (Scherer *et al.*, 1993).

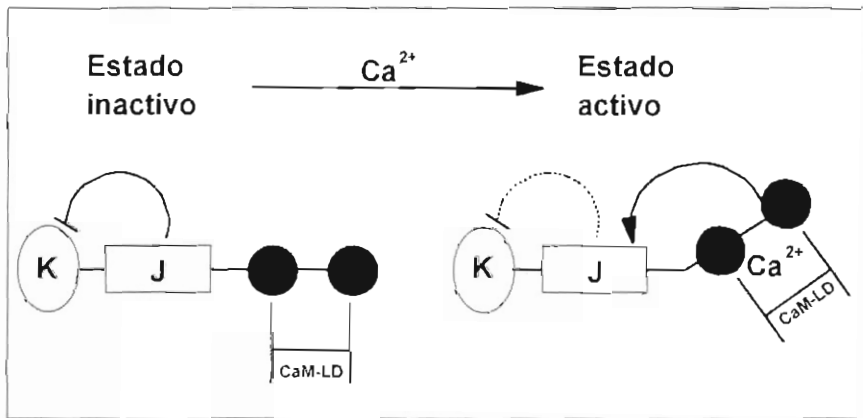


Figura 7. Representación de la estructura primaria y modelo de activación de una CDPK. K, dominio catalítico; J, dominio de unión; CaM-LD, dominio regulador; A, región autoinhibidora. En ausencia de calcio, el dominio K es inactivado por la interacción con la región autoinhibidora. En presencia de calcio, la región autoinhibidora se disocia del dominio K, haciendo posiblemente la interacción entre el dominio K y el dominio CaM-LD (Huang *et al.*, 1996).

FOSFORILACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD ENZIMATICA

En plantas existen evidencias que indican la presencia de proteínas cuya actividad catalítica está regulada por fosforilación. Entre estas proteínas se encuentran la nitrato reductasa y la sacarosa fosfato sintasa (Huber y Huber, 1992; Huber *et al.*, 1994; Kaiser y Huber, 1994). La nitrato reductasa, es la enzima que reduce al nitrato a nitrito. Esta enzima posee la característica de que su actividad es regulada por fosforilación en residuos de serina. Huber *et al.* (1992) observaron, en hojas de *Spinacia oleracea*, que la fosforilación *in vivo* de la nitrato reductasa en residuos de serina modifica su actividad catalítica en presencia de luz y oscuridad. La sacarosa fosfato sintasa, es una enzima que tiene una función importante en la síntesis de sacarosa. Igualmente se ha observado que la sacarosa fosfato sintasa tiene la característica de fosforilarse en residuos de serina dependiendo de la intensidad luz. En 1995, Weiner determinó que la fosforilación del residuo de serina 158 de la sacarosa fosfato sintasa modifica su actividad catalítica. En presencia de luz, la sacarosa fosfato sintasa es desfosforilada por proteína fosfatasas (enzima activada), mientras que en la oscuridad, es fosforilada por proteína cinasas (enzima inactivada) (McMichael *et al.*, 1995).

Existen otras enzimas en plantas cuya actividad catalítica no es regulada por fosforilación; sin embargo, poseen la característica de fosforilar a otras proteínas que son sustratos de ellas. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se ha determinado mediante técnicas de clonación, la presencia de la subunidad β regulatoria y de la subunidad α catalítica, de la caseína cinasa tipo II (Collinge y Walker, 1994; Klimczak *et al.*, 1995). En *Solanum tuberosum*, se ha demostrado la presencia de actividad de proteína cinasa C, la cual se activa en presencia de un inductor fúngico (Subramaniam *et al.*, 1997). También se ha demostrado la presencia de una proteína cinasa de 45 kDa que se activa por estrés hídrico en raíces primarias de plántulas de *Zea mays* (Conley *et al.*, 1997).

FOSFORILACION DE OTRAS PROTEINAS

En relación a las funciones regulatorias, se ha observado en células de jitomate, que tanto el etileno como los inductores fúngicos, provocan la fosforilación *in vivo* de proteínas (Raz y Fluhr, 1993; Felix *et al.*, 1991). Asimismo, se ha demostrado la fosforilación de una proteína de 34 kDa en células de papa como respuesta al ácido oligogalacturónico (OGA) (Jacinto *et al.*, 1993). También se ha estudiado la influencia de la fosforilación sobre la producción de radicales libres (peróxidos y oxígeno molecular) en respuesta a OGA en células de soya (Chandra y Low, 1995), con la finalidad de asociar la fosforilación con los mecanismos de defensa contra patógenos de las plantas. Por otra parte, se ha reportado la fosforilación de proteínas membranales mediada por la activación de proteínas G en plántulas de *Avena sativa* tratadas con luz roja (Romero *et al.*, 1991), la fosforilación diferencial de proteínas según el estado de desarrollo de *Sequoia sempervirens* (Jung-Lieh *et al.*, 1995), la inducción de fosfoproteínas por la presencia de lípidos (Wissing y Behrbohm, 1993),

cambios en la concentración de protones, potencial redox y poliaminas (Gilroy y Trewavas, 1994).

REFERENCIAS

- Bögre L., Z. Olah y D. Dudits** (1988) Ca²⁺-dependent protein kinase from alfalfa (*Medicago varia*): partial purification and autophosphorylation. *Plant Science* **58**: 135-144.
- Bowler C. y N.-H. Chua** (1994) Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* **6**:1529-1541.
- Braun D.M. y J. Walker** (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends in Biochem. Sci.* **21**: 70-73.
- Breviaro D., L. Morello y S. Giani** (1995) Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* **27**: 953-967.
- Chang A., G.M. Neumann y G.M. Polya** (1995) Resolution of three Ca²⁺-dependent protein kinases and endogenous protein from bitter melon seeds. *Plant Science* **105**: 31-44.
- Chang C.** (1996). The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm?. *Trends in Biochem. Sci.* **21**: 129-133.
- Chandra S. y P.S. Low** (1995) Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4120-4123.
- Collinge M.A. y J.C. Walker** (1994) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* casein kinases II β subunit by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* **25**: 649-658.
- Conley T.R., R.E. Sharp y J.C. Walker** (1997) Water deficit rapidly stimulates the activity of a protein kinase in the elongation zone of maize primary root. *Plant Physiol.* **113**: 219-226.
- DasGupta M.** (1994) Characterization of a calcium-dependent protein kinase from *Arachis hypogea* (groundnut) seeds. *Plant Physiol.* **104**: 961-969.
- Felix G., D.G. Grosskopf, M. Regenass y T. Boller** (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8831-8834.
- Gilroy S. y T. Trewavas** (1994) A decade of plant signals. *BioEssays* **16**: 677-682.
- Hua J., C. Chang, Q. Sun y E.M. Meyerowitz** (1995). Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* **269**: 1712-1714.
- Huang J.-F., L. Teyton y J.F. Harper** (1996) Activation of Ca²⁺-dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. *Biochemistry* **35**: 13222-13230.
- Huber S.C. y J.L. Huber** (1992) Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* **99**: 1275-1278.

Huber J.L., S.C. Huber, W.H. Campbell y M.G. Redinbaugh (1992) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archiv. of Biochem. and Biophys.* **296**: 58-65.

Huber S.C., J.L. Huber y W.M. Kaiser (1994) Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, *in vitro and in situ*. *Physiol. Plant.* **92**: 302-310.

Jacinto T., E.E. Farmer y C.A. Ryan (1993) Purification of potato leaf plasma membrane protein pp³⁴, a protein phosphorylated in response to oligogalacturonide signal for defense and development. *Plant Physiol.* **103**: 1393-1397.

Jung-Lieh K., H. Hao-Jen, C. Li-Jing, H. Bau-Lian, H. Li-Chun y K. Tsong-Teh (1995) Rejuvenation *in vitro*: modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. *J. Plant Physiol.* **146**: 333-336.

Kaiser W.M. y S.C. Huber (1994) Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* **106**: 817-821.

Klimczack L.J., M.A. Collinge, D. Farini, G.Guiliano, J.C. Walker y A.R. Cashmore (1995) Reconstitution of *Arabidopsis* casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* **7**: 105-115.

Lindzen E. y J.H. Choi (1995) A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* **28**: 785-797.

McMichael R.W., M. Bachmann y S. Huber (1995) Spinach leaf sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinases. *In vitro Plant Physiol.* **108**: 1077-1082.

Neumann G.M., R. Condron, I. Thomas y G.M. Polya (1995) Purification characterization and sequencing of a family of *Petunia* petal lipid transfer proteins phosphorylated by plant calcium-dependent protein kinase. *Plant Science*, **107**: 129-145.

Raz V. y R. Fluhr (1993) Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* **5**: 523-530.

Romero L.C., B. Biswal y S. Pill-Soon (1991) Protein phosphorylation in isolated nuclei from etiolated *Avena* seedlings: effects of red/far-red light and cholera toxin. *FEBS Lett.* **282**: 247-350.

Scherer G.F.E., D. Hecker y J. Muller (1993) Ca²⁺ ions and lysophospholipids activate phosphorylation of different proteins in plasma membranes and tonoplasts. *J. Plant Physiol.* **142**: 425-431.

Stone J.M., M.A. Collinge, R.D. Smith, M.A. Horn y J.C. Walker (1994) Interaction of protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. *Science* **3**: 1-3.

Subramaniam R., C. Després y N. Brisson (1997) A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response. *Plant Cell* **9**: 653-664.

Sussman M.R. (1994) Molecular analysis of proteins in the plants plasma membrane. *Annual Rev. Plant Mol. Biol.* **45**: 211-234.

Urao T., T. Katagiri, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida y K. Shinozaki (1994) Two genes that encode Ca^{2+} -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 331-340.

Verhey S., J.C. Gaiser y T.L. Lomax (1993) Protein kinases in zucchini: characterization of calcium-requiring plasma membrane kinases. *Plant Physiol.* **103**: 413-419.

Walker J.C. (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1599-1609.

Weiner H. (1995) Antibodies that distinguish between the serine-158 phospho-and dephospho-form of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol.* **108**: 219-225.

Wissing J.B. y H. Behrbohm (1993) Phosphatidate kinase, a novel enzyme in phospholipid metabolism. *Plant Physiol.* **102**: 1243-1249.

Woltering E.J. y T. de Vrije (1995) Ethylene: a tiny molecule with great potential. *BioEssays* **17**: 287-290.

Zarembinski T.I. y A. Theologis (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1579-1597.

CAPITULO 5

Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en plantas

Durante los últimos 10 años han sido publicados algunos reportes sobre detección de fosforilación en tirosina en varias especies de plantas. Torruella *et al.*, (1986), utilizando plántulas de chícharo, detectaron dos proteínas, una de 92 y otra de 57 kDa que se fosforilan en residuos de tirosina. Asimismo, observaron que al incubar las proteínas solubles e insolubles con sustratos artificiales, que poseen un sitio de fosforilación en tirosina, tales sustratos se fosforilaban. Por otra parte, en la misma especie, Håkansson y Allen (1996), reportaron la fosforilación en residuos de tirosina de tres proteínas insolubles de mitocondria con pesos moleculares de 28, 27 y 12 kDa. Estos autores determinaron que la fosforilación de estas proteínas fue resistente a la hidrólisis alcalina, lo que sugiere la presencia de la fosforilación en residuos de tirosina. Esto se debe a que el enlace éster entre el fosfato y el aminoácido de tirosina es muy estable a pH mayor de 7, a diferencia del enlace éster entre el fosfato y los residuos de serina y treonina, que son más sensible a pH básico. Además, su fosforilación se inhibió en presencia de genisteína, un inhibidor específico de PTK.

Recientemente Trojanek *et al.* (1996), utilizando la fracción soluble de plántulas de *Zea mays*, identificaron y purificaron parcialmente una fracción proteica con actividad de PTK. También determinaron que las proteínas que se fosforilaban en residuos de tirosina tienen pesos moleculares entre 40 y 65 kDa.

Existen evidencias en hipocótilos de *Cucurbita pepo*, que sugieren que el transporte de las auxinas está regulado por proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina (Bernasconi, 1996).

Estudios moleculares han permitido la identificación y caracterización de una proteína denominada APK1 en *Arabidopsis thaliana*, la cual se fosforila en residuos de tirosina (Hirayama y Oka, 1992), así como también, la detección de una hsc70 (proteína de choque térmico 70) en *Oryza sativa*, que se desfosforila en residuos de tirosina en respuesta a la presencia de cadmio (Narender y Prasad, 1995).

En las plantas, diversos estudios bioquímicos y moleculares han detectado la presencia de MAP cinasas (proteína cinasa activada por mitógenos) (Duerr *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994; Suzuki y Shinshi, 1995; Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995; Mizoguchi *et al.*, 1997). Las MAP cinasas son una familia de enzimas con pesos moleculares entre 40 y 47 kDa, que requieren para su actividad fosforilarse en residuos de treonina y tirosina (Mizoguchi *et al.*, 1994, Seger y Krebs, 1995). Se ha propuesto que las MAP cinasas de plantas participan en los procesos de diferenciación y desarrollo celular. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que las MAP cinasas pudiera ser mediadoras de la respuesta a estímulos como cambios de temperatura, herida, inductores fúngicos y fitohormonas (Mizoguchi *et al.*, 1994; Suzuki y Shinshi, 1995; Hirt, 1997).

Hasta el momento existen pocos trabajos que indican la presencia de proteínas con actividad de PTP en plantas. Por ejemplo, se ha reportado la purificación de una enzima de 90 kDa presente en núcleos de *Pisum sativum* con actividad de PTP (Guo y

Roux, 1994). Gellatly *et al.*, (1994) purificaron y caracterizaron una proteína homodimérica con un peso molecular de 100 kDa, que tiene actividad de PTP. Por otra parte, en *Nicotiana tabacum*, se ha detectado la desfosforilación y activación de la proteína p34^{cdc2} causada por la presencia de citocinina (Zhang *et al.*, 1996).

REFERENCIAS

- Bernasconi P.** (1996) Effect of synthetic and natural protein tyrosine kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini (*Cucurbita pepo*) hypocotyls. *Physiol Plant* **96**: 205-210.
- Decroocq-Ferrant V., S. Decroocq, J. Van, E. Schmidt y M. Kreis** (1995) A homologue of MAP/ERK family kinase genes is expressed in vegetative and female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* **27**: 339-350.
- Duerr B., M. Gawienowski, T. Ropp y T. Jacobs** (1993) MsERK1: A mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* **5**: 87-96.
- Gellatly K.S., G.B.G. Moorhead, S.M.G. Duff, D.D. Lefebvre y W.C. Plaxton** (1994) Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. *Plant Physiol.* **106**: 223-232.
- Guo Y.L. y S.J. Roux** (1994) Characterization of two protein phosphatases from pea nuclei. *Plant Physiol.* **107**: 167-175.
- Håkansson G. y J.F. Allen** (1995) Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signalling. *FEBS Lett.* **372**: 238-242.
- Hirayama T. y A. Oka** (1992) Novel protein kinase of *Arabidopsis thaliana* (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine and threonine. *Plant Mol. Biol.* **20**: 653-662.
- Hirt H.** (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Sci.* **2**: 11-15.
- Mizoguchi T., Y. Gotoh, E. Nishida, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida, T. Iwasaki, H. Kamada y K. Shinozaki** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* **5**: 111-122.
- Mizoguchi T., K. Ichimura y K. Shinozaki** (1997). Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Biotech.* **15**: 15-19.
- Narender G. y M.N.V. Prasad** (1995) Cadmium-induced protein phosphorylation changes in rice (*Orzya sativa* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* **145**: 67-70.
- Seeger R. y E. Krebs** (1995) The MAPK signaling cascade. *The FASEB J.* **9**: 726-735.
- Suzuki R. y H. Shinshi** (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* **7**: 639-647.
- Torruella M., L.M. Casano y R.H. Vallejos** (1986) Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and the presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets. *J. Biol. Chem.* **261**: 6651-6653.

Trojanek J., P. Ek, J. Scoble, G. Muszynska y L. Engström (1996). Phosphorylation of plant and identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedling. *Eur. J. Biochem.* **235**: 338-344.

Zhang K., D.S. Letham y P.C.L. John (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta* **200**: 2-12.

CAPITULO 6

Modelo de estudio: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

C. roseus es una planta perenne, originaria de Madagascar, perteneciente a la familia Apocynaceae. La distribución actual de esta planta es pantropical, y se le utiliza como planta de ornato por presentar, durante la mayor parte del año, flores muy vistosas de color rosa, malva o blanca con un ojo central carmín según sea la variedad de que se trate. Debido a su amplia distribución, esta planta recibe varios nombres comunes: maravilla, teresita, vicaria, perivinca y otros (Figura 8 A) (Romero, 1984; Stearn, 1975; Svoboda y Blake, 1975).

Esta planta ha sido usada en medicina tradicional como agente hipoglucémico, para el tratamiento de hemorragias, escorbuto, dolor de muelas, como agente abortivo, como antibiótico, purgativo, etc. Si bien el interés científico inicial se debió a las propiedades hipoglucémicas de esta planta, en la actualidad ésta se debe a que es una fuente de agentes quimioterapéuticos con actividad anticancerígena (Svoboda y Blake, 1975; Flores y Medina-Bolívar, 1995). Por todo esto, *C. roseus* se ha convertido en uno de los modelos más utilizados para el estudio del metabolismo secundario. De esta planta se han logrado aislar más de 200 alcaloides, entre los cuales se encuentran compuestos con propiedades que permiten su uso contra la hipertensión, las enfermedades que obstruyen el sistema circulatorio y el cáncer (Blom *et al.*, 1991; Flores y Medina-Bolívar, 1995).

Debido a la importancia farmacológica de los alcaloides indólicos, se han seleccionado plantas que tienen una alta capacidad de acumular alcaloides y se ha tratado de obtener a partir de ellas plantas elite mediante la realización de cruza. Sin embargo, a semejanza de otras especies en la que se ha intentado obtener híbridos altamente productivos, todos los intentos han fracasado: los niveles de producción de alcaloides indólicos en los híbridos son iguales a la de las plantas madre, e incluso, en algunos casos menores a la de las plantas madre (Singh *et al.*, 1992).

Como en la planta los niveles de acumulación de los alcaloides con propiedades terapéuticas son muy bajos, los estudios se han enfocado en obtener sistemas que permitan una mayor producción de dichos compuestos. Debido a que la producción en la planta se ve afectada por factores como condiciones ambientales y la presencia de plagas, se ha optado por explorar la capacidad biosintética de cultivos *in vitro* derivados de la planta. Así, en las últimas dos décadas se ha reportado el establecimiento de varios tipos de cultivos celulares, de tejidos y de órganos y se ha verificado su potencialidad mediante el aislamiento de los alcaloides que acumulan (Van der Heijden *et al.*, 1989).

Si bien en los cultivos *in vitro* de células transformadas con *Agrobacterium* spp., tampoco se ha obtenido éxito en la producción de los alcaloides bisindólicos, éstos presentan ciertas ventajas con respecto al cultivo de plantas. Una de estas ventajas es la de ser estables genéticamente y de no requerir el uso de fito-hormonas exógenas. El punto más importante radica en que se puede obtener una mayor cantidad de biomasa en menor tiempo, por lo que la productividad aumenta significativamente. Por

otra parte, el control de las condiciones ambientales permite que la producción sea constante y en algunos casos puede llegar a inducirse una mayor acumulación del compuesto al encontrado en la planta. El único inconveniente del empleo de los cultivos *in vitro* es el hecho de que hasta ahora no se ha reportado en ninguno de ellos la presencia de vincristina, uno de los alcaloides de mayor interés comercial (Figura 8 B y C).



Figura 8. Modelo de estudio. A) Planta de *Catharanthus roseus*. Raíces transformadas de *C. roseus*; B) Vista frontal de las raíces transformadas; C) Vista lateral de las raíces. Note el geotropismo negativo de las raíces y la gran cantidad de ramificaciones semejantes a pelos, hecho por el que se les ha denominado raíces peludas.

El cultivo de raíces transformadas de *C. roseus* produce una amplia variedad de alcaloides indólicos. Así mismo, Toivonen *et al.*, (1989) reportan la identificación de la O-acetilvallesamina, un alcaloide que no había sido observado previamente en *C. roseus*. Entre los alcaloides determinados en los cultivos de raíces transformadas se encuentran la yohimbina, la ajmalicina, la vindolina y la catarantina (Toivonen *et al.*, 1989). Por otro lado, Parr *et al.*, (1988) pudieron detectar en cultivos de raíces transformadas de *C. roseus*, una gran cantidad y variedad de alcaloides, siendo, la ajmalicina, la serpentina, la catarantina y la vindolina los componentes mayores, y la vinblastina en menor cantidad. Ciau-Uitz *et al.* (1994), encontraron que los cultivos de las raíces transformadas de *C. roseus* producen una mayor cantidad de alcaloides

indólicos que los cultivos no transformados de la misma especie. Igualmente encontraron que los cultivos transformados poseen un contenido de alcaloides más estable que los cultivos no transformados. Entre los alcaloides encontrados en los cultivos de las raíces transformadas de *C. roseus*, se encuentran la ajmalicina, la serpentina y la catarantina.

La obtención de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos de plantas se ha visto detenida por una falta de conocimiento de los mecanismos de control de las actividades enzimáticas involucradas. Sin embargo, en las raíces transformadas de *C. roseus* hay evidencias que sugieren la presencia de actividades enzimáticas cuya función es la transmisión de la señal que podría estar involucrada en la producción de alcaloides. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado la presencia de actividad de fosfolipasa C en las raíces transformadas de *C. roseus* (De los Santos-Briones *et al.*, 1997). Se ha visto que al añadir inductores fúngicos la actividad de la fosfolipasa C está correlacionada con el aumento en la producción de alcaloides (Moreno *et al.*, sometido). Por otra parte, se ha observado que los extractos celulares de raíces transformadas, existen varias proteínas que son modificadas covalentemente por la toxina del cólera (ADP-ribosiladas). Así como se puede observar que algunas proteínas con pesos moleculares similares son capaces de unir GTP marcado, lo cual sugiere la presencia de proteínas G en las membranas celulares de las raíces transformadas (Suárez-Solis *et al.*, sometido). Estas evidencias sugieren que en nuestro modelo de estudio, posiblemente existen mecanismos de transmisión de señales similares a los conocidos en células de animales, que de alguna manera están regulando algunos de los procesos metabólicos en las raíces transformadas de *C. roseus*. Además de las evidencias ya observadas en nuestro grupo, también queda la posibilidad de la presencia de otras proteínas con actividades similares a las observadas en otros organismos, las cuales pueden estar involucradas indirectamente en la biosíntesis de los metabolitos secundarios.

Hasta ahora, no se conocen con exactitud todos los mecanismos de regulación en las raíces transformadas de *C. roseus*, sin embargo existen evidencias que indican que la fosforilación de proteínas se encuentra ampliamente distribuida en todos los organismos, lo cual sugiere que las raíces transformadas la tengan como un mecanismo de regulación. Es por esto que el estudio de la transducción de señales, reguladas por fosforilación y desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina, podría ayudar a comprender el mecanismo de regulación de varias proteínas involucradas en la biosíntesis de los alcaloides indólicos.

REFERENCIAS

- Blom T.J.M., M. Sierra, T.B. Van Vliet, M.E.I. Franke-Dijk, P. De Koning, F. van Iren, R. Verpoorte y K.R. Libbenga** (1991) Uptake and accumulation of ajmalice into isolated vacuoles of culture cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and its conversion into serpentine. *Planta* **183**: 70-177.
- Ciau-Uitz R., M.L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chi, L.M. Pacheco y V.M. Loyola-Vargas** (1994) Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30**: 84-88.
- De Los Santos-Briones C., J. A. Muñoz-Sánchez, J. Chí-Vera, V.M. Loyola-Vargas y S.M.T. Hernández-Sotomayor** (1997) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-phospholipase C activity during the growing of *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.* **150**: 707-713.
- Flores H.E y F. Medina-Bolivar** (1995) Root culture and plant natural products: "unearthing" the hidden half of plant metabolism. *Plant Tiss. Cult. and Biotech* **1**: 59-74.
- Moreno-Valenzuela O., M. Monforte-González, J.A. Muñoz-Sánchez, M. Méndez-Zeel, V.M. Loyola-Vargas y S.M.T. Hernández-Sotomayor** (1997) Role of phospholipase C in the regulation of secondary metabolism in response to elicitors in *Catharanthus roseus* hairy roots. Sometido.
- Parr A.J., A.C.J. Peerless, J.D. Hamill, N.J. Walton, R.J. Robins y M.J.C. Rhodes** (1988) Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **7**: 309-312.
- Romero P.** (1984) Biosíntesis y farmacología de los alcaloides de *Catharanthus roseus* derivados del indol. Monografía. UNAM. México.
- Singh B.M., S.K. Pareek, S. Mandal, M.L. Maheshwari y R. Gupta** (1992) variability in periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Indian J. of Agricultural Sci.* **62**: 47-50.
- Stearn W.T.** (1975) A synopsis of genus *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) in: Taylor W.I and N.R Farnsworth (eds.): *The Catharanthus alkaloids*: 9-44. Marcel Dekker Inc. New York.
- Suárez-Solis V.M., M.R. Carrillo-Pech, J. A. Muñoz-Sánchez, R. Coria-Ortega y S.M.T. Hernández-Sotomayor** (1997) Presence of nucleotide-binding proteins in *Catharanthus roseus* transformed roots. Sometido.
- Svoboda G.H. y D.A. Blake** (1975) The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. in: Taylor W.I and N.R Farnsworth (eds.): *the Catharanthus alkaloids*. *J. Pharmaceut. Sci.* **51**: 518-523.
- Toivonen L., Balsevich y W.G.W. Kurz** (1989) Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 79-93.
- Van der Heijden R., R. Verpoorte, A.J.G. Barnes y A.T. Oliver** (1989) Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 231-280.

CAPITULO 7

Evidence of protein-tyrosine kinase activity in *Catharanthus roseus* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*

Luis Carlos Rodríguez-Zapata and S. M. Teresa Hernández-Sotomayor
Nota: este artículo fue publicado en la revista Planta (1998) 204: 70-77

ABSTRACT

Homogenate fractions (soluble and particulate) from *Catharanthus roseus* (L) G. Don transformed roots showed several phosphorylated proteins when incubated with [³²P]γ-ATP. The phosphorylation in the proteins 55, 40, 25, 18 and 10 kDa in the particulate fraction and 63 kDa in the soluble fraction were resistant to alkali treatment. Several proteins in both fractions give a positive signal with monoclonal antiphosphotyrosine antibodies. *In situ* phosphorylation in both fractions showed several proteins that cross-react with the antiphosphotyrosine antibodies. Tyrosine kinase activity was detected using an exogenous substrate RR-SRC. This activity was inhibited by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. These results suggest, for the first time, the presence of tyrosine kinase activity in plant transformed tissues.

INTRODUCTION

Phosphorylation and dephosphorylation of proteins is the most important mechanism regulating cellular function in eukaryotic cells and integrating multicellular systems. A number of protein kinases and phosphatases have been identified and characterized in higher plants and several plant proteins have been found to be regulated by reversible phosphorylation. Most of the phosphorylation that occurs in both animal and plant cells occurs on serine or threonine residues and in a smaller proportion on tyrosine residues (less than 0.1% of total phosphorylations).

Phosphotyrosine is a minor component of animal cells, but cells stimulated to divide by certain factors may contain 5- to 10-fold more phosphotyrosine than that of the resting cells (Hernández-Sotomayor and Carpenter 1992). The first protein tyrosine kinase was discovered in 1979. The field of tyrosine phosphorylation since then has grown explosively, particularly for animal cells. The importance of protein tyrosine phosphorylation in controlling such fundamental cellular processes as growth and differentiation is now well established. It has been suggested that tyrosine phosphorylation plays a key role in the regulation of cellular processes such as proliferation, differentiation and, oncogenic transformation (Uchida et al. 1994). To date, however, the evidence for tyrosine phosphorylation in plant proteins is limited. Nevertheless, tyrosine protein phosphorylation and tyrosine kinase activity have already been reported in a few plant species. In pea (Torruella et al. 1986; Håkansson and Allen 1995) and in maize (Trojanek et al. 1996), tyrosine phosphorylation has been reported for proteins of unknown roles. A recombinant mitogen-activated protein kinase, (MAP) kinase of alfalfa, when overexpressed in *Escherichia coli* was recognized

by antiphosphotyrosine antibodies (Duerr et al. 1993). Suzuki and Shinshi (1995) using immunoblot and immunoprecipitation analyses with a phosphotyrosine-specific antibody, showed tyrosine phosphorylation of a protein that was induced in tobacco cells treated with elicitors. According to the authors, this protein resembles a MAP kinase. A unique characteristic of MAP kinases is that their activities are regulated by the simultaneous phosphorylation of tyrosine and threonine residues in a conserved sequence by upstream protein kinases (Payne et al. 1991; Gartner et al. 1992; Posada and Cooper 1992). This conserved sequence has been found in all the amino acid sequences deduced from cDNA clones for MAP kinases in plants (Hirayama and Oka 1992; Duerr et al. 1993; Mizoguchi et al. 1993, 1994; Jonak et al. 1993, 1995; Decroocq-Ferrant et al. 1995).

In zucchini (Bernasconi 1996), it has been suggested that the naphthylphthalamic acid binding protein may be related to mammalian tyrosine kinases. Zhang et al. (1996) also demonstrated that in excised pith parenchyma from *Nicotiana tabacum* cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase.

Also, the presence of phosphotyrosine protein phosphatases, have been reported in wheat seedlings (Cheng and Tao 1989), maize seedlings (Jagiello et al. 1992), potato tuber (Gellatly et al. 1994) and pea nuclei (Guo and Roux 1995). Recently, in barley aleurone protoplasts, Knetsch et al. (1996) reported that abscisic acid activates a MAP kinase via a tyrosine phosphatase.

The limited knowledge of tyrosine phosphorylation in plants, and the lack of understanding in regard to the function of these phosphorylations prompted us to look for protein-tyrosine kinase activity in *C. roseus* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. In the past few years the culture of transformed roots has emerged as an alternative to obtain different natural products, such as antineoplastic alkaloids. This is due to the fact that hairy root cultures present several important characteristics like fast growth and, high degree of genetic and biochemical stability. We are using *C. roseus* transformed roots as a model to study signal transduction pathways in plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Hairy root line J1 of *C. roseus* was obtained by infection of leaves with *Agrobacterium rhizogenes* (Ciau-Uitz et al. 1994) and maintained in B₅ medium (Gamborg et al. 1968) (1.54 g.l⁻¹; Sigma), supplemented with 30 g.l⁻¹ sucrose. pH was adjusted to 5.7 with 0.1 M KOH/HCl prior to autoclaving of the medium. One hundred milliliters of medium were placed in a 250 ml Erlenmeyer flask and autoclaved for 20 min at 15 psi. Flasks were inoculated with 0.5 g (fresh mass) of hairy roots.

Preparation of tissue and cell extracts. Roots were quickly frozen with liquid nitrogen and homogenized with a polytron in buffer A (1 g of tissue in 2.5 ml; 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris.HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 10 % glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.2 mM sodium orthovanadate). Extracts were passed through gauze, and tissue debris was removed by centrifugation at 1000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was further centrifuged at 100 000 g for 45 min. The supernatants (protein: 4.0 mg.ml⁻¹) were recovered as the

soluble fraction. The pellet was resuspended in the same buffer A (protein: 2.5 mg.ml⁻¹), and was used as a crude membrane fraction. All steps during the extraction were performed at 4 °C. The cell extracts were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -75 °C. Protein concentrations of samples were measured by bicinchoninic acid (Smith et al. 1985) protein assay reagent using bovine serum albumin as standard.

In vitro phosphorylation assay. Aliquots of particulate and soluble fractions were incubated at 30°C with phosphorylation buffer containing 20 mM Hepes pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM sodium orthovanadate, 50 μM [³²P]γ-ATP (10 μCi.nmol⁻¹). After 15 minutes, the reaction was stopped with Laemmli buffer (Laemmli 1970) and heated at 80°C for 5 min. Phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE using 7.5% and 10% acrylamide gels for particulate and soluble proteins respectively and electroblotted onto nylon membranes for 5 hrs at 50V. Phosphoprotein bands were visualized by autoradiography. For alkali treatment nylon membranes were treated with 1 M KOH at 55°C for 1 h, washed once with TN buffer (10 mM Tris pH 7.4 and 0.15 mM NaCl), once with 1 M Tris pH 7.0, and twice with deionized water. Membranes were dried and visualized by autoradiography. In some experiments, proteins were separated in SDS-PAGE and stained with silver nitrate solution (Bloom et al. 1987).

Immunoblot analysis. *In vitro* phosphorylation was done as described above but in the absence of [³²P]γ-ATP. Proteins were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitroplus transfer membrane for 5 hrs at 50V. Filters were probed with recombinant antiphosphotyrosine antibodies RC20H and visualized by ECL chemiluminescence.

In situ phosphorylation assay. *In situ* phosphorylation on nitroplus transfer membranes was carried out as described by Verhey et al. (1993), with the following modifications: particulate and soluble proteins were separated on SDS-PAGE, and electroblotted as previously described, after blocking, renaturation was carried out at 4°C overnight in 20 mM Hepes pH 6.8, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 250 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20 and 0.25 % (w/v) non-fat dry milk. Phosphorylation was carried out in 20 mM Hepes pH 6.8, 0.1 mM sodium orthovanadate, 50 μM ATP, 10 mM MgCl₂ and 0.25 % (w/v) non-fat dry milk. Filters were incubated for 60 min at room temperature. After incubation, the membranes were washed and probed with recombinant antiphosphotyrosine antibodies RC20H and visualized by chemiluminescence.

Protein tyrosine kinase assay. Membrane and cytosolic proteins were incubated with buffer contained 30 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 20 μM EDTA, 0.1 mM DTT, 25 μg.ml⁻¹ BSA, 0.15 % Nonidet P-40 (v/v), 70 μM sodium orthovanadate, 60 μM [³²P]γ-ATP (1 μCi) and 0.5 mM RR-SRC in presence or absence of 100 μM genistein, at 30°C for 30 min. The reaction was stopped by precipitation with cold solution of 10% TCA for 10 min. The mixture was centrifuged at 14 000 g for 10 min, then 20 μl of supernatant were removed and spotted onto separate phosphocellulose discs. When spotting was complete, the entire sheet was washed with 1% acetic acid and deionized water and

the radioactivity remaining on the filters was determined by liquid scintillation cocktail Aquasol.

A431 cell line. The human epidermoid carcinoma cell line A431 that overexpresses EGF-receptor was used as a positive control for most of the experiments. A431 cells were treated with EGF and extracted with Triton X-100 as described previously (Hernández-Sotomayor et al. 1991). A431 cells were kindly provided by Dr. Graham Carpenter at Vanderbilt University.

Materials. [γ - 32 P] ATP and Aquasol were obtained from Du Pont-New England Nuclear (Boston, Mass., USA). BCA protein assay reagent was supplied by Pierce Chemical Co (Rockford, Ill., USA). Monoclonal phosphotyrosine antibody (RC20H) was purchased from Transduction Labs (Lexington, Kent., USA). ECL chemiluminescence kit was obtained from Amersham (Buckinghamshire, UK). Nylon membranes and Tyrosine kinase assay kit were supplied by Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Nitro plus transfer membranes were obtained from Micron Separations Inc (Pittsburgh, PA., USA). Other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, Mis., USA).

RESULTS

In vitro phosphorylation and alkali treatment. The general pattern of total proteins of particulate and soluble fractions along the culture cycle of *C. roseus* transformed roots was obtained and resolved in SDS-PAGE and stained with silver nitrate solution. Differences in the particulate and soluble proteins are shown in *fig. 1 A* and *B*, respectively. We wanted to confirm that there were not dramatic changes along the different days of culture. After these analyses we decided to use the fifth day of culture for further studies because this is the day where the growing phase starts. Aliquots of particulate and soluble fractions from the fifth day of culture were incubated with [32 P] γ -ATP. Phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE using 7.5% and 10% acrylamide gels for particulate and soluble proteins respectively and electroblotted onto nylon membranes. Phosphoprotein bands were visualized by autoradiography.

This *in vitro* phosphorylation assay detected at least 6 heavily labeled phosphoproteins in the particulate fraction (*fig. 2 A*, lane 1) and 10 in the soluble fraction (*fig. 2 B*, lane 1). The electrophoretic pattern of phosphoproteins before and after alkali treatment was compared (*fig. 2 A, B*). Proteins in the particulate fraction showed several proteins in the range of 10-55 kDa that remained phosphorylated (*fig. 2 A*, lane 2). The most heavily labeled bands representing proteins were the 10 and 18 kDa. Proteins of 25, 40 and 55 kDa were also resistant to alkali treatment. Alkali treatment of the phosphoproteins from the soluble fraction showed an intense band of 63 kDa (*fig. 2 B*, lane 2). Taking into account that phosphate ester linkages to tyrosine are stable at high pH, the pattern of labeled products after alkali treatment should show a relative enhancement of phosphates linked to this amino acid. Therefore, we observed in particulate and soluble fractions the presence of many labeled phosphoproteins phosphorylated in serine or threonine residues (*fig. 2 A* and *B*).

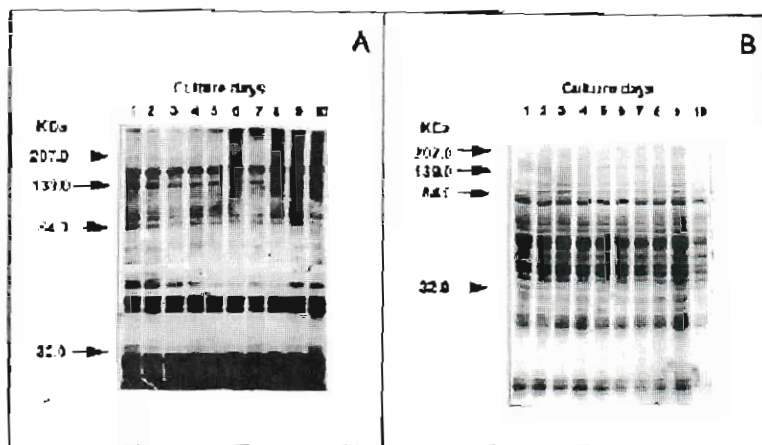


Figure 1A, B. General pattern of total proteins of particulate and soluble fractions along the culture cycle of *C. roseus* transformed roots. Arrowheads on the left show molecular weight standards. Lanes 1-10 denote culture days 1 to 10. (A) Proteins of particulate (133 µg) and (B) soluble (96 µg) fractions were separated by 7.5 % and 10 % SDS-PAGE and stained with silver nitrate solution. The results shown are representative of three separate experiments.

We used as a positive control the human epidermoid carcinoma cell line A431 that overexpresses EGF-receptor (2.6×10^6 receptors/cells). We detected several phosphorylated proteins with different molecular mass before and after alkali treatment (fig. 2 C, lane 1 and 2). However, the major band in extracts from A431 cells at 180 kDa corresponding to EGF-receptor that was expected, was not detected before or after the alkali treatment. This may be due to the fact that the cells were treated *in vivo* with EGF and that in response to the growth factor, this protein was phosphorylated *in vivo* and very little phosphate incorporation into the protein was incorporated in an *in vitro* assay (fig. 2 C, lane 2). In contrast several other bands showed a strong resistance to alkali treatment suggesting phosphorylation in tyrosine residues.

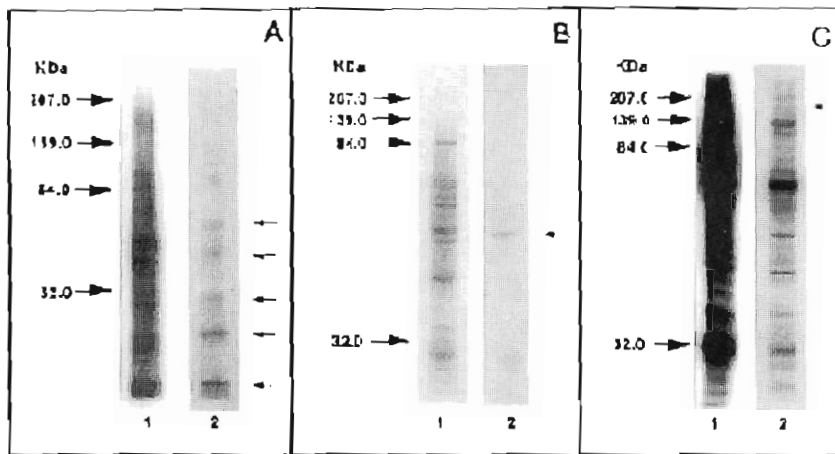


Figure 2A-C. Comparison of phosphorylation pattern of the proteins from the particulate and soluble fractions. Arrowheads on the left show molecular weight standards. (A) Proteins from particulate (154 μg) and (B) soluble (186 μg) fractions were phosphorylated *in vitro* in the presence of [^{32}P] γ -ATP as described in Material and Methods. Proteins were separated in 7.5 and 10 % SDS-PAGE respectively and electroblotted to nylon membranes. Membranes were treated (lane 2) or not (lane 1) with 1 M KOH. Kodak films were exposed for autoradiography for 3 days. (C) Triton extract (80 μg) from A431 cells were included as a positive control. The results shown are representative of four separate experiments.

Immunoblot analysis. The previous results with alkali treatment suggest the presence of phosphotyrosine containing proteins. *In vitro* phosphorylation was done in the absence of [^{32}P] γ -ATP. Proteins were separated by SDS-PAGE and electroblotted. Antibodies to phosphotyrosine provide one of the best tools for detection and characterization of tyrosine phosphorylated proteins. We used a recombinant antiphosphotyrosine antibody directly linked to horseradish peroxidase in order to detect phosphorylation in tyrosine residues. The occurrence of phosphorylation in tyrosine residues was detected as PY-antibodies revealed the presence of several bands in both fractions (*fig. 3*). We found in the particulate fraction bands with molecular mass of 173, 55 and 40 kDa and 116, 103, 63, 47 and 43 kDa for the soluble fraction. In order to see if the signal detected with the antibodies was specific,

PY-antibodies were incubated in the presence of o-phospho-L-tyrosine prior the immunodetection. In both fractions, we found that all proteins were specifically phosphorylated in tyrosine residues (fig. 3 A and B, lane 2). Interestingly, in both fractions comparison of the proteins, that gave positive signal with the PY-antibody, with the pattern of radioactive bands after alkali treatment showed several proteins that were present in both conditions. However, although, there were some bands that were detected with the antibody and not after alkali treatment, this was the case also for some proteins in the A431 cell line. A possible explanation for this discrepancy is the fact that in order to have signal after the alkali treatment, the proteins had to incorporate $^{32}\text{P-PO}_4$ during the *in vitro* phosphorylation. If those proteins, as in the particular case for the EGF-receptor band, were already tyrosine-phosphorylated *in vivo*, the incorporation of ^{32}P expected *in vitro* will not be the same as for a protein that was not totally tyrosine-phosphorylated *in vivo*. Therefore, it is possible that a tyrosine phosphorylated protein gives a positive signal with the PY-antibody and not after alkali treatment.

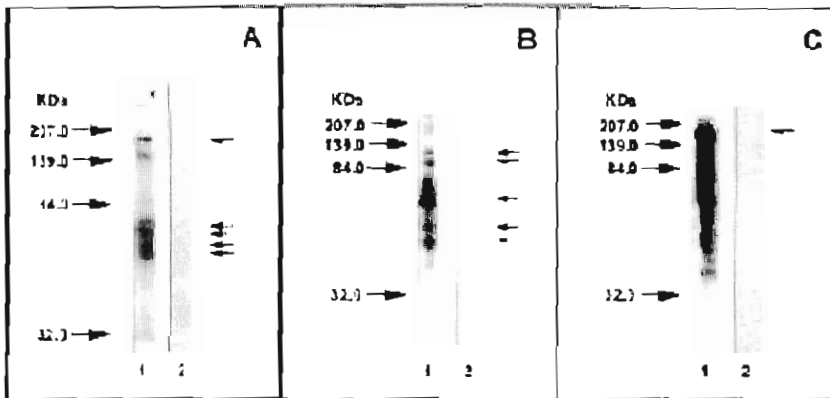


Figure 3A-C. Immunological detection of the proteins phosphorylated in the particulate and soluble fractions with antiphosphotyrosine antibodies after *in vitro* phosphorylation assay. (A) Particulate (100 µg) and (B) soluble (200 µg) fractions were separated in 7.5 and 10 % SDS-PAGE respectively and electroblotted. Immunoblot analysis with antiphosphotyrosine antibodies to phosphotyrosine in the absence (lane 1) and in the presence (lane 2) of 1 mM phosphotyrosine. Arrowheads on the left show molecular weight standards. (C) Triton extract (80 µg) from A431 cells were included as a positive control. The results shown are representative of four separate experiments.

In all cases we used the human carcinoma cell line A431 that overexpresses EGF receptors, as a control for the antibodies, therefore it contains a high capacity for phosphorylation in tyrosine residues. A major band in extracts from these cells is the 180 kDa protein that corresponds to EGF receptor, but several other bands were detected as well (fig. 3 C). The signal was completely specific as shown in fig. 3 C, lane 2.

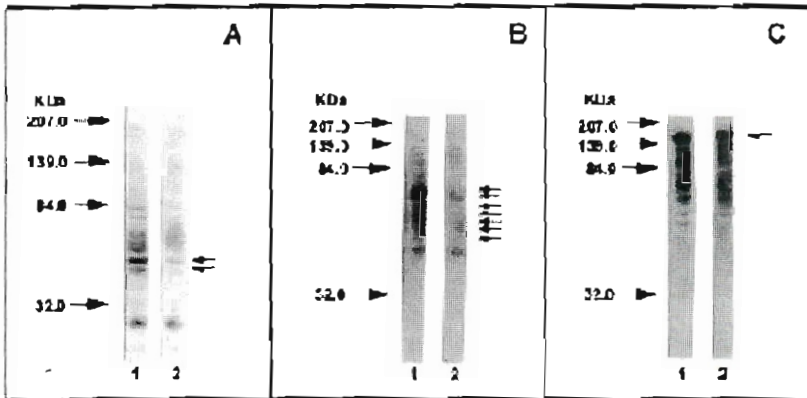


Figure 4A-C. *In situ phosphorylation assay.* (A) Particulate (100 µg) and (B) soluble (200 µg) proteins were separated in 7.5 and 10 % SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membrane. After *in situ* renaturation and phosphorylation as described in Materials and Methods, membranes were incubated in the presence (lane 1) or absence (lane 2) of 50 µM ATP for 60 min. Proteins were immunodetected with phosphotyrosine antibodies RC20H. Arrowheads on the left show molecular weight standards. (C) Triton extract (80 µg) from A431 cells were included as a positive control. The results shown are representative of four separate experiments.

In situ phosphorylation assay. Proteins of the particulate and soluble fractions were separated on SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose and incubated with or without ATP, as described in Materials and Methods for *in situ* phosphorylation. Membranes were washed and probed with PY-antibodies (fig. 4). In the particulate fraction under these conditions, several bands that cross react with PY-antibodies were found. Two of these proteins, 35 and 40 kDa, were the most intensely phosphorylated after incubation with ATP (fig. 4A). In the soluble fraction, several proteins phosphorylated in tyrosine residues in presence of ATP were also detected. Proteins of 72, 63, 47, 43 and 37

kDa were heavily stained after the reaction with the antibody (fig. 4B). The 180 kDa band in A431 cells slightly change their intensity in the presence of ATP, since EGF-receptor was already autophosphorylated *in vivo*.

Protein tyrosine kinase assay. Particulate and soluble fractions from homogenates of *C. roseus* were incubated with [³²P]γ-ATP. In order to detect PTK activity the incubation was carried out with the synthetic peptide, RR-SRC [RRLIEDAEYAARG], derived from the amino acid sequence surrounding the phosphorylation site in pp60^{src}. PTK activity was detected in the particulate and soluble fractions. In order to secure more evidence, a tyrosine kinase inhibitor was used to inhibit PTK activity. Therefore PTK activity was measured in the presence of varying increasing genistein concentrations (fig. 5), the dose-response curve for inhibition with genistein is shown. Extracts from A431 cells were able to phosphorylate RR-SRC at a higher rate (fig. 5).

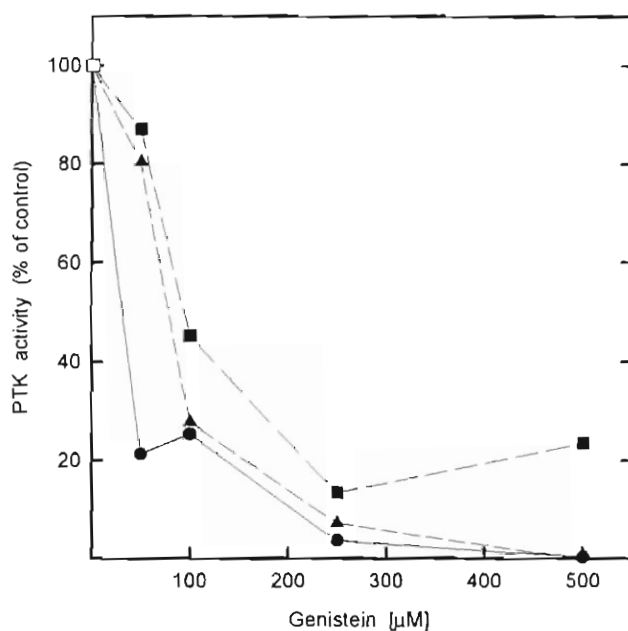


Figure 5. Tyrosine kinase activity and effect of genistein in the particulate and soluble fractions from sixth day of culture of *C. roseus* transformed roots. PTK activity was carried out with the synthetic peptide, RR-SRC, as described in Materials and Methods. Results were normalized to the specific activity in the absence of genistein (100 % □) which was 4.49, 2.81 and 31.03 pmol/min/mg in the particulate and soluble fractions from *C. roseus* and A431 cells respectively. Plotted are the means of four different experiments assayed in duplicate. PTK activity in extracts from particulate (■) and soluble (●) fractions from *C. roseus* and extracts from A431 cells (▲) was assayed in the presence of increasing concentration of genistein.

DISCUSSION

It is well established that in most cells, reversible protein phosphorylation, mediated by protein kinases, is one of the covalent protein modifications available for intracellular control of structure, activity, and targeting of enzymes and other proteins. These phosphorylations play a key role in the amplification of hormone signals and the regulation of cellular metabolism and development. In the highly specialized animal cells some processes are very rapid and involve massive serine/ threonine and tyrosine phosphorylation (Hernández-Sotomayor and Carpenter 1992). Tyrosine phosphorylation is a rare post-translational event in mammals; the phosphotyrosine content of normal animal tissue is 0.02-0.06% of overall phosphorylation. Therefore, studies on the identification and role of phosphotyrosyl- proteins have been hampered by their low concentrations and the difficulties in distinguishing them from phosphoseryl and phosphothreonyl proteins (Hernández-Sotomayor and Carpenter 1992).

The complete picture of interactions between the kinases, phosphatases, substrates, and effectors has not yet been obtained; nevertheless, some general patterns have emerged. In some cases, in eukaryotes, signal transduction involving phosphorylation is initiated at cell surface receptors with tyrosine kinase activity. The signal is then transferred through the cell in a cascade of serine/threonine and tyrosine phosphorylation events. In many cases, these events lead to altered gene expression (Marshall 1995).

As stated in the introduction, protein tyrosine phosphorylation has been reported for several species of higher plants. We have identified five proteins (10, 18, 25, 40 and 55 kDa) in the particulate fraction whose phosphorylation is unaffected by alkali treatment, which suggests the presence of proteins that contain phosphotyrosine. Some of these proteins (25, 40 and 55 kDa) gave as well a positive reaction with PY-antibodies. In addition, the 25 kDa protein has a molecular mass similar to the 27 and 28 kDa tyrosine phosphorylated proteins that have been found in membrane fractions from pea mitochondria (Håkansson and Allen 1995). Torruella et al. (1985) reported proteins phosphorylated in tyrosine residues in the particulate fraction from pea plantlets with molecular masses of 92 and 57 kDa. Additionally, using the synthetic substrates poly(Glu-Ala-Tyr)_n and [Val⁵] Arg II, they observed the presence of tyrosine kinase activity in the same fraction. In the present report, in the soluble fraction a protein with molecular mass of 63 kDa was resistant to alkali treatment. Other reports showed that in maize seedlings there are cytosolic proteins phosphorylated in tyrosine residues with molecular masses in the range 40-65 kDa and 84 kDa. The authors showed that alkali hydrolysis and western blotting with PY-antibodies give a positive reaction with proteins of the same molecular masses; phosphoaminoacid assay supported the presence of phosphorylation of proteins in tyrosine residues (Trojanek et al. 1996).

In situ phosphorylation, either in gels or on nitrocellulose blots, has been used in the analysis of purified protein kinases from animals, yeast, and plants (Verhey et al. 1993). We used this approach to identify and characterize protein kinase autophosphorylation. We found that in the particulate fraction, in the presence of ATP the 40 kDa protein was the most intensely phosphorylated protein. We also observed that the 63 kDa protein from the soluble fraction, increased its phosphorylation after

incubation with ATP. These results showed that phosphorylated proteins of 40 and 63 kDa that cross-react with PY-antibodies, after an *in situ* assay, may be autophosphorylated. These proteins (40 and 63 kDa) are present also after alkali treatment (fig. 2) and gave a positive signal with antiphosphotyrosine western blotting (fig. 3). Our results suggests the presence of proteins that could be autophosphorylated in tyrosine residues.

Also, in our system the particulate and soluble fractions were able to phosphorylate a synthetic substrate that can only be phosphorylated in tyrosine residues therefore, supporting the occurrence of tyrosine kinase activity in the particulate and soluble extracts. These results correlate with those from pea plantlets and maize seedlings (Torruella et al. 1985; Trojanek et al. 1996). Dose-response inhibition curve to genistein (a tyrosine kinase inhibitor) in particulate and soluble extracts showed a complete inhibition of the PTK activity present in *C. roseus*. This data is interesting because recently, in zucchini, it has been suggested, with the use tyrosine kinase inhibitors, that the naphthylphthalamic acid binding protein may be related to mammalian tyrosine kinases (Bernasconi 1996). We found that the human epidermoid carcinoma cell line A431 was able to phosphorylate the synthetic peptide at a higher rate, as a consequence of the overexpression of EGF-receptors (approximately 2.6×10^6 receptors/cells). In other cells with a lesser amount of EGF-receptors the tyrosine kinase activity is reduced (Sorkin et al. 1991).

Studies regarding the phosphorylation of proteins on tyrosine residues have been reported not only in plants and animals. In prokaryotic organisms such as *Rhodospirillum rubrum* (Vallejos et al. 1985); *Prochlorothrix hollandica* (Warner and Bullerjahn 1994) and *Acinetobacter calcoaceticus* (Dadssi and Cozzone 1990) protein tyrosine phosphorylation has been shown. These studies support the concept that phosphorylation on tyrosine residues is a widespread post-translational modification of proteins widespread, and probably universal, among prokaryotic and eukaryotic organisms.

In plants, the biological functions of PTK are not yet clear. Recently, the presence of receptors with protein kinase activity (RLK: Recceptor-Like Protein Kinases) in plants has been reported. However the RLKs characterized to date autophosphorylated on serine and, or threonine residues (Stone and Walker 1995; Braun and Walker 1996) with the exception of a *Petunia* RLK that uses serine and tyrosine residues (Mu et al. 1994). This fact differs from the receptor protein kinases from animals cells of which the majority so far characterized autophosphorylate on tyrosine residues. Data from Zhang et al. (1996) indicate that the activity of p34^{cdc2}-cyclin B in plants can be suppressed by tyrosine phosphorylation and support the suggestion (John et al. 1989) that control points in the plant cell cycle have parallels in other eukaryotes.

In this work we have shown evidence indicating the presence of tyrosine kinase activity in the particulate and soluble fractions of *C. roseus* hairy roots. We have found tyrosine phosphorylation in a non transformed tissue such as coconut embryo (Islas-Flores et al. manuscript in preparation) as well, therefore the presence of tyrosine kinase activity in *C. roseus* hairy roots may not be a result of the transformation. At this moment we do not know what are the signals that regulate this activity or what is the functional role in plant signal transduction.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Graham Carpenter for his generous assistance with reagents and advice, Sandra Rae for the revision of the English version of the manuscript, Dr. Victor M. Loyola-Vargas for the J1 line and Sue Carpenter for the administrative work to the FIRCA grant. Supported by Fogarty International Research Collaboration Award (RO3TW00263), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (3016-N9306) and a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Fellowship to Rodríguez-Zapata (88205).

REFERENCES

- Bernasconi P.** (1996) Effect of synthetic and natural protein tyrosine kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini (*Cucurbita pepo*) hypocotyls. *Physiol Plant* **96**: 205-210.
- Bloom H., Beier H. and H. S. Gross** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Braun D. M. and J. C. Walker** (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends in Biochem Sci* **21**: 70-73.
- Cheng H. F. and M. Tao** (1989) Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings. *Biochem Biophys Acta* **998**: 271-276.
- Ciau-Uitz R., Miranda-Ham M. L., Coello-Coello J., Chi B., Pacheco L. M. and V. M. Loyola-Vargas** (1994) Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell Dev Biol* **30**: 84-88.
- Dadssi M. and A. J. Cozzone** (1990) Evidence of protein-tyrosine kinase activity in the bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Biol Chem* **265**: 20996-20999.
- Duerr B., Gawienowski M., Ropp T. and T. Jacobs** (1993) MsERK1: A mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* **5**: 87-96.
- Decroocq-Ferrant V., Decroocq S., Van J., Schmidt E. and M. Kreis** (1995) A homologue of MAP/ERK family kinase genes is expressed in vegetative and female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol* **27**: 339-350.
- Gartner A., Nasmyth K. and G. Ammerer** (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev* **6**: 1280-1292.
- Gamborg O. L., Miller R. A. and K. Ojima** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158.
- Gellatly K. S., Moorhead G. B. G., Duff S. M. G., Lefebvre D. D. and W. C. Plaxton** (1994) Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. *Plant Physiol* **106**: 223-232.
- Guo Y. L. and S. J. Roux** (1995) Characterization of two protein phosphatases from pea nuclei. *Plant Physiol* **107**: 167-175.
- Håkansson G. and J. F. Allen** (1995) Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signalling. *FEBS Lett* **372**: 238-242.
- Hernández-Sotomayor S. M. T. and G. Carpenter** (1991) Non-catalytic activation of phospholipase C- γ 1 *in vitro* by epidermal growth factor receptor. *Biochem J* **293**: 507-511.

- Hernández-Sotomayor S. M. T. and G. Carpenter** (1992) Epidermal growth factor receptor: elements of intracellular communication. *J Membrane Biol* **128**: 81-89.
- Hirayama T. and A. Oka** (1992) Novel protein kinase of *Arabidopsis thaliana* (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine and threonine. *Plant Mol Biol* **20**: 653-662.
- Jagiello I., Donella-Deana A., Szczegieliński J., Pinna L. A. and G. Muszynska** (1992) Identification of protein phosphatase activities in maize seedlings. *Biochim Biophys Acta* **1134**: 129-136.
- John P. C. L., Sek F. J. and M. G. Lee** (1989) A homologue of cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the cell division cycle of *Chlamydomonas* and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1**: 1185-1193.
- Jonak C., Páy A., Bögre L., Hirt H. and E. Heberle-Bors** (1993) The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. *Plant J* **3**: 611-617.
- Jonak C., Kiegerl S., Lloyd J. and H. Hirt** (1995) MMK2 a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol Gen Genet* **248**: 686-694.
- Knetsch M. L. W., Wang M., Snaar-Jagalska E. B. and S. Heimovaara-Dijkstra** (1996) Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* **8**: 1061-1067.
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Marshall C. J.** (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinases activation. *Cell* **80**: 179-185.
- Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H. and K. Shinozaki** (1993) ATPMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **336**: 440-444.
- Mizoguchi T., Gotoh Y., Nishida E., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Iwasaki T., Kamada H. and K. Shinozaki** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant Journal* **5**: 111-122.
- Mu J-H, Lee H-S and T-H Kao** (1994) Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell* **6**: 709-721.
- Posada J. and J. A. Cooper** (1992) Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* **255**: 212-215.
- Payne D. M., Rossmann A. J., Martino P., Erickson A. K., Her J. H., Shabanowitz J., Hunt D. F., Weber M. J. and T. W. Sturgill** (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* **10**: 885-892.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and D. C. Klenck** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Sorkin A., Waters C., Overholser K.A. and G. Carpenter** (1991) Multiple autophosphorylation site mutations of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **266**: 8355-8362.

- Stone J. M. and J. C. Walker** (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol* **108**: 451-457.
- Suzuki K. and H. Shinshi** (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* **7**: 639-647.
- Torruella M., Casano L. M. and R. H. Vallejos** (1986) Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and the presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets. *J Biol Chem* **261**: 6651-6653
- Trojanek J., Ek P., Scoble J., Muszynska G. and L. Engström** (1996) Phosphorylation of plant and identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedling. *Eur J Biochem* **235**: 338-344.
- Uchida T., Matozaki T., Noguchi T., Yamao T., Horita K., Suzuki T., Fujioka Y., Sakamoto C. and M. Kasuga** (1994) Insulin stimulates the phosphorylation of tyr⁵³⁸ and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with src homology-2 domains. *J Biol Chem* **269**: 12220-12228.
- Vallejos R. H., Holuigue L., Lucero H. A. and M. Torruella** (1985) Evidence of tyrosine kinase activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys Res Commun* **126**: 685-691.
- Verhey S., Gaiser J. C. and T. L. Lomax** (1993) Protein kinases in zucchini. *Plant Physiol* **103**: 413-419.
- Warner K. M. and G.S. Bullerjahn** (1994) Light-dependent tyrosine phosphorylation in the cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica*. *Plant Physiol* **105**: 629-633.
- Zhang K., Letham D. S. and P. C. L. John** (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta* **200**: 2-12.

CAPITULO 8

Detection of tyrosine phosphatase activity in *Catharanthus roseus* hairy roots

Luis Carlos Rodríguez-Zapata and S. M. Teresa Hernández-Sotomayor

ABSTRACT

We determined the presence of protein tyrosine phosphatase (EC 3.1.3.48) activity (PTP) in *Catharanthus roseus* transformed roots. Increased concentrations of sodium orthovanadate, a PTP inhibitor, induce higher levels of tyrosine phosphorylation in two proteins (43 and 63 kDa) present in the soluble fraction. PTP was also tested using an exogenous substrate RR-SRC-PY, a synthetic peptide with a single phosphotyrosine residue, derived from the amino acid sequence surrounding the phosphorylation site in pp60^{src}. PTP activity was observed in the soluble and in the particular fractions. This activity was inhibited by sodium orthovanadate and stimulated by β -mercaptoethanol. These results indicate, for the first time, the presence of PTP activity in transformed plant tissues.

INTRODUCTION

Protein phosphorylation regulates a variety of cellular processes and is known to be involved in signal transduction and regulation of enzyme activity in both eukaryotes and prokaryotes (Uchida *et al.*, 1994). Most of the phosphorylation that occurs in animal cells is in serine or threonine residues and to a smaller degree in tyrosine residues (less than 0.1% of total phosphorylations). Phosphotyrosine is a minor component of animal cells, but cells stimulated by certain factors to divide may contain 5- to 10-fold more phosphotyrosine than resting cells (Hernández-Sotomayor and Carpenter, 1992). The occurrence of tyrosine phosphorylation is determined by the balance between the actions of protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) (Uchida *et al.*, 1994). Plant cells are not an exception to this phenomenon. To date, evidence for tyrosine dephosphorylation and tyrosine phosphatase activity has already been reported in a few plant species. Phosphotyrosine protein phosphatases have been reported in wheat seedlings (Cheng and Tao 1989), maize seedlings (Jagiello *et al.*, 1992), potato tuber (Gellatly *et al.*, 1994) and pea nuclei (Guo and Roux 1995). Guo and Roux (1995) purified a PTP from pea nuclei with molecular mass of 90 kDa. They observed that this PTP was able to dephosphorylate the synthetic substrate poly(Glu, Tyr). Another report shows that in mature potato tubers there are two proteins of 55 and 57 kDa with tyrosine phosphatase activity. The authors suggest that both polypeptides are associated with a native potato tyrosine phosphatase of 100 kDa (Gellatly *et al.*, 1994). Zhang *et al.* (1996) also demonstrated that in excised pith parenchyma from *Nicotiana tabacum* cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase.

We previously reported several proteins that are phosphorylated in tyrosine residues in *Catharanthus roseus* transformed roots (Rodríguez-Zapata and Hernández-Sotomayor, 1998). In an effort to completely understand the whole process of protein tyrosine phosphorylation, the main goal of this work was to investigate the presence of protein tyrosine phosphatase activity in *C. roseus* transformed roots.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Hairy root line J1 of *C. roseus* was obtained by infection of leaves with *Agrobacterium rhizogenes* (Ciau-Uitz *et al.*, 1994) and maintained in B₅ medium (Gamborg *et al.*, 1968) (1.54 g.l⁻¹), supplemented with 30 g.l⁻¹ sucrose. pH was adjusted to 5.7 prior to autoclaving of the medium with 0.1 M KOH/HCl. One hundred milliliters of medium were placed in a 250 ml Erlenmeyer flask and autoclaved for 20 min at 15 psi. Flasks were inoculated with 0.5 g (fresh mass) of hairy roots.

Preparation of tissue and cell extracts. The following procedure was performed at 4°C. 1 g of roots were ground with liquid nitrogen in a mortar and homogenized in buffer A (50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris.HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 10 % glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate). Extracts were passed through gauze, and tissue debris was removed by centrifugation at 1000 x g for 30 min. The supernatant was further centrifuged at 100 000 x g for 45 min. The supernatant (protein: 4.0 mg ml⁻¹) was recovered as the soluble fraction. The pellet was resuspended in the same buffer A (protein: 2.5 mg.ml⁻¹), and was used as a crude particulate fraction. Cell extracts were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -75 °C. Protein concentration of samples was measured by bicinchoninic acid (Smith *et al.*, 1985) protein assay reagent using bovine serum albumin as standard.

In vitro phosphorylation assay. Particulate and soluble fractions that were extracted in the absence of sodium orthovanadate were incubated at 30°C with phosphorylation buffer containing 20 mM Hepes pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 50 μM ATP and 17 mM β-mercaptoethanol in the presence or absence of increasing concentrations of sodium orthovanadate. After 30 min, the reaction was stopped with Laemmli buffer (Laemmli, 1970) and heated at 80°C for 5 min. Phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE using 7.5% and 10% acrylamide gels for particulate and soluble proteins, respectively, and electroblotted onto nitroplus transfer membranes for 5 hrs at 50V. Filters were probed with recombinant antiphosphotyrosine antibodies RC20H and visualized by ECL chemiluminescence.

Protein tyrosine phosphatase assay. PTP was assayed using a non-radioactive ELISA based method. The biotinylated phosphopeptide sequence is Biotin-RRLLIEDAE[pY]AARG-amide. Particulate and soluble fractions extracted in the absence of sodium orthovanadate were incubated in a buffer containing 5 mM Tris, 0.5 mM NaCl pH 7.2, 250 μM genistein and 1 μg/ml biotinylated phosphopeptide. 50 μl of the sample were transferred to a Neutr Avidin-coated strip well and incubated at 30°C for 30 min. The wells were washed three times with TBS (25 mM Tris and 0.15 mM NaCl, pH 7.6) and incubated with anti-phosphotyrosine (PY20) HRP-labeled antibody

for one hour at 30°C. The wells were washed three times with TBS and visualized with Turbo-TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine). The reaction was terminated with 1 N H₂SO₄ and the absorbance read at 450 nm.

Materials. BCA protein assay reagent and tyrosine kinase assay kit ELISA based were supplied by Pierce Chemical Co. Monoclonal phosphotyrosine antibody (RC20H) was purchased from Transduction Labs. ECL chemiluminescence kit was obtained from Amersham. Nitro Plus transfer membranes were obtained from Micron Separations Inc. Sodium orthovanadate and other chemicals were obtained from Sigma.

RESULTS

Effect of sodium orthovanadate in tyrosine kinase activity. We previously reported several proteins that were phosphorylated in tyrosine residues in *Catharanthus roseus* transformed roots (Rodríguez-Zapata and Hernández-Sotomayor, 1998). As stated in the introduction, in the present work we want to look for PTP activity. Sodium orthovanadate has been shown to be a very specific inhibitor of PTPs. In our previous work, in order to detect PTK, the cell extracts and the phosphorylation reactions were prepared in the presence of sodium orthovanadate. In this study, our first goal was to investigate the effect of this PTP inhibitor in cell preparations extracted in the absence of sodium orthovanadate. After the extraction, the extracts were incubated in phosphorylation buffer that contains increasing concentrations of sodium orthovanadate. After 30 min of incubation, particulate and soluble proteins were resolved in 7.5 % and 10 % acrylamide gels respectively and electroblotted onto a nitroplus transfer membrane. We used a recombinant antiphosphotyrosine antibody directly linked to horseradish peroxidase in order to detect phosphorylation in tyrosine residues. In proteins from the particulate fraction no change in the tyrosine phosphorylation pattern was observed in these conditions (data not shown). However, in the soluble fraction, two proteins of 43, and 63 kDa gave positive signal with the antiphosphotyrosine antibodies (*fig. 1*). These tyrosine phosphorylation contents in those proteins were enhanced, when the reaction was performed in the presence of increasing concentrations of sodium orthovanadate.

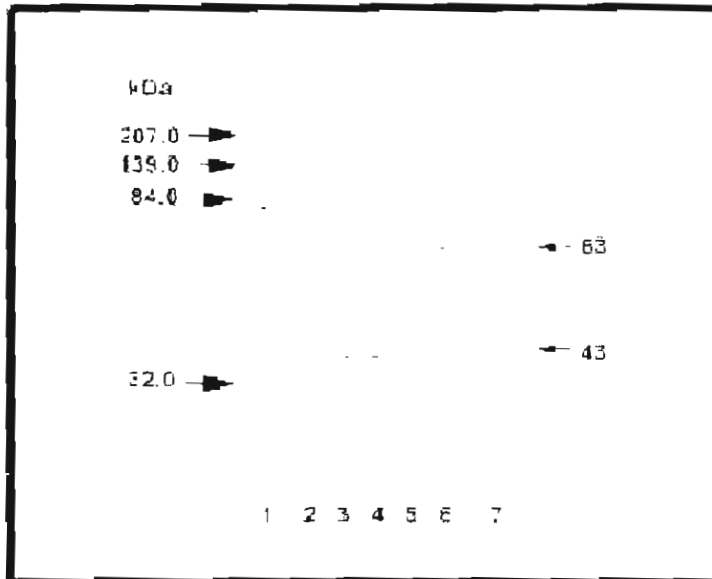


Figure 1. Effect of sodium orthovanadate on the tyrosine phosphorylation of proteins from the soluble fraction of *C. roseus* transformed roots. Soluble fractions were extracted in the absence of sodium orthovanadate and incubated in phosphorylation buffer that contains increasing concentrations of sodium orthovanadate. Without sodium orthovanadate (lane 1); 0.05 mM (lane 2); 0.1 mM (lane 3); 0.15 mM (lane 4); 0.2 mM (lane 5); 0.4 mM sodium orthovanadate (lane 6); proteins extracted with sodium orthovanadate and incubated in a phosphorylation buffer with 0.1 mM sodium orthovanadate (lane 7). After 30 minutes, proteins were separated in 10 % SDS-PAGE electroblotted and immunodetected with antiphosphotyrosine antibodies. The results shown are representative of four separate experiments. Arrows on the left: molecular-weight standards in kDa.

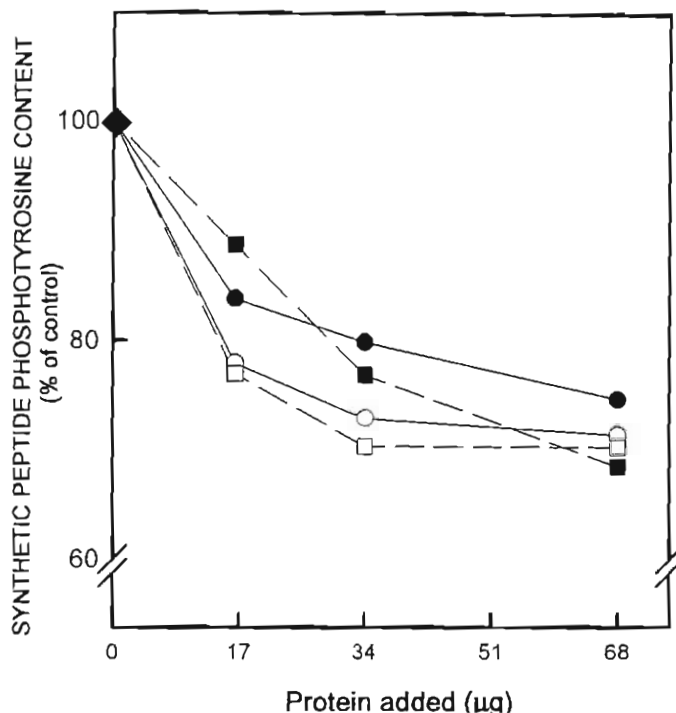


Figure 2. Tyrosine phosphatase activity in the particulate (circles) and soluble (squares) fractions from the sixth day of culture of *C. roseus* transformed roots. PTP activity was carried out as described in Materials and Methods. Increasing concentrations of proteins extracted in absence of sodium orthovanadate were added to the PTP assay. Proteins from both fractions were incubated in the presence of 17 mM β -mercaptoethanol (■, ●) or 34 mM β -mercaptoethanol (□, ○) and the synthetic peptide (1mg/ml, 100% \diamond). Plotted are the means of four different experiments assayed in duplicate.

Protein tyrosine phosphatase activity. The synthetic phosphopeptide [RRLIEDAE(PY)AARG], derived from the amino acid sequence surrounding the phosphorylated site in pp60^{src} was incubated in the presence of particulate and soluble proteins from homogenates of *C. roseus* transformed roots. These proteins were extracted in the absence of sodium orthovanadate. PTP activity was detected using increased concentrations of the particulate and the soluble protein (fig. 2). In addition these PTP activities were enhanced by the presence of β -mercaptoethanol (figs. 2 and 3). We observed that the maximum PTP activity of the particulate and the soluble proteins was obtained with 51 mM β -mercaptoethanol (fig. 3).

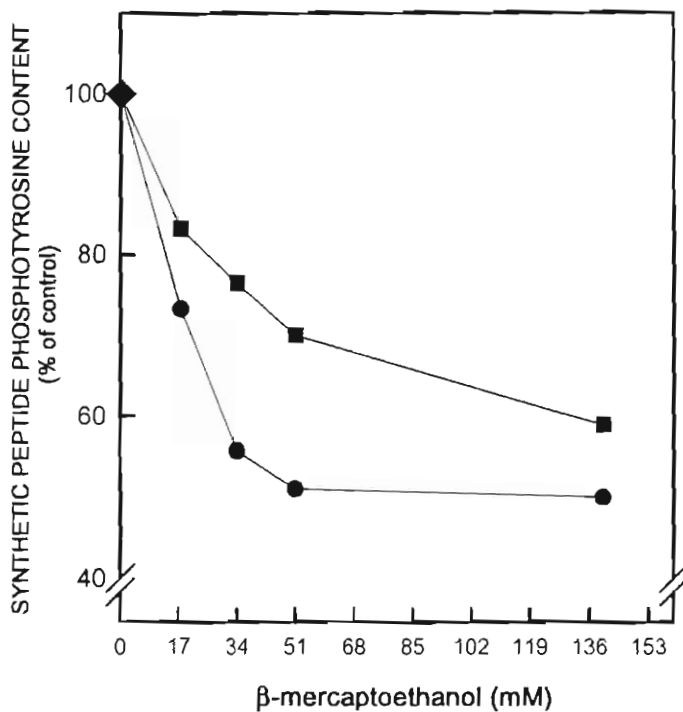


Figure 3. Effect of β -mercaptoethanol on the PTP activity of the particulate (circles) and soluble (squares) fractions of *C. roseus* transformed roots. Particulate and soluble (70 μ g) proteins were incubated with increasing concentrations of β -mercaptoethanol in the presence of the synthetic peptide (1 mg/ml, 100% \diamond), as described in Materials and Methods. Plotted are the means of four different experiments assayed in duplicate.

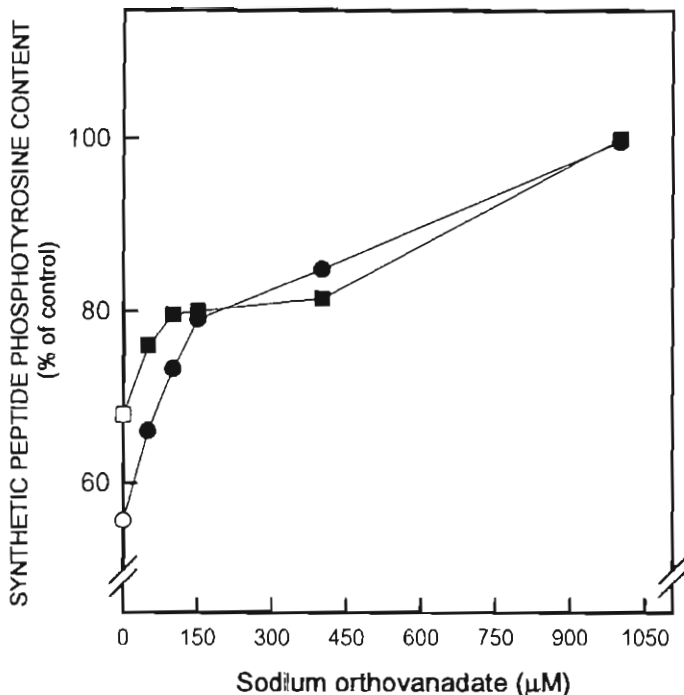


Figure 4. Effect of sodium orthovanadate on the PTP activity of the particulate (circles) and soluble (squares) fractions of *C. roseus* transformed roots. Particulate and soluble proteins (70 µg) were incubated with increasing concentrations of sodium orthovanadate. Also these proteins were incubated with 1 mg/ml (100% \diamond) synthetic peptide and 34 mM β -mercaptoethanol, as described in Materials and Methods. Plotted are the means of four different experiments assayed in duplicate.

In order to secure more evidence of the presence of PTP in our system, sodium orthovanadate (a tyrosine phosphatase inhibitor) was used. PTP activity was measured in the presence of increasing concentrations of sodium orthovanadate. The dose-response curve for inhibition with orthovanadate is shown (fig. 4). Increased concentrations of orthovanadate completely block the phosphatase activity.

DISCUSSION

In mammalian cells phosphorylation on tyrosine residues of proteins is an important cellular regulatory mechanism, involved in processes such as cell growth, proliferation and differentiation. The extent of tyrosine phosphorylation is determined by the balance between the actions of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases (Uchida *et al.*, 1994). Much work has been done on the enzymes responsible for phosphorylating tyrosine residues, the protein tyrosine kinases. In recent years, attention has also turned to the enzymes that dephosphorylate tyrosine residues, the protein tyrosine phosphatases (Fauman and Saper, 1996).

In higher plants protein tyrosine phosphorylation has been reported for several species as stated in the introduction (Torruella *et al.*, 1985; Håkansson and Allen, 1995; Trojanek *et al.*, 1996). We recently demonstrated the presence of tyrosine kinase activity and found relatively high levels of phosphotyrosine in the particulate and soluble proteins of *C. roseus* hairy roots (Rodríguez-Zapata and Hernández-Sotomayor, 1998).

Biochemically, tyrosine phosphatases can be identified by their sensitivity to vanadate, their insensitivity to okadaic acid, their lack of dependence on metal ions and its ability to increase their activity in the presence of reducing agents such as β -mercaptoethanol (Fauman and Saper, 1996).

In the experiments reported here, we have found that in *C. roseus* transformed roots a PTP activity which is protein concentration-dependent, requires the presence of β -mercaptoethanol, is inhibited by orthovanadate and displays selectivity for certain substrates such as the 43 and 63 kDa soluble proteins.

We have identified in the soluble fraction two proteins of 43 and 63 kDa whose phosphorylation *in vitro* in tyrosine residues is increased by the presence of sodium orthovanadate, demonstrating that at least two endogenous phosphotyrosyl proteins could serve as *in vitro* substrates for the PTP activity in *C. roseus* transformed roots. Although, we previously reported the presence of several protein tyrosine phosphorylated proteins in our model, apparently, the PTP activity present in *C. roseus* only dephosphorylated two of these proteins. The specificity of a certain endogenous PTP toward different substrates has been already demonstrated (Hernández-Sotomayor *et al.*, 1993; Mooney *et al.*, 1992; Cool *et al.*, 1990).

Also, in our system the particulate and soluble fractions were able to dephosphorylate a synthetic substrate that is phosphorylated in tyrosine residues, therefore, supporting the occurrence of tyrosine phosphatase activity in the particular and soluble extracts. We demonstrated that PTP activity in both fractions was increased by the presence of β -mercaptoethanol. In several cells it has been demonstrated that PTP activity is enhanced by β -mercaptoethanol in a range of 15-50 μ M (Guo and Roux, 1995; Hernández-Sotomayor *et al.*, 1993). For all of the PTPases isolated by biochemical methods, requiring the presence of thiol-reducing reagents, it was concluded that a cysteinyl group was involved in the catalysis (Walton and Dixon, 1993). The PTP activity found in *C. roseus* is not an exception (*fig. 3*).

A number of PTPase inhibitors has also been used in characterizing these enzymes. Orthovanadate inhibits all PTPases at concentrations between 10-200 μ M, when purified enzymes were used. The dose-response inhibition curve to sodium

orthovanadate in particular and soluble extracts showed a complete inhibition of the PTP activity present in *C. roseus* transformed roots (fig. 2); although higher concentrations were needed in order to completely inhibit the activity, 100 μ M was enough to block more than 50% of the PTP activity. These results correlate with those from potato and pea (Gellatly *et al.*, 1994; Guo and Roux 1995). Guo and Roux (1995), demonstrate the presence of protein tyrosine activity in Pea nuclei. These authors observed that PTP activity was almost totally blocked by molybdate and vanadate.

In summary, in the present work we show evidence suggesting the presence of PTP activity in *C. roseus* transformed roots.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Ingrid Olmsted for the revision of the English version of the manuscript and Dr. Victor M. Loyola-Vargas for the J1 line. Supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (3016-N9306) and a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Fellowship to Rodríguez-Zapata (88205).

REFERENCES

- Cheng H. F. and M. Tao (1989) Purification and characterization of a phosphotyrosil-protein phosphatase from wheat seedlings. *Biochem. Biophys. Acta* **998**:271-276.
- Ciau-Uitz R., Miranda-Ham M. L., Coello-Coello J., Chi B., Pacheco L. M. and V. M. Loyola-Vargas (1994) Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **30**:84-88.
- Cool D. E., Tonks N. K., Charbonneau H., Fischer E. H. and E. G. Krebs (1990) Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:7280-7284.
- Fauman E. B. and M. A. Saper (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biol. Sci.* **21**:413-417.
- Gamborg O. L., Miller R. A., and K. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* **50**:151-158.
- Gellatly K. S., Moorhead G. B. G., Duff S. M. G., Lefebvre D. D. and W. C. Plaxton (1994) Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. *Plant Physiol.* **106**: 223-232.
- Guo Y. L. and S. J. Roux (1995) Characterization of two protein phosphatases from pea nuclei. *Plant Physiol.* **107**:167-175.
- Håkansson G. and J. F. Allen (1995) Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signaling. *FEBS Lett.* **372**:238-242.
- Hernández-Sotomayor S. M. T., Arteaga C. L., Soler C. and G. Carpenter (1993) Epidermal growth factor stimulates substrate-selective protein-tyrosine-phosphatase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7691-7695.
- Hernández-Sotomayor S. M. T. and Carpenter G. (1992) Epidermal growth factor receptor: elements of intracellular communication. *J. Membrane Biol.* **128**:81-89.

- Jagiello I., Donella-Deana A., Szczegielniak J., Pinna L. A. and G. Muszynska** (1992) Identification of protein phosphatase activities in maize seedlings. *Biochem. Biophys. Acta* **1134**:129-136.
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Mooney R. A., Freund G. G., Way B. A. and K. L. Bordwell** (1992) Expression of a transmembrane phosphotyrosine phosphatase inhibits cellular response to platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1. *J. Biol. Chem.* **267**: 23443-23446.
- Rodríguez-Zapata L. C. and S. M. T. Hernández-Sotomayor** (1998) Evidence of protein-tyrosine activity in *Catharanthus roseus* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Planta* **204**:70-77.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and D. C. Klenck** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.
- Torruella M., Casano L. M. and R. H. Vallejos** (1986) Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and the presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets. *J. Biol. Chem.* **261**:6651-6653.
- Trojanek J., Ek P., Scoble J., Muszynska G. and L. Engström** (1996) Phosphorylation of plant and identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedling. *Eur. Biochem.* **235**:338-344.
- Uchida T., Matozaki T., Noguchi T., Yamao T., Horita K., Suzuki T., Fujioka Y., Sakamoto C. and M. Kasuga** (1994) Insulin stimulates the phosphorylation of tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with src homology-2 domains. *J. Biol. Chem.* **269**:12220-12228.
- Walton K. M. and J. E. Dixon** (1993) Protein tyrosine phosphatase. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:101-120.
- Zhang K., Letham D. S. and P. C. L. John** (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta* **200**:2-12.

CAPITULO 9

Discusión general

Se sabe en células de animales que la fosforilación de proteínas es una modificación covalente reversible, que puede regular la estructura y la actividad de muchas proteínas. Esta modificación de las proteínas por fosforilación tiene una importante función en la amplificación de la señal hormonal, en la regulación metabólica y en el desarrollo celular (Verhey *et al.*, 1993). Una proteína fosforilada puede ser una proteína cinasa capaz de fosforilar a otras cinasas o proteínas, y desencadenar una cascada de fosforilaciones en diversos residuos de aminoácidos entre los que se encuentra la fosforilación en tirosina. Este tipo de modificación en residuos de tirosina, en células de mamíferos, es un evento post-traducciona que sucede en un pequeño porcentaje (0.06%), lo que ha hecho difícil su identificación, el conocimiento de la funcionalidad de las proteínas que se fosforilan en tirosina, y el diferenciarlas de aquellas fosforilaciones en los residuos de serina y treonina. Sin embargo, se piensa que la fosforilación en residuos de tirosina tiene una función importante en los procesos de diferenciación, desarrollo celular y transformación oncogénica (Hunter, 1989; Sun y Tonks, 1994; Hunter, 1995; Fauman y Saper, 1996).

En sistemas tanto eucarióticos como procarióticos, se ha observado la presencia de proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina (Vallejos *et al.*, 1985; Warner y Bullerjahn, 1994; Dadssi y Cozzone, 1990) lo que sugiere que esta modificación covalente está ampliamente distribuida en ambos sistemas. Sin embargo, en los sistemas vegetales la regulación bioquímica por modificación covalente en residuos de tirosina, no ha sido muy estudiada. Hasta ahora, existen pocos reportes sobre la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en células vegetales. Como consecuencia, no se conoce la función de esta modificación covalente en los sistemas vegetales. Debido al escaso conocimiento que existe en las plantas de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, en el presente trabajo se planteó el objetivo de determinar la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en las raíces transformadas de *C. roseus*.

FOSFORILACION *IN VITRO* CON [³²P]γ-ATP E HIDROLISIS ALCALINA DE PROTEINAS

Nosotros encontramos que, tanto en la fracción membranal como en la fracción soluble de las raíces transformadas de *C. roseus*, existen varias proteínas que se fosforilan *in vitro* empleando [³²P]γ-ATP, tal como se muestra en la cuadro 4. Este resultado indica que en las raíces de *C. roseus*, existen proteínas capaces de ser fosforiladas; sin embargo este experimento no nos permite determinar el tipo de aminoácido al cual se incorporará el [³²P]-fosfato.

El enlace éster entre el fosfato y el aminoácido tirosina, es muy estable a pH básico, a diferencia del enlace éster entre el fosfato y los residuos de serina y treonina, que es más sensible a pH alto; en base a esto, algunas proteínas fosforiladas con [³²P]γ-ATP y posteriormente tratadas con KOH, fueron resistentes a la hidrólisis

alcalina (las proteínas membranales de 18, 25, 40 y 55 kDa y una proteína soluble de 63 kDa). Este resultado indica la fosforilación en residuos de tirosina en estas proteínas membranales y solubles.

INMUNODETECCION DE LAS PROTEINAS FOSFORILADAS EN TIROSINA

El uso de anticuerpos monoclonales específicos contra fosfotirosina ha permitido la identificación de varias proteínas que son fosforiladas en residuos de tirosina en sistemas eucarióticos (Uchida *et al.*, 1994; Leduc and Meloche, 1995; Nesterov *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1995; Stanner *et al.*, 1995; Van der Geer *et al.*, 1996; Ojaniemi *et al.*, 1997). Los experimentos de inmunodetección con anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina, detectaron varias proteínas en la fracción membranal (25, 40, 55 y 173 kDa), y en la fracción soluble (43, 47, 63, 103 y 116 kDa). El reconocimiento de estas proteínas por los anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina, sugiere que estas proteínas se fosforilan en este aminoácido. Sin embargo, solamente una proteína soluble de 63 kDa y dos proteínas de la fracción membranal las de 55 y 40 kDa, son también resistentes a la hidrólisis alcalina. Una posible explicación es que estas proteínas no presentan una fosforilación basal previa, por lo que incorporan suficiente [³²P]γ-ATP en un ensayo *in vitro*. Esto datos sugieren que estas proteínas de 63, 55 y 40 kDa se fosforilan específicamente en residuos de tirosina.

ACTIVIDAD DE PROTEINA TIROSINA CINASA EN *C. roseus*

Las proteínas cinasas tienen la capacidad de autofosforilarse. La fosforilación *in situ* es una técnica bioquímica que ha sido utilizada para determinar las proteínas que tienen la característica de autofosforilarse. Utilizando esta técnica, se detectaron varias proteínas en los extractos celulares de *C. roseus* (proteínas solubles de 37, 43, 47, 63 y 72 kDa y proteínas membranales de 35 y 40 kDa), que dan señal positiva con los anticuerpos monoclonales contra fosfotirosina en un ensayo de fosforilación *in situ*. Estos resultados sugieren que estas proteínas pueden ser PTK. Sin embargo, como se observa en la cuadro 4, únicamente las proteínas solubles de 43, 47 y 63 kDa y una proteína membranal de 40 kDa, fueron reconocidas por el método de inmunodetección. Esta discrepancia puede ser explicada por el hecho de que las proteínas de 35, 37 y 72 kDa, al ser sometidas a un proceso de renaturalización antes de ser fosforiladas *in situ*, posiblemente cambiaron su conformación, permitiendo tomar directamente el fosfato del medio *in vitro* (autofosforilarse) y por consecuencia ser reconocidas por los anticuerpos monoclonales específicos contra fosfotirosina. Estos resultados fueron comprobados, al determinar que en los extractos tanto membranales como solubles, existen ciertas proteínas que tienen actividad de PTK, en base al hecho de que estas proteínas fueron capaces de fosforilar a un péptido (secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos que forma parte de la proteína pp60^{src}) el cual contiene en su secuencia un sitio único de fosforilación, que corresponde a un residuo de tirosina. Como resultado se obtuvo que tanto, la fracción membranal como la fracción soluble, presentan actividad de tirosina cinasa. Asimismo, se observó que las actividades de proteína cinasa en ambas fracciones fueron inhibidas al incubar los extractos proteicos

en presencia de un isoflavonoide denominado genisteína, el cual es un inhibidor específico de PTK.

Los resultados mostrados en este trabajo sugieren la presencia de proteínas con actividad de PTK en sistemas vegetales como son las raíces transformadas de *C. roseus*.

ACTIVIDAD DE PROTEINA TIROSINA CINASA EN PLANTAS

En los últimos años se han publicado algunos reportes sobre la detección de fosforilación en tirosina en varias especies de plantas. Por ejemplo, Torruella *et al.*, (1986), utilizando plántulas de chícharo, detectaron dos proteínas, una de 92 kDa y otra de 57 kDa que se fosforilan en residuos de tirosina. También observaron que al incubar el extracto proteico con sustratos artificiales que contenían un sitio de fosforilación en tirosina, tales sustratos se fosforilaban. Este resultado indicó la presencia de actividad de tirosina cinasa. Por otra parte, en la misma especie, Håkansson y Allen (1996), determinaron la presencia de tres proteínas de 28, 27 y 12 kDa presentes en la membrana de mitocondria, que se fosforilan en residuos de tirosina. La fosforilación de las proteínas mencionadas fue resistente a hidrólisis alcalina. Además, su fosforilación se inhibió en presencia de genisteína, un inhibidor específico de PTKs. Recientemente, Trojanek *et al.*, (1996) utilizando la fracción soluble de plántulas de *Zea mays*, identificaron y purificaron parcialmente una fracción proteica con actividad de PTK. También encontraron que las proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina presentan pesos moleculares entre 40 y 65 kDa.

Asimismo, hay evidencias de que en hipocótilos de *Cucurbita pepo* el transporte de las auxinas, está regulado por proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina (Bernasconi, 1996).

PROTEINA CINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS

Debido a la presencia de proteínas de bajo peso molecular, tanto en la fracción membranal como en la citosólica entre 32 y 47 kDa y al hecho de que las MAP cinasas (proteína cinasa activada por mitógenos) son una familia de enzimas con pesos moleculares entre 40 y 47 kDa que requieren para su actividad fosforilarse en residuos de treonina y tirosina, sugerimos que tal vez algunas de las proteínas en nuestro sistema pueda ser una MAP cinasa (Mizoguchi *et al.*, 1994; Seger y Krebs, 1995). Se ha encontrado a través de estudios bioquímicos y moleculares la presencia de enzimas y genes similares a MAP cinasas en plantas (Duerr *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994; Suzuki y Shinshi, 1995; Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995). Asimismo, nosotros encontramos en las raíces transformadas de *C. roseus*, evidencia de la presencia de proteínas similares a las MAP cinasas de células animales. Estas proteínas fueron detectadas con anticuerpos monoclonales específicos contra ERK1 (cinasa regulada por señales extracelulares tipo 1 de células de animales) (dato no mostrado). En células animales se ha demostrado que las MAP cinasas, son proteínas cuya función es de gran importancia para la expresión de genes específicos que se encuentran involucrados en el desarrollo, crecimiento celular. Estas enzimas son capaces de fosforilar proteínas involucradas en procesos mitogénicos como la proteína-2-asociada

a microtúbulos, el factor de transcripción proto-oncogénico *c-jun*, la proteína oncogénica de 90 kDa S6 cinasa II y la proteína oncogénica de 70 kDa S6 cinasa (Duerr *et al.*, 1993). En nuestro modelo es posible que estas proteínas observadas en el rango de 32–47 kDa podrían estar involucradas en el desarrollo y crecimiento celular como se ha propuesto en células de animales, o también mediando la respuesta a los diferentes estímulos como los cambios de temperatura, herida, inductores fúngicos y fito-hormonas (Jonak *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994; Suzuki y Shinshi, 1995; Hirt, 1997).

ACTIVIDAD DE PROTEINA TIROSINA FOSFATASA EN *C. roseus*

En células animales, se conoce que el balance neto de la fosforilación en residuos de tirosina en las proteínas, depende de una coordinada actividad entre las PTKs y PTPs (Uchida *et al.*, 1994). En base a este antecedente, se determinó que, en las raíces transformadas de *C. roseus*, existe la presencia de actividad de PTKs, lo cual sugiere la posibilidad de encontrar proteínas con actividad de PTPs que estén regulando los niveles de fosforilación en residuos de tirosina en las raíces transformadas de *C. roseus*.

En las células de animales, la actividad catalítica de las PTPs se inhibe en presencia de vanadato y su activación depende de la presencia de β -mercaptoetanol, agente reductor de los grupos sulfhidrilos que se encuentran presentes en los aminoácidos de cisteína que conforman una parte del sitio activo de las PTPs (Fauman y Saper, 1996). Como primer paso para detectar la presencia de PTPs en nuestro sistema, se decidió ver el efecto que tenía la presencia de dosis crecientes de ortovanadato de sodio en un ensayo de fosforilación *in vitro*, seguido por la detección de las proteínas fosforiladas en tirosina con anticuerpos monoclonales específicos contra fosfotirosina. En los extractos celulares de *C. roseus*, encontramos que la fosforilación *in vitro* en residuos de tirosina de dos proteínas solubles (43 y 63 kDa), se incrementó en presencia de ortovanadato de sodio. Estos resultados sugieren que posiblemente las proteínas de 43 y 63 kDa sean sustratos específicos de las PTPs presentes en las raíces transformadas de *C. roseus*.

Otro experimento que se realizó para detectar la presencia de actividad de PTPs en los extractos celulares extraídos en ausencia de ortovanadato de sodio (tanto de la fracción membranal como de la citosólica) de las raíces transformadas, fue observar si en estos extractos celulares, existe la presencia de proteínas que sean capaces de desfosforilar a un péptido que se encuentra previamente fosforilado en un residuo de tirosina (péptido cuya secuencia esta contenida en la proteína pp60^{src}). Se encontró que al agregar concentraciones crecientes de extracto proteico (proteína membranal o soluble, respectivamente), que el porcentaje del péptido fosforilado disminuye de acuerdo a la concentración de proteína (ver fig 1 del artículo). Este resultado sugiere la presencia de actividad de PTP en las raíces transformadas de *C. roseus*. Asimismo, se observó que la actividad de PTPs encontrada en *C. roseus* por desfosforilación del fosfopéptido, se incrementó a concentraciones crecientes de β -mercaptoetanol. Esto sugiere que la actividad de PTP fue estimulada por β -mercaptoetanol. Esta actividad de PTP además, fue inhibida en presencia de

ortovanadato de sodio (1 mM). Estos resultados sugieren la presencia de PTPs en las raíces transformadas de *C. roseus*.

En los últimos cinco años, han surgido algunos reportes sobre la presencia de PTP en varias especies de plantas. Por ejemplo, se ha reportado la purificación de una enzima de 90 kDa presente en núcleos de *Pisum sativum* con actividad de proteína tirosina fosfatasa (Guo y Roux, 1994). Gellatly *et al.*, (1994) purificaron y caracterizaron una proteína homodimérica con un peso molecular de 100 kDa, que tiene actividad de tirosina fosfatasa. Por otra parte, en *Nicotiana tabacum*, se ha detectado la desfosforilación en tirosina de la proteína p34^{cd02} y por consiguiente su inactivación de esta proteína a causa de la presencia de citocinina (Zhang *et al.*, 1996), lo cual sugiere que las plantas poseen ciertos puntos de regulación similares a los encontrados en otros eucariontes (John *et al.*, 1989).

MODELO PROPUESTO

A la fecha en sistemas vegetales no se conoce con certeza la función que tiene la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina o los procesos biológicos en que se encuentra involucrada esta modificación. Posiblemente las proteínas encontradas en las raíces de *C. roseus*, modificadas en residuos de tirosina, tengan una función importante dentro de la regulación de algunos procesos biológicos, como la diferenciación y desarrollo celular; tal como sucede en células de animales, donde la fosforilación en residuos de tirosina se encuentra involucrada en los procesos de diferenciación y desarrollo celular (Sun y Tonks, 1994; Faumen y Saper, 1996). Esto nos plantea un modelo sencillo en donde se esquematiza la participación de las proteínas fosforiladas en tirosina (la proteína soluble de 63 kDa y la proteína membranal de 40 kDa), las cuales son proteínas que su modificación por fosforilación, posiblemente esta regulando la transmisión de la señal para dar lugar a un proceso de diferenciación y desarrollo celular, tal como se muestra en la figura 9. Posiblemente estas proteínas fosforiladas en tirosina se activen a partir de una señal extracelular la cual es captada por una proteína receptora en la membrana celular, los cual es posible ya que en células de plantas se han encontrado moléculas receptoras, como son los RLKs y el receptor para el etileno.

Esto indica, que las plantas poseen mecanismos de comunicación similares al de células animales; apoyando el hecho de la posibilidad de encontrar proteínas receptoras en las raíces transformadas de *C. roseus*. Una vez que estos receptores son activados, posiblemente el flujo de comunicación se encuentra regulado a través de la presencia de proteínas que se modifican por fosforilación; algunas de estas proteínas serian las proteínas de 63 y 40 kDa, las cuales son proteínas que tienen la característica de autofosforilarse en residuos de tirosina. Posiblemente exista un flujo de comunicación entre la proteína de 63 kDa y la proteína de 40 kDa. Tal vez, la proteína de 40 kDa es una MAP cinasa, debido a que se fosforila en residuos de tirosina y de presentar un peso molecular similar a las MAP cinasas identificadas en células de animales. En células de animales las MAP cinasas al ser activadas por fosforilación, tienden a translocar al núcleo con el fin de hallar sus sustratos. Esto nos permite sugerir que nuestra proteína posiblemente se localiza en las membranas

nucleares, lo cual le permitiría a ella fosforilar diferentes proteínas implicadas en los procesos de diferenciación y desarrollo celular.

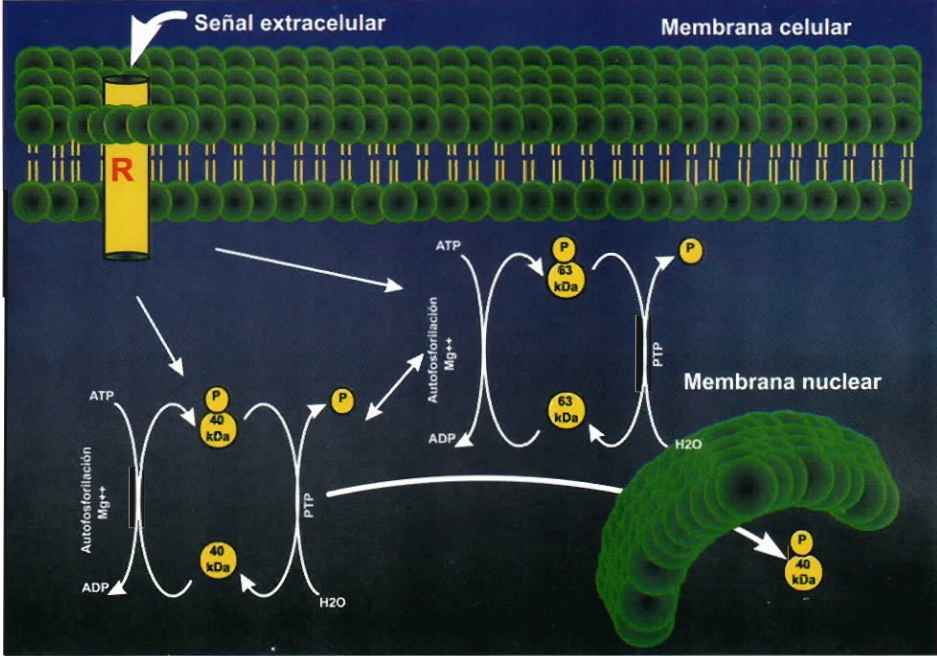


Figura 9. Modelo de activación de la proteína soluble de 63 kDa y la proteína membranosa de 40 kDa de las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

Cuadro 4. Resumen general de los resultados, utilizando diferentes métodos bioquímicos para comprobar la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. [γ - ^{32}P]ATP, fosforilación *in vitro* con ATP marcado; KOH, hidrolisis alcalina; α PY, inmunodetección; α PY + PY, experimento de competencia; *in situ*, fosforilación *in situ*.

FRACCION MEMBRANAL						FRACCION CITOSOLICA					
kDa	[^{32}P]y ATP	KOH	α PY	α PY + PY	<i>in situ</i>	kDa	[^{32}P]y ATP	KOH	α PY	α PY + PY	<i>in situ</i>
173	----		----			116	---		---		
142	----					112	----				
117	----					103	----		----		
95	----					89	----				
87	----					78	----				
82	----					77	----				
74	----					72	---				----
68	----					68	----				
62	----					63	----	----	----		----
57	----					52	----				
55	----	----	----			47	----		----		----
52	----					43	----		----		----
47	----					37	----				----
40	----	----	----		----						
35	----				----						
25	----	----									
18	----	----									
10	----	----									

REFERENCIAS

- Bernasconi P.** (1996) Effect of synthetic and natural protein tyrosine kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini (*Cucurbita pepo*) hypocotyls. *Physiol. Plant* **96**: 205-210.
- Dadssi M. y A.J. Cozzone** (1990) Evidence of protein-tyrosine kinase activity in bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Biol. Chem.* **265**: 20996-20999.
- Decroocq-Ferrant V., S. Decroocq, J. Van, E. Schmidt y M. Kreis** (1995) A homologue of MAP/ERK family kinase genes is expressed in vegetative and female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* **27**: 339-350.
- Duerr B., M. Gawienowski, T. Ropp y T. Jacobs** (1993) MsERK1: A mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* **5**: 87-96.
- Fauman E.B. y M.A. Saper** (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochem. Sci.* **21**: 413-417.
- Gellatly K.S., G.B.G. Moorhead, S.M.G. Duff, D.D. Lefebvre y W.C. Plaxton** (1994) Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. *Plant Physiol.* **106**: 223-232.
- Guo Y.L. y S.J. Roux** (1994) Characterization of two protein phosphatases from pea nuclei. *Plant Physiol.* **107**: 167-175.
- Håkansson G. y J.F. Allen** (1995) Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signalling. *FEBS Lett.* **372**: 238-242.
- Hirt H.** (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Sci.* **2**: 11-15.
- Hunter T.** (1989) Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues. *Curr. Opin. in Cell Biol.* **1**: 1168-1181.
- Hunter T.** (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**: 225-236.
- John P.C.L., F.J. Sek y M.G. Lee** (1989) A homologue of cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the cell division cycle of *Chlamydomonas* and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1**: 1185-1193.
- Jonak C., A. Páy, L. Bögre, H. Hirt y E. Heberle-Bors** (1993) The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. *Plant J.* **3**: 611-617.
- Knight J.B., K. Yamauchi y J.E. Pessin** (1995) Divergent insulin and platelet-derived growth factor regulation of focal adhesion kinase (pp125^{FAK}) tyrosine phosphorylation, and rearrangement of actin stress fibers. *J. Biol. Chem.* **270**: 10199-10203.
- Leduc I. y S. Meloche** (1995) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 4401-4404.
- Mizoguchi T., Y. Gotoh, E. Nishida, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida, T. Iwasaki, H. Kamada y K. Shinozaki** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* **5**: 111-122.

- Nesterov A., R. C. Kurten y G. N. Gill (1995) Association of epidermal growth factor receptor with coated pit adaptins via a tyrosine phosphorylation-regulated mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**: 6320-6327.
- Ojaniemi M., S.S. Martin, F. Dolfi, J. M. Olesky y K. Vuori (1997) The proto-oncogene product p120^{cas} links c-Src and phosphatidylinositol 3-kinase to the integrin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **272**: 3780-3787.
- Seger R. y E. Krebs (1995) The MAPK signaling cascade. *The FASEB J.* **9**: 726-735.
- Stanner J., P. S. Kabouridis, K.L. McGuire y C.D. Tsoukas (1995) Interaction between G proteins and tyrosine kinases upon T cell receptor Cd3-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **270**: 30635-30642.
- Sun H. y N.K. Tonks (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatase and kinases in cell signaling. *Trends in Biochem. Sci.* **19**: 480-485.
- Suzuki R. y H. Shinshi (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* **7**: 639-647.
- Torruella M., L.M. Casano y R.H. Vallejos (1986) Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and the presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets. *J. Biol. Chem.* **261**: 6651-6653.
- Trojanek J., P. Ek, J. Scoble, G. Muszynska y L. Engström (1996). Phosphorylation of plant and identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedling. *Eur. J. Biochem.* **235**: 338-344.
- Uchida T., T. Matozaki, T. Noguchi, T. Yamao, K. Horita, T. Suzuki, Y. Fujioka, C. Sakamoto y M. Kasuga (1994) Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr⁵³⁸ and catalytic activity of PTP 1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J. Biol. Chem.* **269**: 12220-12228.
- Vallejos R.H., L. Holuigue, H.A. Lucero y M. Torruella (1985) Evidence of tyrosine kinase activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **126**: 685-691.
- Van der Geer P., S. Wiley, G.D. Gish, V. K.-M. Lai, R. Stephens, M.F. White, D. Kaplan y T. Pawson (1996) Identification of residues that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 963-968.
- Verhey S., J.C. Gaiser y T.L. Lomax (1993) Protein kinases in zucchini: characterization of calcium-requiring plasma membrane kinases. *Plant Physiol.* **103**: 413-419
- Warner K.M. y G.S. Bullerjahn (1994) Light-dependent tyrosine phosphorylation in the cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica*. *Plant Physiol.* **105**: 629-633
- Zhang K., D.S. Letham y P.C.L. John (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta* **200**: 2-12.

CAPITULO 10

Conclusiones generales

En el presente trabajo se planteó estudiar la presencia de proteína tirosina cinasas y proteína tirosina fosfatasa en las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. En base a los resultados obtenidos en las raíces transformadas de *C. roseus* se concluye los siguientes incisos:

A) Presencia de varias proteínas que tienen la característica de fosforilarse *in vitro* con [³²P]γ-ATP en diversos residuos de aminoácidos.

B) Detección de varias proteínas que fueron modificadas covalentemente con [³²P]γ-ATP (las proteínas membranales de 10, 18, 25, 40 y 55 kDa y una proteína citosólica de 63 kDa). Estas proteínas su fosforilación fue resistente al tratamiento alcalino. Resultado que sugiere que estas proteínas se fosforilan en residuos de tirosina.

C) Inmunodetección de varias proteínas (las proteínas membranales de 40 y 55 kDa y la proteína citosólica de 63 kDa) por anticuerpos monoclonales específicos contra fosfotirosina. Resultado que indica que las proteínas de 40, 55 y 63 se fosforilan en residuos de tirosina.

D) Detección de una proteína membranar de 40 kDa y una proteína citosólica de 63 kDa que posiblemente sean PTKs. Resultado que se obtuvo por la técnica de fosforilación *in situ*.

E) Presencia de actividad de PTK en el extracto membranar y en el citosólico al utilizar un sustrato e inhibidor competitivo específico de PTKs.

F) Detección de dos proteínas citosólica de 43 y 63 kDa que posiblemente sean sustratos de PTPs citosólicas. Tal resultado se obtuvo al realizar experimentos de dosis-respuesta con ortovanadato de sodio, inhibidor específico de PTP.

G) Presencia de actividad de PTP en el extracto membranar y en el citosólico al utilizar un sustrato que contiene un residuo de tirosina fosforilado. Esta actividad de PTP se inhibió a concentraciones crecientes de ortovanadato de sodio. Asimismo, la actividad de PTP se estimuló a concentraciones crecientes de β-mercaptoetanol.

En resumen los resultados presentados en este estudio indican la presencia de actividad de proteína tirosina cinasas y proteína tirosina fosfatasa en las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

CAPITULO 11

Perspectivas generales

En células de animales, el número y la diversidad de PTKs ha aumentado en los últimos años debido a los esfuerzos por determinar la funcionalidad de estas proteínas. Muchos de estos estudios han indicado que las proteína tirosina cinasas y las proteína tirosina fosfatasas se pueden clasificar en grupos por la similitud en sus secuencias de aminoácidos; como también que se encuentran regulando diferentes mecanismos de transducción.

Existen pocos estudios en las plantas referentes a la caracterización bioquímica y molecular de las proteína tirosina cinasas y fosfatasas por lo cual no se conoce si estas enzimas regulan algún proceso bioquímico importante en las plantas. En las raíces transformadas de *C. roseus* hemos identificado dos proteínas (la proteína soluble de 63 kDa y la proteína membranal de 43 kDa) que se caracterizan por fosforilarse en residuos de tirosina. Sin embargo, no sabemos si estas proteínas tienen características similares a las proteínas descritas en algún mecanismo de transducción y, por consiguiente, en que proceso bioquímico o de regulación estuvieran involucradas. Por lo tanto, se proponen las siguientes alternativas para continuar los estudios bioquímicos y moleculares de estas proteínas:

1. Purificación y secuenciación de aminoácidos de las proteínas de 40 y 63 kDa

La purificación de las proteínas cinasas de 40 y 63 kDa, se realizaría por métodos bioquímicos convencionales (cromatografías en columnas de filtración en gel, intercambio iónico, etc). Una vez purificadas estas proteínas, proseguiríamos con su microsecuenciación. Posteriormente, dichas secuencias de aminoácidos se compararían con las secuencias de otras proteínas reportadas y el resultado ayudaría a clasificar a estas proteínas cinasas. Esto permitiría emitir una hipótesis sobre la posible participación de cada una de ellas en algún mecanismo de transducción. Asimismo, a partir de la microsecuenciación, se obtendrían anticuerpos monoclonales específicos contra las proteínas de 40 y 63 kDa. Con estos anticuerpos se podría monitorear a estas proteínas *in vitro* e *in vivo*, y por lo tanto determinar los cambios de su fosforilación en relación a algún factor externo o interno.

2. Clonación de los genes de las proteínas de 40 y 63 kDa

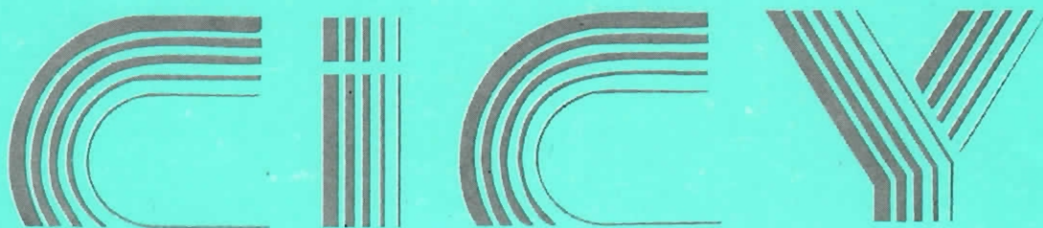
La clonación de genes ha permitido conocer y caracterizar la secuencia de nucleótidos de diversos genes en sistemas vegetales; por lo cual, una alternativa planteada sería la clonación de los genes de las proteínas de 40 y 63 kDa.

En base al conocimiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas purificadas de 40 y 63 kDa, se diseñarían oligonucleótidos degenerados en regiones altamente conservadas de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de 40 y 63 kDa. Posteriormente, estos oligonucleótidos degenerados y ADN genómico, se utilizarían para obtener diferentes amplificaciones (fragmentos) de los genes que codifican para estas proteínas, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos fragmentos se separarían por peso molecular en geles de agarosa, con el fin de comprobar si el peso molecular del fragmento (s) es aproximado

con el peso molecular de las proteínas de 40 y 63 kDa. Los fragmentos con el peso molecular esperado, serían clonados en un vector bacteriano, para posteriormente realizar la secuenciación de los fragmentos, con el fin de comprobar la presencia de los genes que codifican para las proteínas de 40 y 63 kDa. Al obtenerse las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para estas proteínas, se procedería a utilizarla como sonda para aislar los genes que codifican para las proteínas de 40 y 63 kDa, a partir de un banco cADN o genómico. Posteriormente, los genes se podrían caracterizar y clonar en un vector de expresión para *Agrobacterium rhizogenes*. Una vez que los vectores se hayan introducido en las bacterias; las bacterias se utilizarían para retransformar las raíces de *C. roseus*.

3. Silenciamiento génico de las proteínas de 40 y 63 kDa inducido por ARN antisentido

El silenciamiento génico inducido por ARN antisentido ha sido muy útil en la caracterización de las funciones celulares de algunos productos génicos. Esta estrategia sugeriría si las proteínas de 40 y 63 kDa se encuentran involucradas en algún proceso biológico; como posiblemente sean los procesos de desarrollo y diferenciación celular. Esto podría ser posible, ya que existe evidencia en células de animales, que la fosforilación en residuos de tirosina se encuentra involucrada en los procesos de diferenciación y desarrollo celular. En este punto se utilizarían los genes clonados en antisentido. Estos genes clonados en antisentido se introducirían al vector de *Agrobacterium rhizogenes* para retransformar las raíces de *C. roseus* y así determinar el efecto fenotípico producido en las raíces transformadas.



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.

Ex-hacienda Xcumpich
Antigua carretera a Progreso Km. 7
Apartado Postal 87 C.P. 97310
Cordemex, Yucatán