



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Aislamiento, clonación y expresión del gen de la
amidohidrolasa IAR3 de *Coffea canephora***

Tesis que presenta

Osvaldo Jhosimar Couoh Dzul

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **Aislamiento, clonación y expresión del gen de la amidohidrolasa IAR3 de *Coffea canephora***, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 22 marzo del 2017.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: Osvaldo Jhosimar Couoh Dzul

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado Determinación de la función de la interacción entre auxinas y citocininas en la inducción de la embriogénesis somática bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y con financiamiento del CONACyT, número 257436.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por el apoyo académico en mi formación y otorgarme una visión distinta de la ciencia.

A mi comité tutorial y revisor por sus amables recomendaciones en este trabajo.

Al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro (Langenio-cinvestav) por haberme permitido realizar mi estancia en su laboratorio para terminar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna por su amable donación del plásmido pET15B y sus recomendaciones sobre el arte de la clonación.

A la Dra. Erika Mellado Mojica por su apoyo técnico y científico durante el desarrollo de esta tesis.

A la M en C. Rosa María Galaz Avalos por su enseñanza en el cultivo de tejidos.

Al Biol. Luis Fernando Arroyo Navarro (Langebio-cinvestav) por su apoyo técnico en la purificación de proteínas.

A Conacyt por el apoyo económico otorgado en los dos años de maestría. Número de becario: **644399**

A mis amigos y compañeros de CICY que de algún modo u otro me apoyaron en esta travesía.

DEDICATORIAS

A mis padres Wilberth y Elda por darme la vida, hacer de vida una feliz travesía desde mi niñez hasta mi etapa adulta actual. Por esforzarse todos y cada uno de los días en darme una educación de calidad y sobre todo darme su confianza.

A Laura porque además de ser mi hermanita siempre has sido mi amiga incondicional y mi compañerita de travesuras. Pero más que nada por hacerme sentir lo que es tener un hermano.

A mi hermanito Miguel por llenar de alegría mi vida y ayudarme siempre a sacar el niño que llevo dentro.

A Lizzie por ser la amiga que siempre quise. “No sabes cómo yo valoro tu sencillo coraje de quererme” Mario Benedetti

”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	5
ANTECEDENTES	5
1.1 EL CAFETO.....	5
1.2 EMBRIOGENESIS SOMATICA.....	6
1.2.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA E INDIRECTA.	7
1.2.2 EL ORIGEN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO.....	7
1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CAFÉ	9
1.4 AUXINAS	9
1.4.1 BIOSÍNTESIS	11
1.4.2 CONJUGACIÓN Y ALMACENAMIENTO	14
1.4.3 CONJUGACIÓN Y DEGRADACIÓN	16
1.5 AMIDOHIDROLASAS.....	18
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
JUSTIFICACIÓN	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
CAPÍTULO II.....	24
AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA IAR3	24

2.1	INTRODUCCIÓN.....	24
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.2.1	MATERIAL VEGETAL	24
2.2.2	VECTORES.....	24
2.2.3	INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	26
2.2.4	DISEÑO DE CEBADORES	27
2.2.5	EXTRACCIÓN DEL ARN.....	27
2.2.6	SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO POR RT-PCR.....	28
2.2.7	BÚSQUEDA DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE AMPLIFICACIÓN.....	28
2.2.8	AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DE <i>CcIAR3</i> POR PCR	29
2.2.9	PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	29
2.2.10	CLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE <i>CcIAR3</i>	30
2.2.11	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA.....	31
2.2.12	SUBCLONACIÓN DE <i>CcIAR3</i> AL VECTOR DE EXPRESIÓN pET15B.....	31
2.2.13	CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR OBTENIDO CON <i>PFU</i> AL VECTOR DE EXPRESIÓN PET15B.....	32
2.2.14	SECUENCIACIÓN DE LAS CONTRUCCIONES OBTENIDAS CON PETIAR3.....	33
2.2.15	ANÁLISIS DE LA SECUECIA DE AMINOÁCIDOS.....	34
2.2.16	EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE IAR3 CON COLA DE HISTIDINAS	34
2.2.17	WESTERN BLOT	35

CAPÍTULO III.....	39
3.1 RESULTADOS	39
3.1.1 DISEÑO DE CEBADORES	39
3.1.2 TEMPERATURA ÓPTIMA DE AMPLIFICACIÓN	40
3.1.3 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DE <i>CcIAR3</i>	42
3.1.4 CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE <i>CcIAR3</i> ..	43
3.1.5 CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR AMPLIFICADO CON <i>PFU</i>	44
3.1.6 SECUENCIACIÓN.....	46
3.1.7 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	48
3.1.8 OBTENCIÓN DE LA PROTEINA RECOMBINANTE His-IAR3	50
3.3 DISCUSIÓN.....	58
CAPÍTULO IV	63
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
4.1 CONCLUSIONES.....	63
4.2 PERSPECTIVAS	63
BIBLIOGRAFÍA.....	65

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 El cafeto	5
Figura 1.2 Embriogénesis somática directa e indirecta. Puede ser tanto por vía unicelular como pluricelular (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).	8
Figura 1.3 Auxinas naturales y análogas de auxina. (A) Ácido indol-3-acético (AIA), ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA), ácido indol-3- butírico (IBA), ácido fenilacético (PAA). (B) Ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-ticlorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloran).....	11
Figura 1.4 Rutas de biosíntesis del AIA. Las flechas azules muestran las rutas que son dependientes del triptofano y la flechas rojas muestran la única ruta que no es dependiente de triptofano. Las flechas sólidas son conversiones ya elucidados mientras que las flechas punteadas son pasos desconocidos (Wang et al., 2015).....	14
Figura 1.5 Principales formas de conjugación del AIA. Los conjugados del AIA son formados por la familia de enzimas amidosintetasas (GH3) e hidrolizados por la familia de enzimas amidohidrolasas (ILR).....	16
Figura 1.6 Formas de inactivación del AIA. El AIA puede formar conjugados con diversos aminoácidos que no pueden ser hidrolizados, algunos de estos conjugados pueden ser llevados hacia rutas oxidativas.	17
Figura 1.7 Estrategia experimental.....	23
Figura 2.1 Mapa del plásmido pGEM®-T. Este plásmido tiene un tamaño de 3000 pares de bases.	25
Figura 2.2 Mapa del plásmido pET15b. Este vector tiene un tamaño de 5,708 pares de bases. Dentro del sitio múltiple de clonación se encuentran las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción NdeI y BamHI.....	26

Cuadro 3.1 Nombre, secuencia y Tm de los cebadores diseñados.	39
Figura 3.1 Mapa del gen IAR3 y los sitios de restricción encontrados. No contiene sitios de restricciones similares a los que se incorporaron a los cebadores utilizados.	40
Figura 3.2 Gradiente de temperatura de dos grados. El gradiente de temperatura se llevó a cabo de acuerdo a la temperatura de alineamiento teórica de los cebadores diseñados. La banda amplificada fue de 1185 pb.	41
Figura 3.3 Gradiente de temperatura de 6 grados. La banda perteneciente al gen amplificado se intensificaba a medida que la temperatura de alineamiento disminuía.	41
Figura 3.4 Ultimo gradiente que se llevó a cabo para buscar la temperatura de alineamiento adecuada para la amplificación óptima de CclAR3.	42
Figura 3.5 Amplificación del gen completo de <i>CclAR3</i> con las condiciones óptimas. Gel de agarosa 0.8%, 80 V, 45 min.	43
Figura 3.6 Clonas obtenidas del proceso de transformación con el producto de ligación de pGEM-T y CclAR3. Las clonas positivas fueron las que contenían el inserto después de ser digeridos con NdeI y BamHI en los carriles 1, 2, 4, 5 y 8.	43
Figura 3.7 Clonas positivas tras ser digeridas con las enzimas de restricción NdeI y BamHI.	44
Figura 3.8 Clonas positivas tras ser digeridas con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Carriles 2, 4 y 6 plásmidos superenrollados de las clonas obtenidas; carriles 3, 5 y 7 plásmidos linearizados e insertos liberados tras la digestión.	45
Figura 3.9 Comprobación por PCR de la orientación correcta del inserto. a) Gel de electroforesis de ADN en agarosa 1% (p/v), carriles 3, 4 y 5 bandas positivas obtenidas de las clonas; carriles 2 y 6, testigos a partir de ADNc y a partir de PET15b vacío respectivamente; carril 1, marcador molecular de 1Kb. b) Mapa del plásmido obtenido y los cebadores usados. Las flechas encerradas en verde muestran los cebadores usados	

(FwCclAR3 y T7 terminador) para comprobar la orientación; “FwCclAR3” y “RvCclAR3” son los cebadores específicos usados para amplificar el testigo positivo a partir de ADNc; T7 promotor y T7 terminador son los cebadores universales usados para amplificar el testigo de pET15b vacío. 45

Figura 3.10 Alineamiento de la secuencia pETIAR3-10 obtenida tras la secuenciación y la secuencia depositada en la base de datos de café. El iniciador usado en la secuenciación fue el cebador universal T7 promotor..... 47

Figura 3.11 Alineamiento de la secuencia pETIAR3-10 obtenida tras la secuenciación y la secuencia complementaria de *CclAR3* de café. El iniciador usado en la secuenciación fue el cebador universal T7 terminador..... 48

Cuadro 3.2 Tamaño en nucleótidos y aminoácidos de la familia de amidohidrolasas presentes en café. 49

Figura 3.12 Alineamiento de aminoácidos de la proteína IAR3 con otras secuencias homologas. Los aminoácidos señalados con la cuña roja son los aminoácidos que en teoría están involucrados en la coordinación de iones divalentes, mientras que los aminoácidos señalados con las cuñas verdes son los que están involucrados directamente en la catálisis según el consenso. 50

Figura 3.13 Expresión y purificación de la proteína recombinante CclAR3 usando *E. coli* BL21/pKJE7. Carriles 1-5, son fracción insoluble, fracción soluble, fracción no unida a la columna, tercer lavado con 40 mM de imidazol y la elución con 500 mM de imidazol en ese orden, pertenecientes a la purificación de CclAR3-3. Carriles 6-9, son fracción insoluble, fracción soluble, fracción no unida a la columna y la elución con 500 mM de imidazol pertenecientes a la purificación de CclAR3-10..... 51

Figura 3.14 Expresión y purificación de la proteína recombinante CclAR3 con la cepa Roseta 2. A) fracciones correspondientes a purificación de CclAR3-3. Carril 1, marcador molecular; carriles 2, 3 y 4, fracciones insoluble, soluble y no unida a la columna, respectivamente; carriles 5, 6 y 7 lavado con 5, 20 y 40 mM de imidazol; carril 8, elución con 500 mM de imidazol. B) fracciones correspondientes a la purificación de CclAR3-10.

Carril 1, marcador molecular; carriles 2, 3 y 4, fracciones insoluble, soluble y no unida a la columna respectivamente; carriles 5, 6 y 7 lavado con 5, 20 y 40 mM de imidazol; carril 8, elución con 500 mM de imidazol..... 52

Figura 3.15 Purificación de la proteína recombinante CclAR3 a partir de la fracción insoluble expresada con la cepa Rosetta 2. **a)** Agregados proteicos solubilizados con urea y tritón X-100. Carril 1, marcador molecular; carriles 2 y 3, agregados proteicos pertenecientes a CclAR3-3 e CclAR3-10 respectivamente tratados con urea 7 M y tritón X-100 0.1%. **b)** Purificación de CclAR3-3 e CclAR3-10 después del tratamiento de las fracciones insolubles con urea 7 M y Tritón X-100. Carril 1, marcador molecular; carril 2, fracción insoluble de CclAR3-3 tratado con urea y Tritón X-100; carril 3, fracción de CclAR3-3 no unida a la columna; carriles 4 y 5, lavados con 20 y 40 mM de imidazol respectivamente; carril 6, elución de la proteína recombinantes CclAR3-3 con 500 mM de imidazol. carril 7, fracción insoluble de CclAR3-10 tratado con urea y tritón X-100; carril 8, fracción de CclAR3-10 no unida a la columna; carriles 9 y 10, lavados con 20 y 40 mM de imidazol respectivamente; carril 11, elución de la proteína recombinantes CclAR3-10 con 500 mM de imidazol..... 53

Figura 3.16 Análisis de corroboración de la proteína recombinante por Western blot. **a)** SDS-PAGE de tres proteínas puras. Carril 1, marcador molecular; carril 2, proteína His-CclAR3-3 pura; carril 3, proteína His-TIM (Triosa fosfato isomerasa); carril 4, TIM sin cola de histidinas. **b)** Western blot del gel anterior. Carril 1, His-CclAR3-3 (positivo); carril 2, His-TIM (positivo); carril 3, TIM sin cola de histidinas (negativo)..... 54

Figura 3.17 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CclAR3-3 recombinante vs CclAR3 del genoma. Los signos (*) muestran los aminoácidos similares y los signos (:) muestran los aminoácidos que no coinciden con el alineamiento. En el alineamiento se muestran dos cambios de aminoácidos. 56

Figura 3.18 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CclAR3-10 recombinante vs CclAR3 del genoma. Los signos (*) muestran los aminoácidos similares y los signos (:) muestran los aminoácidos que no coinciden con el alineamiento. En el alineamiento se muestra un solo cambio de aminoácidos, sin embargo, la secuencia de CclAR3-10

permanece incompleta con respecto a CclAR3. 57

Figura 3.19 Panorama general del posible metabolismo de AIA dentro de la célula en *C. canephora*. Este diagrama toma en cuenta las enzimas TAA1 y YUCCA de la biosíntesis de AIA; las hidrolasas de AIA ILR1, ILL1, ILL2, 1LL5 e 1LL6; las amidosintetasas GH3; y a PIN5 un transportador de AIA. Además del AIA libre también se observa intermediarios de la ruta de biosíntesis de AIA y varios de sus conjugados. 60

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 3.1 Nombre, secuencia y Tm de los cebadores diseñados 39

Cuadro 3.2 Tamaño en nucleótidos y aminoácidos de la familia de amidohidrolasas presentes en café. 49

ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalén-1-acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIA	Ácido indol-3-acético
AIA-Ala	Ácido indol-3-acético-alanina
AIA-Asp	Ácido indol-3-acético-ácido aspártico
AIA-Glu	Ácido indol-3-acético-ácido glutámico
AIA-Leu	Ácido indol-3-acético-leucina
AIA-Trp	Ácido indol-3-acético-triptofano
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIB-Ala	Ácido indol-3-butírico-alanina
AIP	Ácido indol-3-pirúvico
ARN	Ácido ribonucleico
BA	Benciladenina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CI-IAA	Ácido 4-cloroindol 3-acético
ES	Embriogénesis somática
ESD	Embriogénesis somática directa
ESI	Embriogénesis somática indirecta
EST	Expressed Sequence Tag
GH3	Gretchen Hagen-3
IAOx	Indol-3- acetaldoxima
IAR3	Indol 3-acetic acid alanine resistant
IAM	Indol acetamida
IAN	Indol acetonitrilo
ILL1	Indol 3-acetic acid leucine resistant like-1
ILL2	Indol 3-acetic acid leucine resistant-like-2
ILL3	Indol 3-acetic acid leucine-resistant-like-3
ILL5	Indol 3-acetic acid leucine-resistant-like-5
ILR1	Indol 3-acetic acid leucine-resistant 1
IPA	Ácido indol 3-pirúvico
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
IGP	Indol 3-glicerol fosfato
KIN	Cinetina
MS	Murashige & Skoog
PAA	Ácido fenilacético
PCR	Polymerase Chain Reaction

PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
rpm	Revoluciones por minuto
TAM	Triptamida

RESUMEN

El 95% de todo el ácido índol-3-acético (AIA) disponible en la planta, principal responsable de la embriogénesis somática (ES), se encuentra en forma conjugada con aminoácidos, azúcares y proteínas, y solo una pequeña cantidad está en forma activa. Se sabe que la planta puede cambiar rápidamente la concentración del AIA respondiendo a diversos estímulos. El mecanismo por el que la planta logra abastecerse rápidamente de auxina activa se logra mediante la hidrólisis de estos conjugados. En este trabajo se aisló el gen *CcIAR3* de *Coffea canephora* a partir de ADN complementario, el cual codifica para una amidohidrolasa IAR3 que libera AIA de sus conjugados. Este gen fue clonado en el vector pET15B, se expresó en dos diferentes cepas de bacterias y la proteína obtenida se purificó en una columna de afinidad. Su presencia se corroboró con un análisis de Western blot. Adicionalmente, un análisis *in silico* reveló las secuencias consenso que están involucradas en la catálisis y se encontró que esta proteína tiene una secuencia K/HDEL en su extremo carboxilo terminal, la cual se encuentra conservada en varias proteínas propias del lumen del retículo endoplásmico, lo que sugiere que esta proteína pueda estar localizada en dicho organelo.

ABSTRACT

Ninty-five percentage of all the indole-3-acetic acid (AIA) available in the plant, the main responsible for somatic embryogenesis (ES), is conjugated to amino acids, sugars, and proteins, and only a small amount is in active form. It is known that the plant can rapidly change the concentration of AIA in response to various stimuli. The mechanism by which the plant succeeds in rapidly supplying active auxin is achieved by the hydrolysis of these conjugates. In this work, the *CclAR3* gene of *Coffea canephora* was isolated from complementary DNA which encode an IAR3 amidohydrolase that release free IAA from yours conjugates; cloning was performed in pET15B, expressed in two different bacterial strains and the protein obtained was purified on an affinity column. Their presence was corroborated by Western blot analysis. Also, an *in silico* analysis revealed the consensus sequences that are involved in the catalysis. This protein, at its carboxy terminal end, has a K/HDEL sequence. This sequence is conserved in several proteins of the lumen of the endoplasmic reticulum, which suggests that this protein may be located in this organelle.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática (ES) es el proceso por el cual células somáticas, bajo condiciones de inducción, pasan por una serie de cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos para dar lugar a células embriogénicas y eventualmente a una planta completa (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). Este proceso constituye una característica única y solamente tiene lugar en el reino de las plantas. La ES requiere de la presencia de por lo menos una auxina (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Las auxinas como el ácido-3-indol acético (AIA) están presentes en cada aspecto del desarrollo de la planta, desde la embriogénesis hasta la senescencia (LeClere et al., 2002). Considerando toda la multitud de procesos que la auxina afecta, ésta parece ser un regulador clave en el desarrollo y vida de la planta. De ahí la importancia de un regulamiento sutil en la concentración de auxina y las plantas han desarrollado diversos mecanismos para el control de su homeostasis. La homeostasis de la auxina es el conjunto de ajustes dinámicos y mecanismos continuos de regulación que involucra su biosíntesis, degradación, transporte y formación de conjugados, éstos últimos pueden ser hidrolizados para ser liberados de nuevo como auxina libre (Ludwig-Müller, 2011; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010).

La biosíntesis del AIA puede generarse por cinco rutas, cuatro de los cuales son dependientes del triptofano (Mano y Nemoto, 2012). A pesar que se ha trabajado mucho en este campo aún quedan cosas por descubrir, ya que sólo una de las cinco rutas ha sido elucidada completamente, y todo el proceso es como un rompecabezas en el que muchas de sus piezas siguen perdidas (Ljung, 2013). Aunque la síntesis *de novo* es muy importante para la homeostasis, también es muy importante la formación de conjugados y su posterior hidrólisis. En las plantas superiores existen tres formas principales de conjugación, la formación de conjugados con carbohidratos, con aminoácidos y la formación de conjugados con péptidos o proteínas (Ludwig-Müller, 2011). La formación de conjugados con AIA varía entre plantas pero en el caso de *Arabidopsis*, los conjugados con aminoácidos son los que prevalecen. Los conjugados de AIA con aminoácidos son los mejor entendidos, como por ejemplo los conjugados de leucina, alanina, glutámico y aspártico. Se han estudiado una familia de amidohidrolasas de *Arabidopsis* que pueden degradar eficientemente los conjugados con alanina y leucina. Pero no es el caso con los ácidos glutámico y aspártico (LeClere et al., 2002; Davies et al., 1999; Bartel y Fink,

1995). Sugiriendo que los conjugados de alanina y leucina contribuyen a la liberación de auxina libre. En la ES de *Coffea canephora* se han detectado niveles importantes de conjugados de AIA con alanina y glutámico (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). También se ha detectado la expresión de genes de la familia de amidohidrolasas ILR1 (datos no publicados). Entre éstas se encuentra IAR3, lo que sugiere que esta enzima está contribuyendo importantemente a la liberación de AIA en esta etapa. Sin embargo, aunque los antecedentes muestran evidencia de esta posible acción se ha visto que enzimas homólogos de la misma especie tienen diferencias por el sustrato (Campanella et al., 2003b). Por lo que el objetivo de esta investigación fue aislar, clonar y expresar el gen de *IAR3* hasta obtener la proteína recombinante. Este trabajo sentará las bases en el laboratorio para futuras investigaciones en búsqueda de las diferentes especificidades de esta familia de enzimas a los conjugados de AIA que existen en *C. canephora*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 EL CAFETO

El café es miembro de la familia Rubiaceae y del género *Coffea*. Este género incluye por lo menos 70 especies, pero solo dos son de importancia comercial: *Coffea arabica* L. (Arabica) y *Coffea canephora* Pierre ex Fr. (Canephora o Robusta) (Del Castillo et al., 2009) (Fig. 1.1).



Figura 1.1 El cafeto

El cultivo de café es una de las principales actividades de la que muchos países confían para obtener divisas. Adicionalmente, el café representa una fuente de ingresos para millones de personas en los países productores. Comercialmente solo dos de las más de 70 especies son cultivadas: *Coffea arabica* (Arabica) y *Coffea canephora* (Robusta). Algunas otras especies como *C. liberica*, *C. dewevrei* y *C. racemosa* son solamente producidos para satisfacer el consumo local (Carneiro, 1997).

C. arabica es una planta tetraploide ($2n = 44$), es nativa de las tierras altas del suroeste de Etiopia y fue traída de África tropical e introducida en el continente americano en las

primeras décadas del siglo XVIII. Ha contribuido al desarrollo económico y cultural de los países en donde ha sido cultivada. El café arábigo, que se cultiva en altitudes de 1,000 - 2,000 m, es responsable de cerca del 60% del comercio en el mundo del café. También se produce esta especie en algunos países africanos, como Etiopía y Kenia. Las cualidades económicas de *C. arabica*, junto con su carácter perenne y autógama, ha llevado al desarrollo de plantaciones homogéneas de todo el mundo (Carneiro, 1999).

C. canephora es una planta diploide ($2n = 22$), tiene una muy amplia distribución geográfica, que se extiende desde el oeste de las regiones tropicales y subtropicales centrales del continente africano, de Guinea y Liberia a Sudán y los bosques en Uganda, con una alta concentración de ecotipos en la República Democrática del Congo. *C. canephora* o Robusta, como se le llama comúnmente, crece a baja altura (desde el nivel del mar hasta unos 850 m) y representa el 80% de la producción de café en África. Sin embargo, robusta también se ha cultivado en países americanos y asiáticos (Carneiro, 1999).

Entre estas dos especies, café Arábica ofrece una bebida superior, pero es muy sensible a diferentes plagas (hongos, nematodos e insectos), mientras que el café Robusta produce un café de menor calidad, pero es más resistente a plagas (De los Santos-Briones y Hernández-Sotomayor, 2006).

1.2 EMBRIOGENESIS SOMATICA

La embriogénesis somática es el proceso de desarrollo por el cual células somáticas, bajo condiciones de inducción adecuadas, sufren una restructuración molecular que les permite adoptar el camino embriogénico para generar células embriogénicas. Estas células luego pasan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que dan como resultado la formación de un embrión somático y la regeneración de nuevas plantas (Komamine et al., 2005; Schmidt et al., 1997; Zimmerman, 1993).

Generalmente se ha descrito que la ES temprana involucra células somáticas diferenciadas que adquieren competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas. La iniciación del camino embriogénico está restringida a ciertas células sensibles que tienen el potencial para activar genes que están involucrados en generar células embriogénicas (Quiroz-Figueroa et al., 2002; Nomura y Komamine, 1985). Una

vez que estos genes son activados, un programa de expresión de genes embriogénicos reemplaza el patrón de expresión de genes establecido en el tejido del explante (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). La determinación de los factores físicos y químicos específicos que cambian el destino de las células somáticas hacia el camino embriogénico es un paso clave en la inducción embriogénica (Yang y Zhang, 2010). Se ha propuesto que los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y el estrés juegan un papel central en la mediación de la cascada de transducción de señales que conduce a la reprogramación de la expresión génica, seguido por una serie de divisiones celulares que inducen tanto el crecimiento desorganizado de un callo o el crecimiento polarizado que conduce a la ES (De Jong et al., 1993; Dudits et al., 1991). La activación por respuesta a auxina puede ser un evento clave en la adaptación celular y reprogramación genética, metabólica y fisiológica, que conduce a la competencia embriogénica de las células somáticas vegetales (Yang y Zhang, 2010).

1.2.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA E INDIRECTA.

Hay dos maneras diferentes de inducir la ES: la directa (ESD) y la indirecta (ESI). La ESD se caracteriza cuando una mínima proliferación de tejido desorganizado precede a la formación del embrión, mientras que en la ESI hay una proliferación abundante de callos antes de la formación del embrión (Sharp et al., 1980). Se ha sugerido que en la ESD, las células competentes –proembriogénicas- ya están presentes y la expresión del programa de la embriogénesis depende de las condiciones favorables. Se cree que una mínima reprogramación es requerida para la expresión de la ESD, mientras que en la ESI es necesaria una mayor reprogramación de la célula para la desdiferenciación y adquirir el estado embriogénico (Williams y Maheswaran, 1986). Los principales factores que intervienen en cada caso dependerán de la naturaleza y concentración de los reguladores del crecimiento empleados, la fuente y el estado fisiológico del explante, etc. (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

1.2.2 EL ORIGEN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO.

Los embriones somáticos generalmente se originan de dos maneras: unicelular o multicelular (Fig. 1.2). La cuestión de origen de una sola o múltiples células para los embriones somáticos está directamente relacionada con el comportamiento coordinado de células vecinas como un grupo morfogenético (Yang y Zhang, 2010). Cuando los

embriones tienen un origen unicelular, las divisiones coordinadas de las células son vistas y el embrión a veces está conectado al tejido materno por una estructura tipo suspensor (Williams y Maheswaran, 1986). Los embriones con un origen multicelular, sin embargo, se observan inicialmente como una protuberancia que carece de división celular coordinado y los embriones en contacto con el área basal están típicamente fusionados con el tejido materno (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). Tanto en la ESD como la ESI, los embriones pueden derivar de una sola o varias células (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

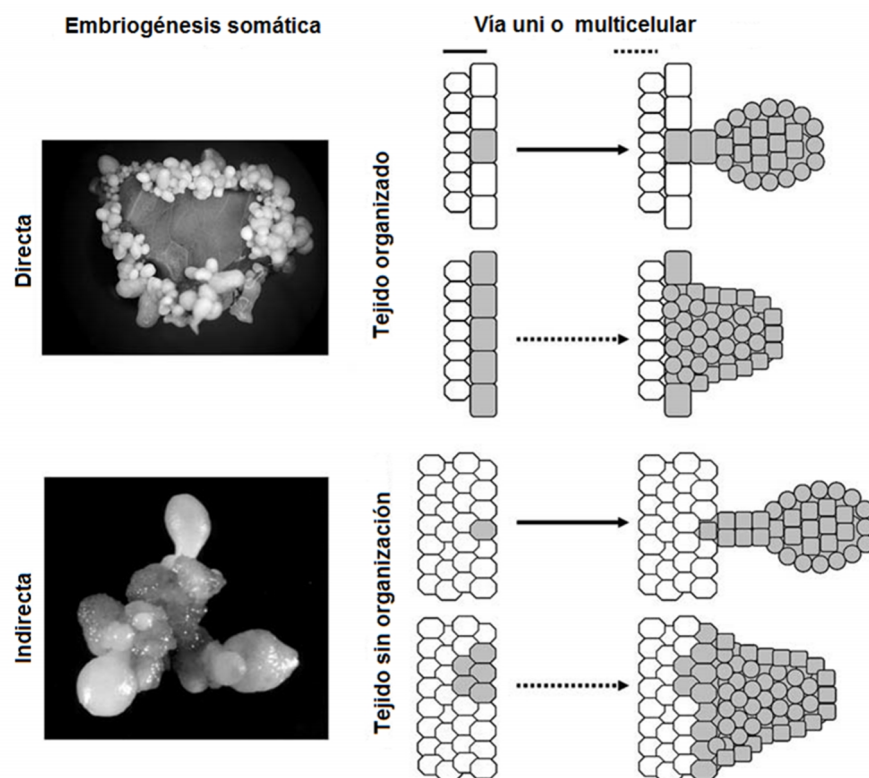


Figura 1.2 Embriogénesis somática directa e indirecta. Puede ser tanto por vía unicelular como pluricelular (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

Las características de la ES la han hecho un modelo para el estudio de eventos moleculares, bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que ocurren durante el inicio y desarrollo de la embriogénesis en plantas superiores. También tiene un alto potencial en aplicaciones biotecnológicas, tales como la producción de semillas artificiales, micropropagación, producción de plantas transgénicas, etc. (Quiroz-Figueroa et al.,

2006a).

1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CAFÉ

El primero en establecer exitosamente la regeneración *in vitro* del café fue Staritsky (Staritsky, 1970), a partir de secciones de tallos de brotes ortotrópicos utilizando el proceso de embriogénesis somática indirecta. El primer señalamiento de regeneración por embriogénesis en *C. arabica*, a partir de secciones de hoja, fue presentado por Söndal y Sharp (Söndahl y Sharp, 1977), encontrándose que a diferencia de otros explantes, las secciones foliares tenían una mayor frecuencia embriogénica (Söndahl et al., 1981). Las hojas más cercanas al ápice de la rama (último par) son las que poseen el mayor potencial embriogénico (Neuenschwander y Baumann, 1992; Söndahl et al., 1981; Söndahl y Sharp, 1977).

Actualmente existe un método para la embriogénesis somática directa en *C. canephora* (Quiroz-Figueroa et al., 2006b), este método es más rápido y eficiente, consiste en pre-acondicionar plántulas de café por 14 días en un medio con ácido naftalén acético (ANA) y cinetina (KIN), para después pasar explantes foliares jóvenes al medio de Yasuda modificado y adicionando 6-benciladenina (BA). Este método, comparado con otros, acorta el tiempo de respuesta para la obtención de embriones de forma sustancial. Recientemente se ha estado estudiado el proceso de ES en café usando este método como un modelo para entender los procesos bioquímicos y moleculares (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Actualmente nuestro grupo trata de entender cuál es la función de las auxinas durante este proceso en el que células diferenciadas pueden reprogramar su potencial embriogénico y generar una planta completa.

1.4 AUXINAS

Las auxinas contribuyen prácticamente en todos los aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la formación del eje embrionario, el desarrollo vascular, la organogénesis post-embriogénica, el fototropismo, el geotropismo, la dominancia apical, la floración, el desarrollo y la maduración del fruto, la respuesta a estrés, la senescencia y la abscisión de frutos y hojas (Ruiz Rosquete et al., 2012; Zhao, 2010; Sundberg y Ostergaard, 2009; Eckardt, 2001). A nivel celular la auxina regula estas múltiples respuestas por una división celular, elongación y diferenciación coordinada (Perrot-Rechenmann, 2010).

Adicionalmente las auxinas juegan un papel muy importante en la ES (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Considerando la multitud de procesos en que ésta afecta, la auxina es un regulador clave en el desarrollo de la planta (Ruiz Rosquete et al., 2012). De ahí se destaca la importancia de una regulación sutil de la concentración de auxina en la escala de órganos, tejidos e incluso células. Para lograr dicha regulación, las plantas han desarrollado diversos mecanismos para el control de la homeostasis de la auxina y la dinámica de su redistribución. Además, varios tejidos presentan distinta sensibilidad a la auxina, esto refleja que la capacidad de respuesta también está fuertemente modulada. La homeostasis de la auxina es el resultado de múltiples ajustes dinámicos y continuos mecanismo de regulación, destinadas a mantener un equilibrio interno bastante estable lo que permite el crecimiento, desarrollo efectivo de la planta y una adaptación a una amplia gama de estímulos ambientales (Tomas y Perrot-Rechenmann, 2010). Los mecanismos que controlan la homeostasis de auxina involucran su biosíntesis, degradación, transporte y formación de conjugados. Estos compuestos pueden más tarde ser hidrolizados para dar auxina libre (Ludwig-Müller, 2011). El IAA es la principal auxina, más encontrada en las plantas (Ruiz Rosquete et al., 2012; Ludwig-Müller, 2011; Tomas y Perrot-Rechenmann, 2010) y por lo tanto la mejor estudiada (Korasick et al., 2013). Aunque también se han identificado varios compuestos auxínicos endógenos tales como el ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA), el ácido índol-3- butírico (IBA) y el ácido fenilacético (PAA) (Simon y Petrásek, 2011; Woodward y Bartel, 2005) (Fig. 1.3). La biosíntesis del IAA, se localiza en las partes aéreas de las plantas, especialmente en las hojas jóvenes en desarrollo y meristemas, de donde son transportados al resto de la planta (Ljung et al., 2001). Sin embargo, la biosíntesis de auxina también se lleva a cabo en otros tejidos, como la región meristemática de raíces primarias o las puntas de raíces laterales emergidas (Ljung et al., 2005).

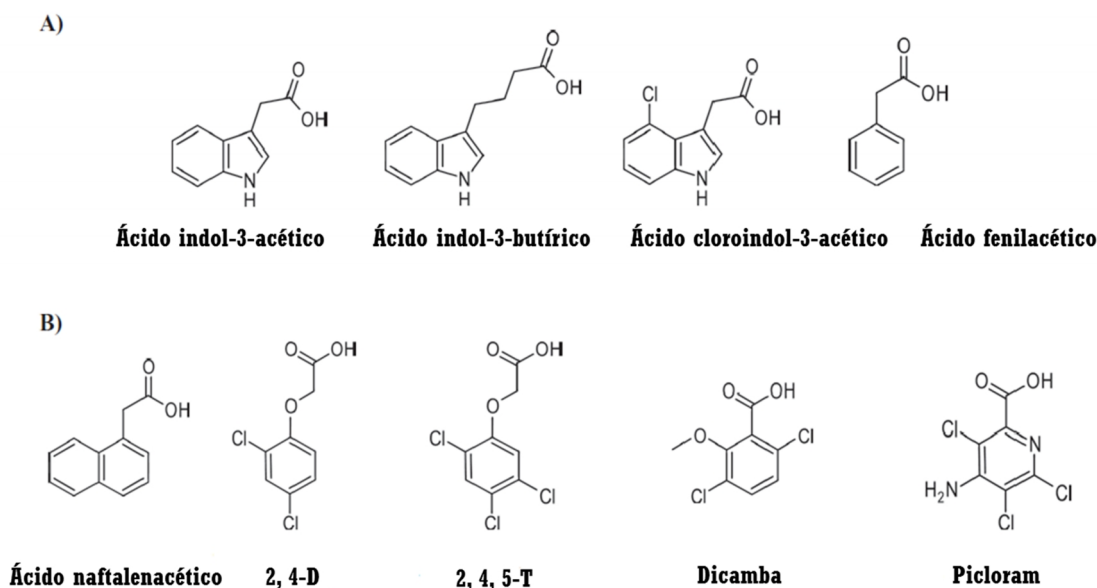


Figura 1.3 Auxinas naturales y análogas de auxina. (A) Ácido indol-3-acético (AIA), ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido fenilacético (PAA). (B) Ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico (picloran).

1.4.1 BIOSÍNTESIS

Se sabe que el AIA es principalmente sintetizado por precursores generados por la vía del shikimato. Esta vía produce precursores para la biosíntesis de diferentes componentes indólicos como aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina), alcaloides y otros metabolitos aromáticos. El triptófano, precursor del AIA, es sintetizado a partir de corismato, el producto final de la vía del shikimato (Ljung, 2013).

La biosíntesis del AIA puede llevarse a cabo por dos grandes rutas: una dependiente de triptofano y la otra independiente del triptofano. A su vez la ruta dependiente del triptofano puede dividirse en cuatro distintas vías que pueden distinguirse entre sí por sus intermediarios, el ácido indol-3-piruvico (IPA), la indol-3-acetamida (IAM), la triptamina (TAM), y el indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Ljung, 2013; Ruiz Rosquete et al., 2012; Mano y

Nemoto, 2012; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010) (Fig. 1.4). En cuanto a la ruta independiente de triptofano existe evidencia de que el AIA deriva del índol-3-glicerol fosfato (IGP) pero los genes y enzimas involucradas en esta ruta aún se desconocen (Ouyang et al., 2000).

En la vía IPA, la conversión de triptofano a AIA ocurre en dos pasos: la TRIPTOFANO AMINOTRANSFERSA DE ARABIDOPSIS (TAA), de la familia de las triptofano aminotransferasas, convierte triptofano a IPA y la YUCCA (YUC), de la familia de las monooxigenasas, convierte IPA a AIA. Si bien originalmente se sugería que operaban en vías separadas, ahora se sabe que la familia de genes *TAA1/TAR* y *YUCCA* actúan en la misma vía biosintética, además existe evidencia tanto genética como bioquímica que sugiere fuertemente que es una de las principales rutas para la biosíntesis de AIA en plantas (Won et al., 2011).

La vía IAM para la biosíntesis de AIA está bien estudiada en bacterias y los genes *IAAM/IAAH* de *Agrobacterium tumefaciens* han sido usados para una sobreproducción transgénica de AIA en diferentes especies de plantas. IAM está presente en muchas plantas, incluyendo *Arabidopsis*, maíz, arroz y tabaco, y las IAM hidrolasas que convierten IAM a AIA se han aislado de *Arabidopsis* y tabaco (Ljung, 2013).

TAM se encuentra en muy bajos niveles, cuando se le compara con las concentraciones de AIA y el triptofano tanto en chícharo como en *Arabidopsis* (Ljung, 2013), y se cree que es el producto de las triptofano descarboxilasas. Es posible que TAM pueda tener la función de precursor, tanto de AIA, como de alcaloides indólicos y serotonina en diferentes especies de plantas (Mano y Nemoto, 2012).

En cuanto en la vía IAOx, las citocromo P450 monooxigenasas CYP79B2 y CYP79B3 convierten triptofano a IAOx (Zhao et al., 2002). IAOx es utilizado para producir componentes de defensa como los indol glucosinolatos o las camalexinas y también es usado para producir AIA. La sobreexpresión de CYP79B2 resulta en un incremento en los niveles de indol glucosinolatos, indol-3-acetonitrilo (IAN) y AIA (Zhao et al., 2002). El IAN es un posible precursor del AIA que proviene de la vía de IAOx, y se ha sugerido que las nitrilasas convierten IAN en AIA tanto en maíz como en *Arabidopsis* (Park et al., 2003).

A pesar que se ha trabajado mucho en este campo, aún queda mucho por descubrir. Todo el proceso es como un rompecabezas y muchas piezas están aún perdidas (Ljung, 2013). La regulación de los niveles de auxina por la síntesis *de novo* es un mecanismo muy importante de homeostasis que operan en las células vegetales, pero los niveles de AIA también pueden ser controlados por la formación de conjugados e hidrólisis de los mismos (Ljung, 2013). En las plantas superiores existen tres formas principales de conjugación, los conjugados mediante enlaces éster con carbohidratos, conjugados con enlaces amida con aminoácidos y conjugados con péptidos y proteínas ligados con enlaces amidas. Las formas conjugadas de auxina generalmente son consideradas inactivas, cualquier actividad de auxina se le atribuye a la hidrólisis del conjugado tras la liberación del AIA (Korasick et al., 2013; Ludwig-Müller, 2011). La composición de conjugados con AIA varía entre las especies de plantas. Los conjugados más comunes en *A. thaliana* son AIA-alanina (AIA-Ala), AIA-leucina (AIA-Leu), AIA-aspártico (AIA-Asp), AIA-glutámico (AIA-Glu), AIA-glucosa, y conjugados con péptidos y proteínas (Ruiz Rosquete et al., 2012; Bajguz y Piotrowska, 2009; Seidel et al., 2006). En maíz los conjugados de azúcares con enlaces éster son los que prevalecen (Korasick et al., 2013).

Otra fuente es el ácido indol-3-butírico (AIB) que puede proveer AIA libre tras su hidrólisis o β -oxidación. Se han propuesto funciones para estos conjugados que incluye el almacenamiento, transporte, compartimentalización, destoxificación de exceso de AIA, y protección contra degradación peroxidativa (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010).

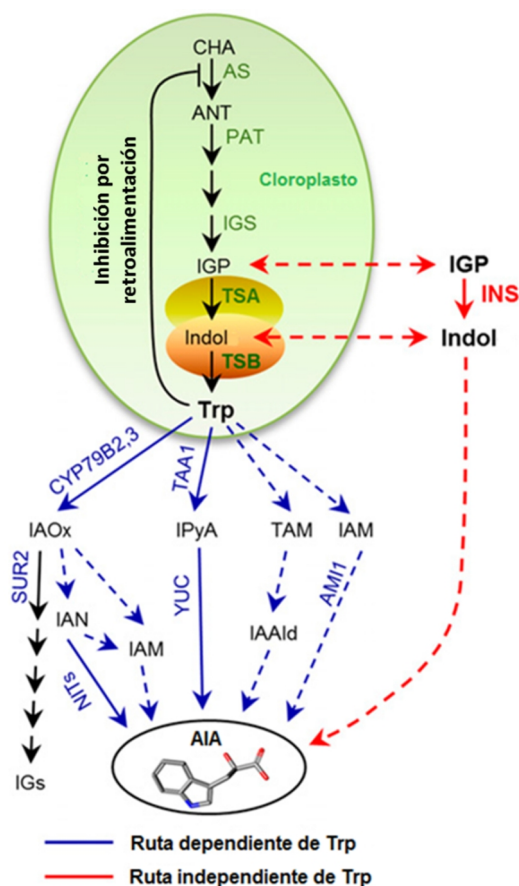


Figura 1.4 Rutas de biosíntesis del AIA. Las flechas azules muestran las rutas que son dependientes del triptofano y la flechas rojas muestran la única ruta que no es dependiente de triptofano. Las flechas sólidas son conversiones ya elucidados mientras que las flechas punteadas son pasos desconocidos (Wang et al., 2015).

1.4.2 CONJUGACIÓN Y ALMACENAMIENTO

En respuesta a señales como a los diferentes tipos de estrés o a tiempos específicos, las células pueden rápidamente reducir su concentración endógena de auxina libre, el cual se puede lograr a través de la conjugación. Por otro lado, estas son reacciones reversibles que permiten la recuperación de AIA libre cuando la célula lo requiera (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010). La síntesis de amidoconjugados es catalizada por miembros de la familia de las GH3 sintetasas y los genes son inducidos por auxinas, herbicidas tipo auxina y después del aumento de los niveles de auxina celular tras la infección de un

patógeno, insinuando un bucle regulatorio para balancear elevados niveles de auxina (Ruiz Rosquete et al., 2012). Se ha sugerido que la conjugación de auxina está involucrada en mecanismos de protección contra condiciones de estrés como la sequía, alta salinidad o frío (Ruiz Rosquete et al., 2012).

Se han identificado diversos conjugados de aminoácidos con AIA en plantas superiores, de los cuales sólo AIA-Ala, AIA-Leu, AIA-Asp, AIA-Glu, y AIA-Trp son los mejor entendidos. En *Arabidopsis* tanto AIA-Ala como AIA-Leu inhiben la elongación de raíz y son rápidamente hidrolizados (LeClere et al., 2002; Davies et al., 1999; Bartel y Fink, 1995), además las amidohidrolasas de estos conjugados de *Arabidopsis* muestran una alta afinidad por AIA-Ala y AIA-Leu, y baja afinidad por los otros conjugados, sugiriendo que tanto AIA-Ala como AIA-Leu contribuyen a la liberación de auxina libre al medio (Fig. 1.5).

Se conoce poco sobre la hidrólisis de los conjugados de auxina con azúcar, al contrario se conoce mejor el proceso con los amidoconjugados. Miembros de la familia de los ILR1 de amidohidrolasas de AIA regulan los niveles de auxina celular libre por desconjugación (LeClere et al., 2002; Davies et al., 1999; Bartel y Fink, 1995). Estas enzimas juegan un papel importante durante el desarrollo de la planta, como sugiere su dinámica, patrones de expresión diferencial y los fenotipos de múltiples mutantes en *Arabidopsis* (Rampey et al., 2004).

La regulación de la conjugación de la auxina y su posterior hidrólisis todavía es poco conocida molecularmente pero parece tener una fundamental importancia en la modulación de la respuesta a auxina (Ruiz Rosquete et al., 2012).

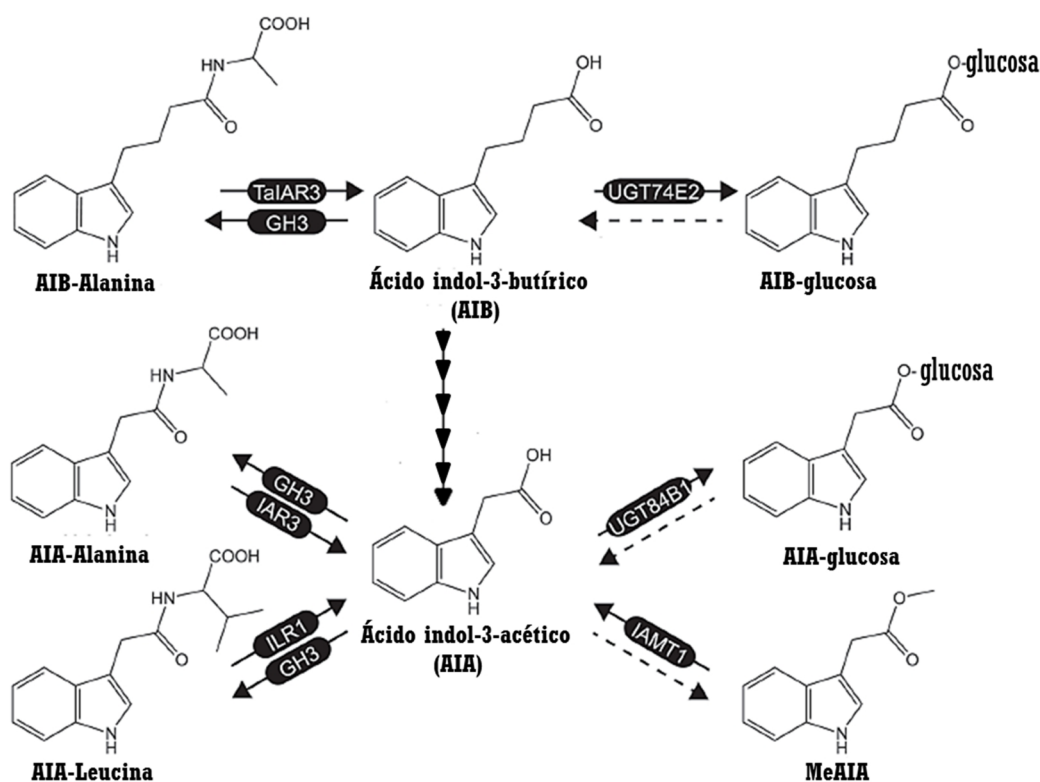


Figura 1.5 Principales formas de conjugación del AIA. Los conjugados del AIA son formados por la familia de enzimas amidosintetasas (GH3) e hidrolizados por la familia de enzimas amidohidrolasas (ILR).

1.4.3 CONJUGACIÓN Y DEGRADACIÓN

Se ha propuesto que el catabolismo del AIA puede ocurrir tanto por una ruta de descarboxilación oxidativa, que da lugar a modificaciones del anillo indol y a la cadena lateral, o a través de una oxidación no descarboxilativa del núcleo indólico (Ruiz Rosquete et al., 2012) (Fig. 1.6). La vía no descarboxilativa no solamente reduce los niveles de AIA libre, también inicia la degradación del AIA-Asp. Por lo tanto, la derivación de auxina a AIA-Asp puede representar otra estrategia metabólica para canalizar el exceso de auxina a una ruta catabólica (Ruiz Rosquete et al., 2012).

Diversas formas de almacenamiento de auxinas pueden ser convertidas de nuevo a auxina activa. Sin embargo, algunas formas de almacenamiento parecen constituir una vía de inactivación y no pueden ser convertidas de nuevo a AIA libre. Se ha planteado que

formas modificadas de auxina protegen contra la toxicidad por un exceso de auxina (Woodward y Bartel, 2005). Los conjugados con azúcares con un enlace éster pueden tener papeles tanto de almacenamiento como de inactivación (Woodward y Bartel, 2005). El AIA-Asp y el AIA-Glu son acumulados en muy bajas cantidades (<3% de todo el nivel de auxina) bajo condiciones normales de crecimiento, pero rápidamente aumentan tras la aplicación de auxina. Ni el AIA-Asp ni el AIA-Glu son hidrolizados por las amidohidrolasas (Ljung et al., 2002) al menos en *A. thaliana*, lo que es consistente con su posible función de inactivación. Varias de las enzimas GH3 son capaces de conjugar al AIA con los ácidos aspártico y glutámico, lo que provoca una mayor tendencia en la formación de conjugados que llevan a la degradación del AIA, sobre las formas hidrolizables que regresan AIA libre a la señalización. (Korasick et al., 2013).

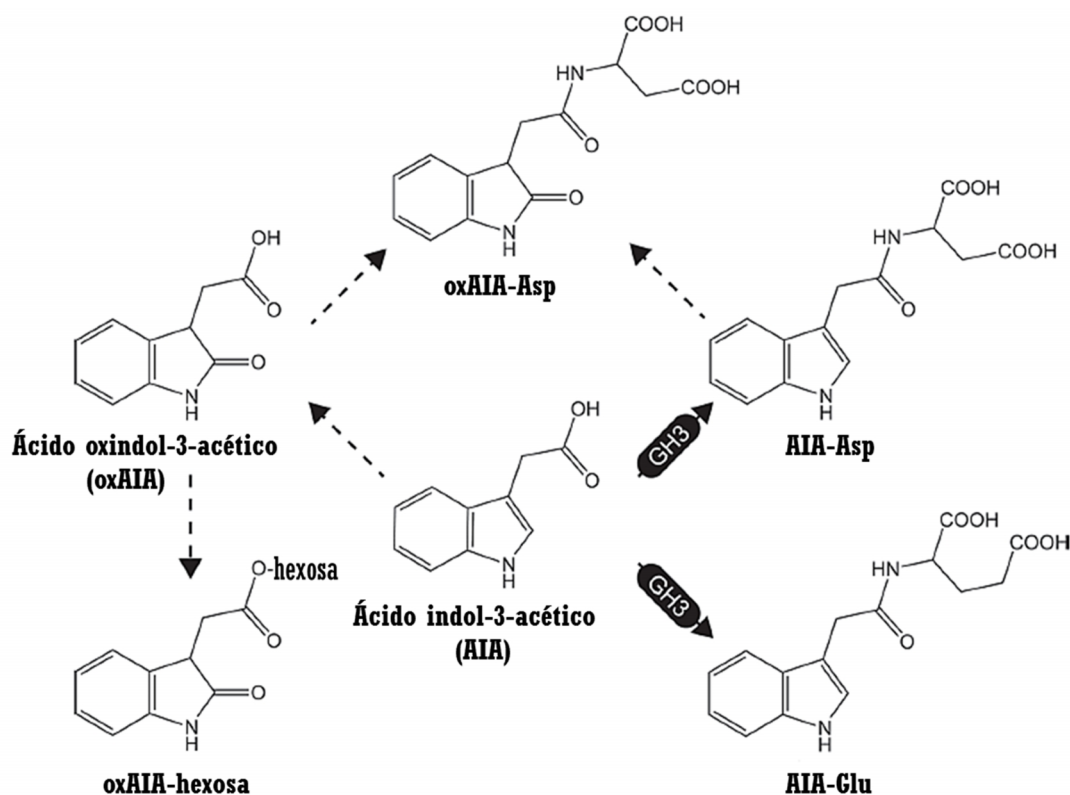


Figura 1.6 Formas de inactivación del AIA. El AIA puede formar conjugados con diversos aminoácidos que no pueden ser hidrolizados, algunos de estos conjugados pueden ser llevados hacia rutas oxidativas.

1.5 AMIDOHIDROLASAS

ILR1 e *IAR3* codifican para hidrolasas de conjugados de AIA y fueron identificadas a través de un cribado de mutantes en *Arabidopsis* (Davies et al., 1999; Bartel y Fink, 1995). *ILR1* e *IAR3* son proteínas 46% idénticas una de la otra. Se han identificado cinco genes que codifican para amidohidrolasas, todo ello basándose en su homología. *ILL1* e *ILL2* son 87% idénticos uno del otro, 57% idénticos de *IAR3* y aproximadamente 44% idénticos a *ILR1*. *ILL3* es entre 42 y 48% idéntico a otras hidrolasas. *ILL5* es un aparente pseudogen de *IAR3* (LeClere et al., 2002). Hay una secuencia depositada en la base de datos de ADNc de GeneBankTM con número de acceso AY065966 que posiblemente codifica a una proteína *ILL6* que es 45 a 48% idéntica a las otras hidrolasas (LeClere et al., 2002).

Las amidohidrolasas de conjugados de auxina pertenecen estructuralmente a la familia de peptidasas M20, cuyos miembros típicamente tienen dos cationes en su centro activo. Mientras las dipeptidasas bacteriales tienen Zn^{2+} (Ludwig-Müller, 2011), en las hidrolasas de auxina es más probablemente Mn^{2+} (Bitto et al., 2009), aunque Cu^{2+} puede ser un sustituto para Mn^{2+} en ensayos enzimáticos *in vitro* para algunas hidrolasas, pero Zn^{2+} no puede serlo. Aun cambios pequeños, en algunos de los aminoácidos en los sitios activos de estas amidohidrolasas, provocan cambios importantes en la preferencia de su sustrato (Campanella et al., 2003b).

En un trabajo donde se clonó al gen *ILR1* de *A. suecica* el cual codifica para una amidohidrolasa homóloga a la *ILR1* de *A. thaliana*, se determinó que esta enzima hidroliza a un grupo diferente de conjugados de AIA a los de su homóloga. Aunque *AsILR1* tiene aminoácidos similares a *AtILR1* la preferencia por los conjugados de AIA son diferentes, en cambio la preferencia de *AsILR1* se parece más a los de *AtIAR3* a pesar de que tienen mayores diferencias en su secuencia. (Campanella et al., 2003b).

Recientemente se cristalizó la amidohidrolasa *ILL2* de *Arabidopsis*. Este estudio arrojó luz sobre su sitio activo, así como otros aminoácidos que pueden ser necesarios para su función (Bitto et al., 2009). Se han propuesto varios residuos de aminoácidos en el centro activo de varias hidrolasas de diferentes especies los cuales parecen ser importantes en su especificidad de sustrato (Bitto et al., 2009). Por ejemplo, se sugirió que la Leu 175 sería la responsable para la selectividad de conjugados con cadena de aminoácidos más

voluminosos que alanina o serina (Bitto et al., 2009). Sin embargo, este residuo no está conservado en las amidohidrolasas de *Arabidopsis*, y solamente está presente en la AtILL2 y en su homólogo más cercano AtILL1. En AtILR1 este residuo es reemplazado por Tyr 176 quien puede estabilizar las cadenas laterales aromáticas de los sustratos preferidos de esta amidohidrolasa por una interacción de apilamiento (Bitto et al., 2009). La IAR3 homóloga de trigo (TaIAR3) contiene Gly 168 en la posición correspondiente del posible residuo Leu 175, el filtro de selectividad en AtILL2 (Campanella et al., 2004). La única otra diferencia notable es una inserción de un residuo simple (Thr 375 de TaIAR3) localizado en la vecindad de los residuos que forman la cavidad hidrofóbica para el anillo indol. Es posible que estas dos modificaciones en el sitio activo de TaIAR3 contribuyan a la habilidad de esta enzima para hidrolizar derivados de auxina con cadenas de ácidos grasos más largas (Bitto et al., 2009).

OBJETIVO GENERAL

Obtener la proteína amidohidrolasa recombinante IAR3 de *Coffea canephora*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y clonar el gen *CcIAR3* que codifica a la amidohidrolasa IAR3 de *Coffea canephora*.
- Realizar una análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos para encontrar secuencias consensos involucrados en funciones importantes de la proteína
- Obtener una construcción de expresión que contenga el gen *CcIAR3* en pET15b.
- Expresar de manera heteróloga al gen *CcIAR3* en las cepas BL21/pKJE7 y Rosetta II de *E. coli*.
- Obtener un protocolo adecuado para la purificación de la proteína recombinante IAR3 de *C. canephora*.

JUSTIFICACIÓN

Dado que la hidrólisis de compuestos conjugados con aminoácidos, es un mecanismo muy importante de la regulación de la homeostasis del AIA en plantas, es de vital importancia entender el funcionamiento de las amidohidrolasas especialmente las que están presentes en la ES de *Coffea canephora*.

El uso de tecnologías de clonación y expresión heteróloga como medio para obtener proteínas recombinantes nos dan ventajas sobre otros métodos tradicionales de purificación que eventualmente nos permitirán hacer estudios cinéticos. Este trabajo sentará las bases en el laboratorio para futuras investigaciones en búsqueda de las diferentes especificidades de esta familia de enzimas a los conjugados de AIA que existen en *C. canephora*.

Estudios que se irán incorporando a los conocimientos previos que nos ayudarán a comprender los procesos bioquímicos que acompañan a la reprogramación celular para generar una planta completa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

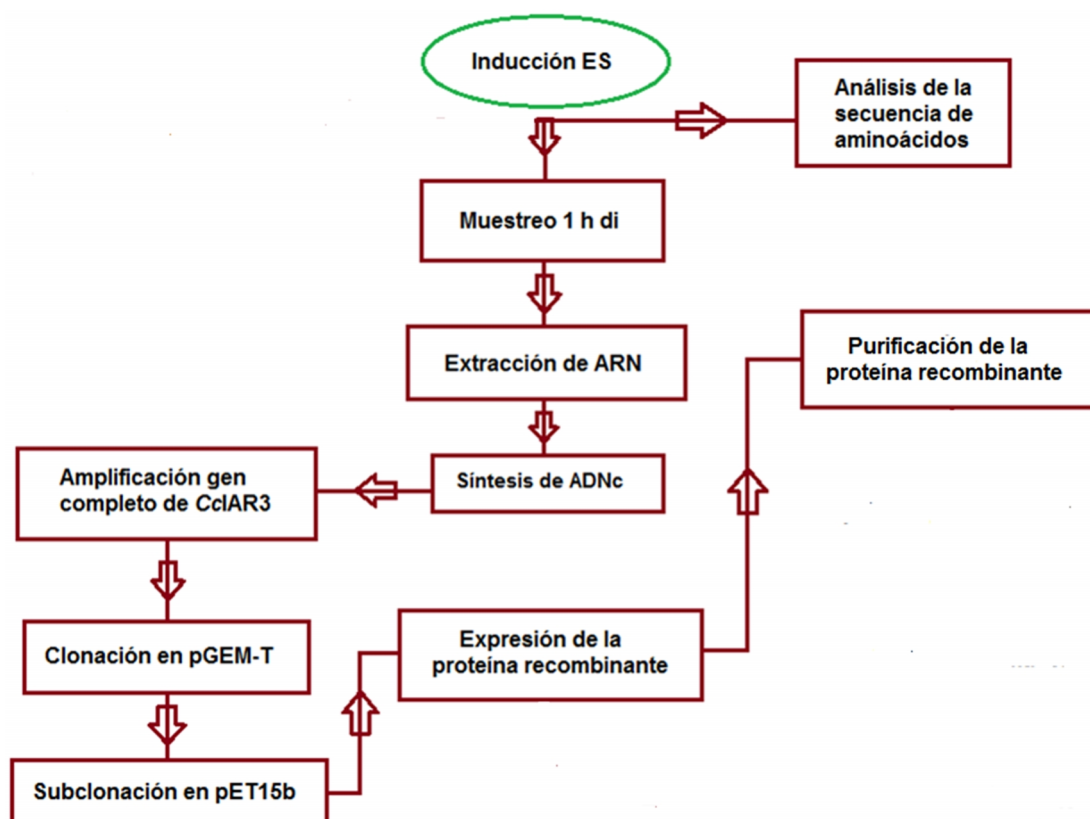


Figura 1.7 Estrategia experimental.

El proceso inició con la inducción de la ES (Fig 1.7). La muestra fue colectada en la primera hora después de la inducción de la ES. Seguidamente, se extrajo ARN total del tejido muestreado y se sintetizó ADN complementario (ADNc). La secuencia codificante de *CcIAR3* fue amplificada por PCR usando cebadores específicos. Esta secuencia se clonó en el vector de clonación pGEM y más tarde subclonado en el vector de expresión pET15b. Posteriormente las cepas BL21/PKJE7 y Rosetta II de *E. coli* fueron transformadas con el plásmido producto de la ligación de pET15b y la secuencia codificante de *CcIAR3* (pETIAR3), éstas cepas fueron cultivadas e inducidas para expresar la proteína IAR3 recombinante. En paralelo la secuencia de aminoácidos de la proteína obtenida de la base de datos del genoma de *C. canephora* fue comparado con secuencias de aminoácidos de proteínas homologas de especies reportadas y se establecieron secuencias consenso involucrados en la función de la proteína como

hidrolasa.

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA IAR3

2.1 INTRODUCCIÓN

Las hidrolasas de conjugados con AIA juegan un papel muy importante en la regulación de AIA activo dado que la liberan de sus conjugados. En *Arabidopsis thaliana* IAR3 es una amidohidrolasa que libera AIA de su conjugado de alanina (Davies et al., 1999). En *Coffea canephora* existe una secuencia ortóloga del gen de IAR3 sin embargo no hay evidencia experimental que nos indique la verdadera especificidad de la proteína por cualquiera de los conjugados existentes en café. El uso de tecnologías de clonación y expresión heteróloga como medio para obtener proteínas recombinantes nos dan ventajas sobre otros métodos tradicionales de purificación y nos proveen de material para realizar futuros estudios cinéticos sobre enzimas de nuestro interés. Esto ayudará en futuros trabajos a entender cuál es el papel de la enzima durante la reprogramación celular.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sin reguladores de crecimiento, y suplementado con 555 μM de mioinositol, 11.86 μM de tiamina, 158 μM de cisteína, 16.24 μM de ácido nicotínico, 19.45 μM de piridoxina, 87.64 mM de sacarosa como fuente de carbono y agar al 0.8% (p/v) como agente gelificante, ajustado a un pH de 5.8.

2.2.2 VECTORES

El plásmido pGEM®-T es un sistema conveniente para clonar productos de PCR (Fig. 2.1). Contiene una timidina terminal en ambos extremos que permite complementarse con las deoxiadenosina generado por la Taq polimerasa en el extremo 3' del fragmento. Es un sistema con un alto de número de copias que contiene promotores para las polimerasas de ARN T7 y SP6 flanqueado por una región múltiple de clonación dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa. Una inactivación por inserción dentro de esta

secuencia permite una selección de colonias blancas/azules. Este vector provee resistencia a ampicilina (AmpR).

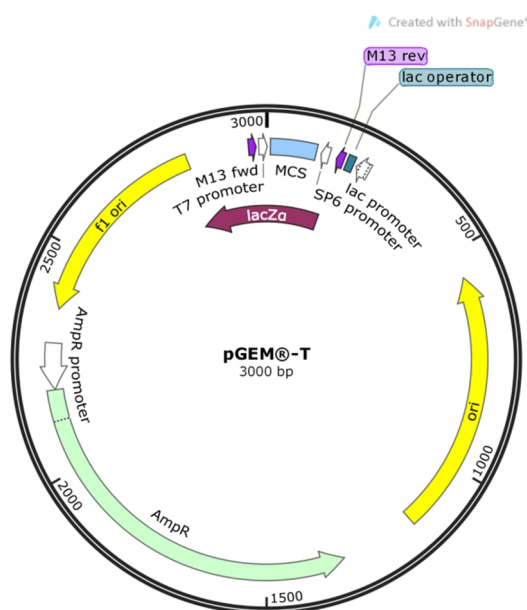


Figura 2.1 Mapa del plásmido pGEM®-T. Este plásmido tiene un tamaño de 3000 pares de bases.

El plásmido pET15b lleva una secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas en el amino terminal del producto insertado, el cual servirá para la posterior purificación por afinidad a níquel, un sitio que codifica una secuencia que es reconocida por la trombina y tres sitios de clonación, dos de los cuales se aprovecharán en este estudio. Además posee una secuencia que confiere resistencia a ampicilina (AmpR) (Fig. 2.2).

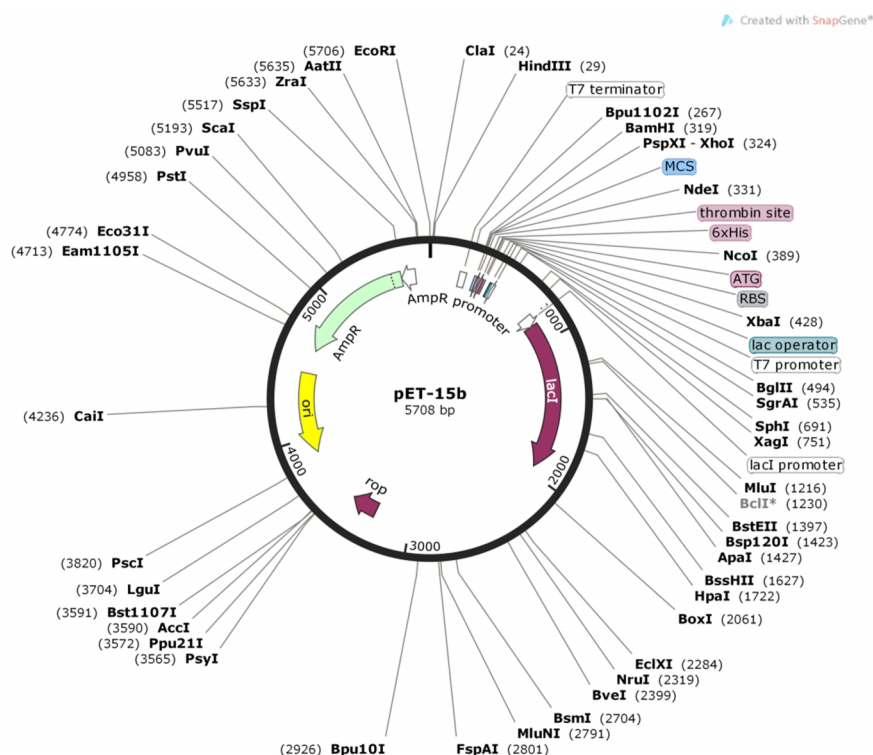


Figura 2.2 Mapa del plásmido pET15b. Este vector tiene un tamaño de 5,708 pares de bases. Dentro del sitio múltiple de clonación se encuentran las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

2.2.3 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Para la inducción de la ES se utilizó el protocolo previamente reportado en nuestro laboratorio (Quiroz-Figueroa et al., 2006b). Plántulas de *Coffea canephora* se preconditionaron por dos semanas en medio MS suplementado con ANA 0.54 μM y KIN 2.32 μM . Al final del preconditionamiento se cortaron segmentos circulares de hojas de aproximadamente 0.25 cm^2 y se depositaron cinco explantes en matraces Erlenmeyer con medio Yasuda modificado, adicionado de 6-BA 5 μM .

La recolección de la muestra se realizó una hora después de la inducción de la embriogénesis. Se pesaron 50 mg de tejido al que previamente se le había retirado el exceso de medio remanente con ayuda de papel seco estéril, se depositó en un tubo Eppendorf e inmediatamente se guardó en nitrógeno líquido. Todo el procedimiento se

llevó a cabo de manera rápida con el fin de evitar la fenolización del tejido. Al final se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.2.4 DISEÑO DE CEBADORES

Se diseñaron dos pares de cebadores. Se utilizó la secuencia del gen proveniente de la secuencia del genoma de *Coffea canephora* previamente publicado por Denoeud et al. (2014). El primer par de cebadores se diseñó para la amplificación de la secuencia completa que codifica para CcIAR3. El segundo par de cebadores se diseñó con el propósito de reamplificar la secuencia completa pero usando el producto de PCR generado por el primer par de cebadores. Este par de cebadores tiene la característica que en el extremo 5' tiene una secuencia que puede ser reconocida por las enzimas de restricción NdeI y BamHI para el cebador delantero y reverso respectivamente. Este último par de cebadores fueron diseñados de tal manera que pudieran ser ligados a pET15b. Adicionalmente, también se tomó en cuenta que estos sitios de restricción no estuviesen presentes dentro de la secuencia del gen de CcIAR3 analizándolo en el software bioinformático SnapGene® Viewer 2.7.2.

El diseño de los cebadores se llevó a cabo en el programa Oligo explorer versión 1.2., los cebadores obtenidos fueron analizados en el programa Oligo Analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

2.2.5 EXTRACCIÓN DEL ARN

La extracción del ARN se llevó a cabo con la ayuda del Kit Direct-zol™ RNA Miniprep de ZYMO RESEARCH (No de catálogo R2051). La muestra se maceró con nitrógeno líquido hasta que se formó en un polvo blanco fino. Se procedió a juntar toda la muestra del mortero en un cúmulo y fue colocado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se le agregó 1000 µL de reactivo TRI Reagent®, se homogenizó en un vórtex y se centrifugó a 12,000 rpm a 4° C por un min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, libre de RNAsas. Se agregó un volumen de etanol (95-100%) directamente a un volumen de muestra homogenizada (1:1) en TRI Reagent® y se mezcló bien en un vórtex. La muestra se cargó en una columna Zymo Spin™ en un tubo de colecta y se centrifugo por un min. Después la columna se transfirió a un nuevo tubo de colecta y se descartó el tubo del primer

filtrado. En este momento la muestra de ARN dentro de la columna se tratará con DNAsa por 15 min. Se añadieron 400 μL de amortiguador de pre-lavado Direct-ZolTM a la columna y se centrifugó por un min. El filtrado se descartó y se repitió el proceso de pre-lavado una vez más. Se añadieron 700 μL de amortiguador de lavado a la columna y se centrifugo por un min. Se descartó completamente todo el filtrado y la columna se transfirió a un tubo libre de RNAsas. Por último, se procedió a la elución del ARN de la columna añadiendo 25 μL de agua libre de RNAsas a la columna y centrifugando por un min. La muestra eluída se guardó a -80°C hasta su uso.

2.2.6 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO POR RT-PCR

Para la obtención del ADN complementario (ADNc) se siguió el protocolo de SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Cat No. 11904-018). Como primer paso se realizó la primera solución con 1 μg de ARN, un μL de dNTP mix 10 mM, 0.5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ oligo (dT) y se llevó a un volumen de 10 μL con agua DEPC. Inmediatamente se incubó la mezcla ARN/cebador a 65°C por 5 min, luego en hielo por un min. Durante el tiempo de incubación se procedió a preparar la siguiente mezcla en un tubo Eppendorf aparte: dos μL de 10x amortiguador RT, cuatro μL de MgCl_2 25 mM, dos μL de DTT 0.1 M y de RNasa OUTTM (40 U μL^{-1}). Luego se añadieron nueve μL de la mezcla de la reacción a la primera solución preparada. Se mezcló suavemente, se colectó por centrifugado y se incubó a 42°C por dos min. Después se le añadió un μL de SuperScriptTM RT y se incubó a 42°C por 50 min. Posteriormente la reacción se incubó a 70°C por 15 min y después se mantuvo en hielo. Por último, el producto de la reacción se colectó por centrifugado, se añadió un μL de RNasaH y se dejó incubando a 37°C por 20 min. El producto de la reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.2.7 BÚSQUEDA DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE AMPLIFICACIÓN

Con el objetivo de amplificar de manera óptima la secuencia codificante de *CcIAR3* se realizaron varios gradientes de temperatura. Los gradientes fueron de 55°C en la temperatura más baja hasta 66°C en la temperatura más alta. La temperatura teórica de la amplificación fue de 61°C tomando en cuenta la T_m de los cebadores diseñados

Cada ciclo de PCR consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, un paso de alineamiento de 55°C – 66°C según fue el caso por 30 segundos, y un paso

de elongación a 72 °C por dos min con 45 segundos. El ADNc fue amplificado por 35 ciclos en un termociclador 5 Prime de la marca TECHNE. Cada reacción consistió en 2.5 µL de amortiguador PCR 10X, 0.5 µL dNTPs 10 mM, un µL de cada cebador delantero y reverso ambos 10 mM, 0.75 µL MgCl₂ 25 mM, 0.25 µL de Taq Polimersa recombinante (1.25 U, Thermo Scientific), un µL de ADNc un µg µL⁻¹, todo llevado a un volumen final de 24 µL.

2.2.8 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DE CclAR3 POR PCR

Una vez establecida la temperatura óptima de amplificación se prosiguió con la amplificación de la secuencia codificante completa de CclAR3 en las condiciones óptimas. Cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 57° C por 30 segundos y un paso de elongación a 72° C por dos min con 45 segundos con un total de 35 ciclos. Cada reacción consistió en 2.5 µL de amortiguador PCR 10X, 0.5 µL dNTPs 10 mM, 1 µL de cada cebador delantero y reverso ambos 10 mM, 0.75 µL MgCl₂ 25 mM, 0.25 µL de Taq Polimersa recombinante (1.25 U, Thermo Scientific), un µL de ADNc un µg µL⁻¹, todo llevado a un volumen final de 24 µL.

2.2.9 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%, a 80 voltios por 45 min. La purificación del ADN del producto de PCR corrido en un gel de agarosa fue el siguiente, de acuerdo al protocolo de ZymocleanTM DNA recovery Kit:

En el transiluminador de luz UV se cortó el gel de agarosa con una cuchilla estéril lo más cercano posible al borde de la banda tratando, en la medida de lo posible, obtener la menor cantidad de agarosa. Posteriormente, la muestra fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó un volumen de la solución ADB igual al triple del peso de la agarosa en el tubo. El tubo fue incubado a una temperatura de 55 °C por ocho minutos, hasta que la agarosa se disolvió completamente. La agarosa fundida fue transferida a una columna contenida dentro de un tubo de colecta. El tubo fue centrifugado a 8,000 rpm y el filtrado fue descartado. Después se adicionaron 200 µL del amortiguador ADN Wash a la columna, se centrifugó a 8,000 rpm y se descartó el filtrado. Este paso se realizó una vez más. Finalmente, se adicionaron 15 µL de agua libre de nucleasas directamente a la columna (se esperó aproximadamente de uno a dos minutos

previos a la centrifugación). La columna fue transferida a un tubo de colecta nuevo estéril y fue centrifugada a 500 rpm por 15 segundos para eluir el ADN. Las muestras con el ADN del producto de PCR purificado fueron cuantificadas y ajustadas a las concentraciones requeridas para ser usadas inmediatamente en los pasos de ligación.

2.2.10 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE *CcIAR3*

Para clonar el producto de PCR, la reacción de ligación se realizó como describe el manual técnico del fabricante. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron cinco μL de amortiguador de ligación rápida 2X, un μL del vector de clonación pGEM-T 50 ngL^{-1} , un μL de producto de PCR purificado (ver sección anterior), un μL de ligasa T4 de ADN 3 U μL^{-1} , ajustado a un volumen final de 10 μL con agua libre de nucleasas. La mezcla fue homogenizada por pipeteo, se incubó a temperatura ambiente por una hora y después de ese periodo se dejó incubando a 4 °C por 12 horas. Se guardó a -20° C hasta su uso (preferentemente el día siguiente).

En la etapa de transformación, se añadieron 10 μL de la reacción de ligación en 50 μL de células competentes de *Escherichia coli* One Shot® TOP10 y la mezcla se mantuvo en hielo por 15 minutos. Después el choque térmico se llevó a cabo a 42° C por dos minutos, después se mantuvo en hielo por 5 minutos. Se le añadió un mL de medio LB sin ampicilina y se incubó a 37° C por una hora con una agitación constante de 200 rpm. Después del tiempo de incubación se plaquearon 100 μL de bacterias transformadas en cajas Petri con medio LB sólido con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IPTG 0.1 M y X-Gal 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las cajas se dejaron a 37° C toda la noche. Con el propósito de saber si las transformantes blancas obtenidas contenían el inserto de *CcIAR3* se llevó a cabo el proceso de extracción del ADN plamídico para después ser digerido con las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

El número de digestiones dependió del número de transformantes blancas obtenidas. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo de la siguiente manera: en un tubo de PCR se añadieron cuatro μL de amortiguador tango 10X, un μL de pGEM-*CcIAR3* un $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtenida de cada transformante blanca, un μL de NdeI 10 U μL^{-1} , un μL de BamHI U μL^{-1} , ajustado a un volumen final de 20 μL con agua libre de nucleasas. En total se llevaron a cabo nueve digestiones dado que fue el número de transformantes blancas obtenidas.

Los clones obtenidos que contenían el inserto de *CcIAR3* se les llamó pGEIAR3.

2.2.11 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA

Se picaron colonias blancas y se inocularon en cinco mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se dejaron incubando a 37° C toda la noche en agitación a 200 rpm. Al día siguiente se centrifugó a 12,000 rpm por un min a temperatura ambiente. La pastilla bacteriana fue resuspendida con 200 μL de la solución de lisis alcalina I (glucosa 50 mM, Tris Base pH: 8 25 mM, EDTA pH: 8 10 mM) y se mantuvo en hielo. Después se agregaron 200 μL de la solución de lisis alcalina II (NaOH 0.2 N, 1% w/v, recién preparada) a cada suspensión bacteriana y se homogenizó por inversión. Se mantuvo a temperatura ambiente por cinco min y seguidamente en hielo por dos min. Posteriormente se adicionaron 300 μL de la solución fría de lisis alcalina III (acetato de potasio 3 M, ácido acético glacial 2.01 M), se homogenizó por inversión y se mantuvo en hielo por 15 min. El lisado bacteriano obtenido fue centrifugado a 12,000 rpm por 10 min, el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo estéril, seguidamente se le añadieron 700 μL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente por dos minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min hasta que se obtuvo una pastilla. El sobrenadante fue descartado, la pastilla fue lavada dos veces con etanol al 70% y recuperada a 12,000 rpm por dos min. Posteriormente el sobrenadante fue desechado por decantación y el tubo fue invertido a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del etanol (aproximadamente 45 minutos). Por último, la pastilla fue disuelta en 50 μL de agua libre de nucleasas, con un μL de RNasa A e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Se almacenó a -20° C hasta su uso.

2.2.12 SUBCLONACIÓN DE *CcIAR3* AL VECTOR DE EXPRESIÓN pET15B

Para la liberación del inserto de *CcIAR3* se llevó a cabo la digestión de la construcción pGEIAR3-1 con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. La reacción de digestión se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de PCR se añadieron cuatro μL de amortiguador tango 10X, un μL de pGEIAR3-1 un $\mu\text{g mL}^{-1}$, un μL de NdeI 10 U μL^{-1} , un μL de BamHI 10U μL^{-1} , ajustado a un volumen final de 20 μL con agua libre de nucleasas. De manera simultánea se llevó a cabo una reacción de digestión del plásmido pET15B con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. La reacción de digestión se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de PCR se añadieron cuatro μL de amortiguador tango 10X,

un μL del plásmido pET15B vacío un $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, un μL de NdeI 10 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, un μL de BamHI 10 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, ajustado a un volumen final de 20 μL con agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron incubadas a 37° C por una hora. Después el volumen completo de las dos reacciones fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, 80 voltios por 45 min. El inserto de CclAR3 liberado y el plásmido pET15B linearizado fueron purificados del gel de agarosa como se describió anteriormente. Después los productos purificados fueron corridos en un gel de agarosa al 1% para corroborar su purificación, calcular su concentración y su ajuste. Todo esto para su uso inmediato en la reacción de ligación que consistió en: 15 μL de amortiguador de ligación rápida 2X, 10 μL de pET15B linearizado 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, un μL de inserto de CclAR3 liberado 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 3 μL de ligasa T4 de ADN 3 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, ajustado a un volumen final de 30 μL con agua libre de nucleasas. La reacción de ligación fue incubada a temperatura ambiente por una hora, seguidamente de ese periodo se dejó incubando a 4° C por 12 horas. Se transformaron 50 μL de células competentes de *E. coli* One Shot® TOP10 con 15 μL del producto de la ligación. El proceso de transformación se llevó a cabo como se describió previamente. Una vez que se obtuvieron colonias, éstas fueron picadas y cultivadas en medio LB líquido con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extraer ADN plasmídico por el método de lisis alcalina. Las clonas obtenidas fueron verificadas por reacciones de digestión de las construcciones de pET15B-CclAR3. El número de digestiones dependió del número de transformantes obtenidas. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo de la siguiente manera: en un tubo de PCR se añadieron cuatro μL de amortiguador tango 10X, un μL de pET15B-CclAR3 un $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ obtenido de cada transformante, un μL de NdeI 10 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, un μL de BamHI $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, ajustado a un volumen final de 20 μL con agua libre de nucleasas. En total se llevaron a cabo 3 digestiones dado que fue el número de transformantes obtenidas. Los clonas obtenidas que contenían el inserto de CclAR3 se les llamó pETIAR3.

2.2.13 CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR OBTENIDO CON *Pfu* AL VECTOR DE EXPRESIÓN PET15B

Uno de los motivos por el cual se decidió usar la polimerasa de ADN *Pfu* es porque esta enzima tiene la capacidad de corregir sus errores durante la amplificación del ADN y por ende obtener una mejor fidelidad de la secuencia. De esta manera conservaríamos a medida de lo posible la secuencia original de la proteína que pretendíamos expresar de manera heteróloga.

Una de las características de esta enzima es dejar extremos romos en los productos de PCR lo que no permite que el producto pueda ser usado en la clonación a pGEM-T como primer vehículo. Y como consecuencia de lo anterior se tiene que clonar directamente el inserto al vector de expresión pET15b, para ello se digiere el producto de PCR con las enzimas de restricción para modificar sus extremos cinco prima y posteriormente ligarlo. Para ello los cebadores antes diseñados fueron modificados para que las enzimas usadas puedan anclarse y digerir el plásmido. Para ello se aumenta la longitud en nucleótidos de los cebadores en sus extremos cinco prima.

La digestión del producto de PCR se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. La reacción de digestión se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de PCR se añadieron 4 μL del amortiguador tango 10X, 10 μL del producto de PCR, un μL de NdeI 10 U μL^{-1} , un μL de BamHI 10 U μL^{-1} , ajustado a un volumen final a 22 μL con agua libre de nucleasas. De manera simultánea se llevó a cabo una reacción de digestión del plásmido pET15B con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. La reacción de digestión se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de PCR se añadieron ocho μL de amortiguador tango 10X, dos μL del plásmido pET15B vacío un μg μL^{-1} , dos μL de NdeI 10 U μL^{-1} , 2 μL de BamHI 10 U μL^{-1} , ajustado a un volumen final de 42 μL con agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron incubadas a 37 °C por una hora. Después, el volumen completo de las dos reacciones fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, 80 voltios por 45 minutos. El producto de PCR digerido y el plásmido pET15B linearizado fueron purificados del gel de agarosa como se describió anteriormente y posteriormente usados en la reacción de ligación. La reacción de ligación fue ajustada de tal manera que hubiera ocho moléculas de inserto por cada molécula de vector lineal.

La reacción de ligación consistió en 7.5 μL de amortiguador de ligación rápida 2X, 3.3 μL de pET15B linearizado 15 ng μL^{-1} , 2.4 μL de producto de PCR digerido 35 ng μL^{-1} , 1.5 μL de ligasa T4 de ADN 3 U μL^{-1} , ajustado a un volumen final de 15 μL con agua libre de nucleasas. La reacción de ligación fue incubada a temperatura ambiente por una hora, seguidamente de ese periodo se dejó incubando a 4 °C por 12 horas. El proceso de transformación se siguió hasta obtener colonias.

2.2.14 SECUENCIACIÓN DE LAS CONTRUCCIONES OBTENIDAS CON PETIAR3

Para la secuenciación se extrajo el plásmido de cada una de las clonas positivas obtenidas por lisis alcalina, se aseguró que tengan una concentración aproximada a 200 ng μL^{-1} visualizada en el gel de agarosa al 1% (P/V) como se requiere para la secuenciación para plásmidos más grandes a 4,000 pares de bases.

2.2.15 ANÁLISIS DE LA SECUECIA DE AMINOÁCIDOS

Con el fin de determinar el número de genes que codifican para las amidohidrolasas se analizó la secuencia del genoma de *C. canephora* (<http://coffee-genome.org/>) utilizando el software Ugene. Para la búsqueda de secuencias homologas se realizó un BLAST en la bases de datos de MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) /UniProt (<http://www.uniprot.org>). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con el programa MEGA6 6.0 usando el método MUSCLE.

2.2.16 EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE IAR3 CON COLA DE HISTIDINAS

Las clonas pETIAR3-3 y pETIAR3-10 se usaron para la expresión de la proteína recombinante. Las cepas BL21/pKJE7 y Rosetta II de *E. coli* se transformaron con ambos plásmidos cada uno y fueron plaqueadas en cajas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, posteriormente se incubaron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se picó una colonia de cada cepa e fue inoculada en 100 mL de medio LB líquido con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 37 °C y se incubó toda la noche.

Se usaron 50 mL del preinoculo anterior para iniciar el crecimiento de cada una de las cepas en 500 mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (incluyendo cloranfenicol 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y arabinosa 0.1 g L^{-1} en el caso de la cepa BL21/pKJE7). Se dejó incubando a 37 °C y con una agitación de 220 rpm por 2 h, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. El crecimiento se detuvo con hielo y en una ambiente estéril se le añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM, después se incubó a una temperatura de 18 °C y se agitó a 220 rpm por 16 h.

El cultivo fue centrifugado a 5,000 rpm por 12 min para obtener la pastilla, seguidamente ésta fue resuspendida en 40 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM), se le agregó lisosima a una concentración final de un mg mL^{-1} y se dejó en hielo por 30 min. Las bacterias fueron lisadas por sonicación usando 10 pulsos de 30 s con 30 s de

descanso. El lisado bacteriano fue centrifugado a 10,000 rpm por 30 min a 4 °C. Después de la centrifugación se obtuvieron dos fracciones: la fracción soluble y la insoluble. Las dos fracciones fueron usadas para la purificación posterior de la proteína recombinante.

Para la purificación de la proteína recombinante perteneciente a la fracción soluble se siguió la siguiente metodología. La fracción soluble fue hecha pasar a través de un filtro Millipore con poro de 0.45 µm. Al filtrado se le agregó imidazol hasta una concentración final de 5 mM. Esta fracción fue pasada a través de una columna de níquel con capacidad de 1 mL previamente equilibrada (5 mL de EDTA 500 mM, 12 mL de agua, 5 mL de níquel 100 mM, 12 mL de agua y 12 mL de amortiguador de lisis, en ese orden) y posteriormente se realizaron 3 lavados en secuencia con 30 mL de amortiguador de lisis con imidazol 5 mM, 20 mL de amortiguador de lisis con imidazol 20 mM, 20 mL de amortiguador de lisis con imidazol 40 mM. El proceso de elución se realizó con 5 mL de amortiguador de lisis y 500 mM de imidazol. EL eluato fue dializado inmediatamente usando una membrana de celulosa en un litro de amortiguador de diálisis (Tris-HCl 100 mM pH: 8 y NaCl 50 mM) a una temperatura de 4 °C toda la noche. Posteriormente la elución dializada fue guardada a 4 °C.

El procedimiento para purificar la proteína recombinante a partir de la fracción insoluble fue el siguiente. La fracción insoluble fue resuspendida en una solución amortiguadora que consistía en Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, urea 7 M y Triton X-100 0.1%, después fue dializada por 4 horas usando una solución amortiguadora de Tris-HCl 300 mM y NaCl 50 mM, este último paso se repitió una vez más. Después de este proceso la purificación de la proteína recombinante se llevó cabo de acuerdo al procedimiento previamente descrito para la fracción soluble. Todas las fracciones obtenidas fueron corridas en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15%.

2.2.17 WESTERN BLOT

Para la detección de la proteína recombinante se usaron anticuerpos contra las histidinas adicionadas a la proteína. La metodología usada en este trabajo fue la siguiente. Se colocó el gel de poliacrilamida en una solución amortiguadora de transferencia (amortiguador de corrida de proteínas SDS-PAGE 80% y metanol 20% v/v) y se dejó incubando por 15 min. La membrana de PVDF se activó durante 5 min en metanol y

posteriormente se colocó en solución amortiguadora de transferencia por 15 min. Así mismo se impregnaron los papeles filtro para el Western blot con amortiguador de transferencia.

Se abrió el casete de transferencia y se colocaron, alineados, un papel filtro para Western, la membrana PVDF, el gel de poliacrilamida y otro papel filtro, en ese orden. Se retiró el exceso de amortiguador y las burbujas. Se realizó la transferencia en una cámara semiseca a 40 voltios por 30 min. Después se dejó secar la membrana, luego se rehidrató con metanol y posteriormente se dejó incubando con PBS 1X (amortiguador fosfato salino) por 15 min. Se dejó bloqueando la membrana con una solución de bloqueo (leche baja en grasa al 5% y PBS 1X w/v) a 4 °C toda la noche.

Al día siguiente se lavó la membrana con PBS 1X suplementado con Tween 20 0.05% (v/v). En este paso se realizaron dos lavados rápidos para eliminar el exceso de leche y siete lavados lentos de cinco min cada uno. La incubación de la membrana se realizó con el anticuerpo primario por una hora a temperatura ambiente en agitación lenta. Después del tiempo de incubación con el anticuerpo primario la membrana se lavó con PBS/Tween. Se realizaron dos lavados rápidos para eliminar el exceso de anticuerpo primario y ocho lavados lentos de cinco min cada uno. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente en agitación lenta. Se hicieron dos lavados rápidos con PBS/Tween para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y siete lavados lentos de cinco min. Por último, la membrana se lavó con PBS 1X por 10 min en agitación. Se llevó a cabo el revelado con reactivos para quimioluminiscencia.

CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS

3.1.1 DISEÑO DE CEBADORES

Las secuencias de los cebadores diseñados se muestran en el cuadro 3.1. Las secuencias en color rojo muestran los sitios de restricción. Las secuencias de color verde en el extremo cinco prima muestran los nucleótidos agregados para el “anclaje” de las enzimas de restricción.

Cuadro 3.1 Nombre, secuencia y Tm de los cebadores diseñados.

Cebador	Secuencia	Tm
FwCclAR3	5'-ATGGTTGGTATTAGGAGAAAGATTC-3'	61.3
RvCclAR3	5'-TTATAGTTCATCACGAAGCTTCTGA-3'	62.8
NdeICclAR3	5'- <u>CATATG</u> GTTGGTATTAGGAGAAAGATTC-3'	63.5
BamHICclAR3	5'- <u>GGATCC</u> TTATAGTTCATCACGAAGCTTCTGA-3'	70.7
FCclAR3NdeI	5'- <u>GGGAATTC</u> <u>CATATG</u> GTTGGTATTAGGAGAAAGATTC-3'	
RCclAR3BamHI	5'- <u>CGC</u> <u>GGATCC</u> TTATAGTTCATCACGAAGCTTCTGA-3'	

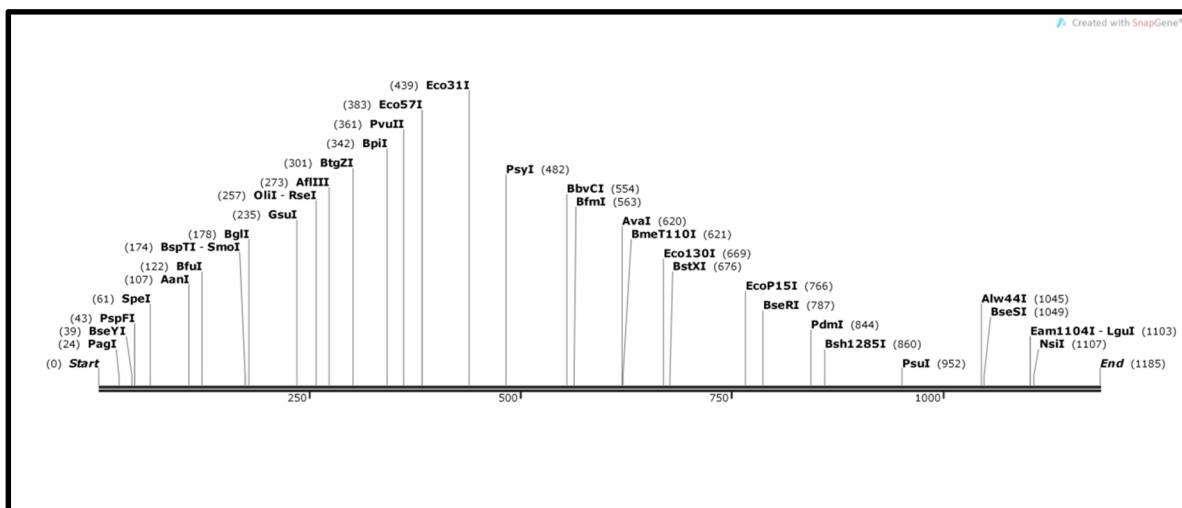


Figura 3.1 Mapa del gen IAR3 y los sitios de restricción encontrados. No contiene sitios de restricciones similares a los que se incorporaron a los cebadores utilizados.

Como se puede observar en la figura 3.1 no hay sitios de corte de las enzimas NdeI y BamHI que pudiesen perjudicar el sitio de corte en el momento de la liberación del fragmento del plásmido.

3.1.2 TEMPERATURA ÓPTIMA DE AMPLIFICACIÓN

En primera instancia se decidió hacer un gradiente de dos grados Celcius de diferencia, con una temperatura media de 62 °C.

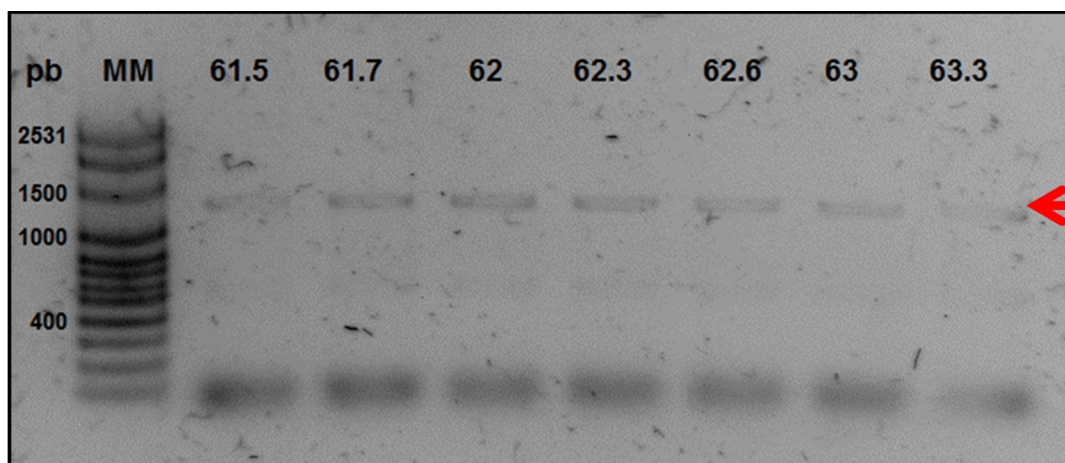


Figura 3.2 Gradiente de temperatura de dos grados. El gradiente de temperatura se llevó a cabo de acuerdo a la temperatura de alineamiento teórica de los cebadores diseñados. La banda amplificada fue de 1185 pb.

Se observó la amplificación de un fragmento dentro del rango de tamaño de 1,000 y 1,500, considerando que el tamaño esperado de CclAR3 es de 1,185 pb.

Se pudo notar que a esas temperaturas no hay un cambio notable en la amplificación del producto. Por lo que se hizo un gradiente más grande de seis grados con una temperatura media de 60 °C. Se pudo observar que el bandeo se fue haciendo más intenso a medida que la temperatura fue descendiendo (Fig. 3.2 y Fig. 3.3).

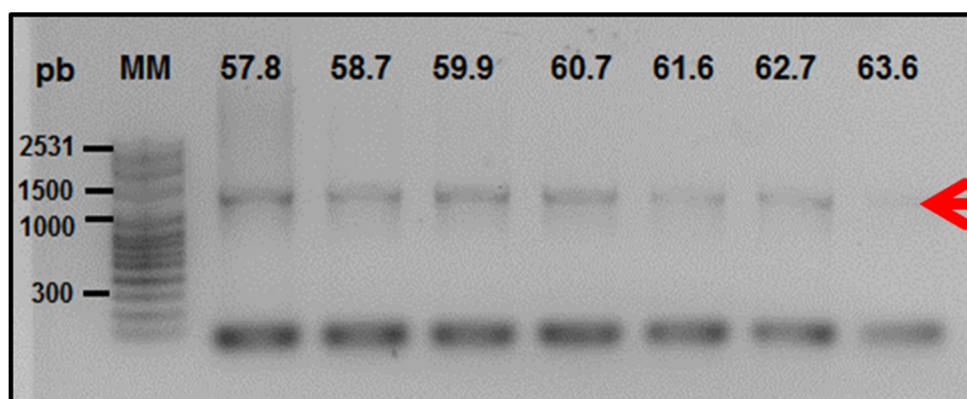


Figura 3.3 Gradiente de temperatura de 6 grados. La banda perteneciente al gen amplificado se intensificaba a medida que la temperatura de alineamiento disminuía.

Por lo que se hizo un gradiente de temperatura de aproximadamente cinco grados por

debajo de 59 °C. El bandeo se intensificó un poco más, por lo que se decidió escoger 57 °C para amplificar el gen con los cebadores que contenían los sitios de restricción (Fig. 3.4).

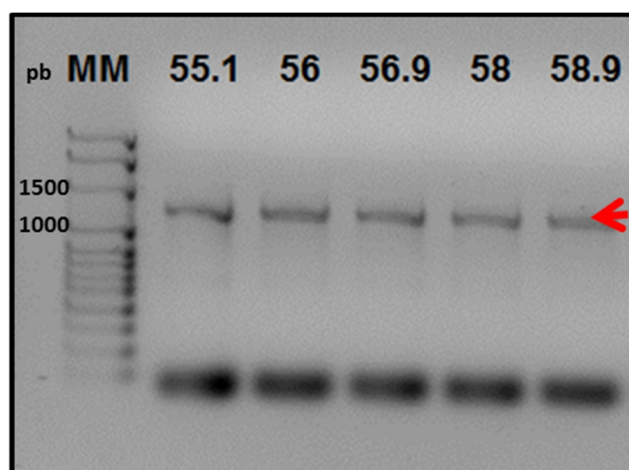


Figura 3.4 Ultimo gradiente que se llevó a cabo para buscar la temperatura de alineamiento adecuada para la amplificación óptima de *CcIAR3*.

3.1.3 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUECIA COMPLETA DE *CcIAR3*

La amplificación de la secuencia completa que codifica para el gen *CcIAR3* consistió en un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, un paso de alineamiento de 57 °C por 30 segundos, y un paso de elongación de 72 °C por 2 min con un total de 35 ciclos.

En la figura 3.5 se muestra la amplificación del gen de actina como testigo positivo y negativo según fue el caso en un gel de agarosa 0.8%(P/V).

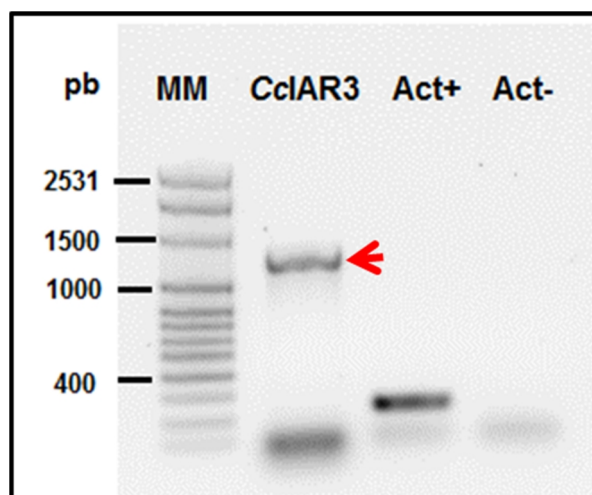


Figura 3.5 Amplificación del gen completo de *CclAR3* con las condiciones óptimas. Gel de agarosa 0.8%, 80 V, 45 min.

3.1.4 CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE *CclAR3*

Se obtuvieron nueve clones del producto de ligación de pGEM-T y *CclAR3*. Las nueve clones fueron sometidas a una digestión con *NdeI* y *BamHI*, de las cuales sólo cinco mostraron la liberación del inserto con el tamaño aproximado. Las clones positivas fueron llamadas pGEIAR3-1, pGEIAR3-2, pGEIAR3-4, pGEIAR3-5 y pGEIAR3-8 (Fig. 3.6).

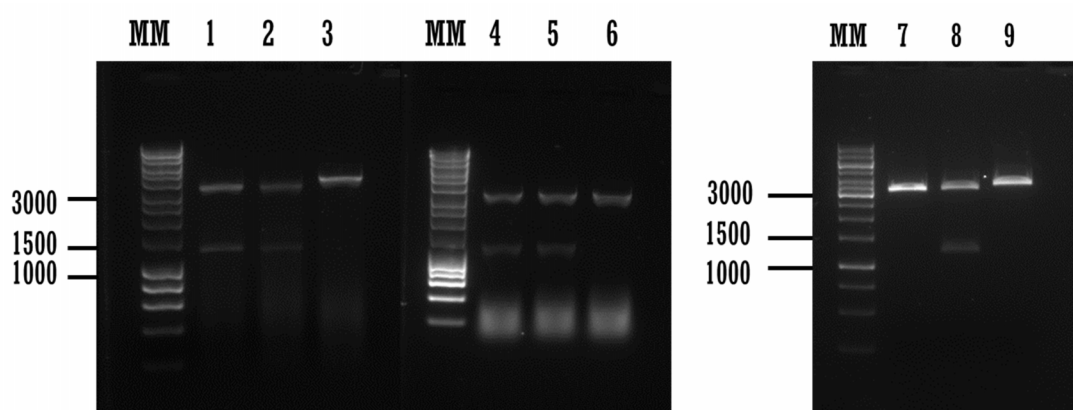


Figura 3.6 Clonas obtenidas del proceso de transformación con el producto de ligación de pGEM-T y *CclAR3*. Las clones positivas fueron las que contenían el inserto después de ser digeridos con *NdeI* y *BamHI* en los carriles 1, 2, 4, 5 y 8.

Para la subclonación de *CcIAR3* dentro del vector pET15B, la liberación de *CcIAR3* se llevó a cabo mediante la digestión de pGEIAR3-1. De este procedimiento se obtuvieron 3 clonas de las cuales solo 2 fueron positivas a los que se le llamó pETIAR3-1.2 y pETIAR3-1.3 (Fig. 3.7).

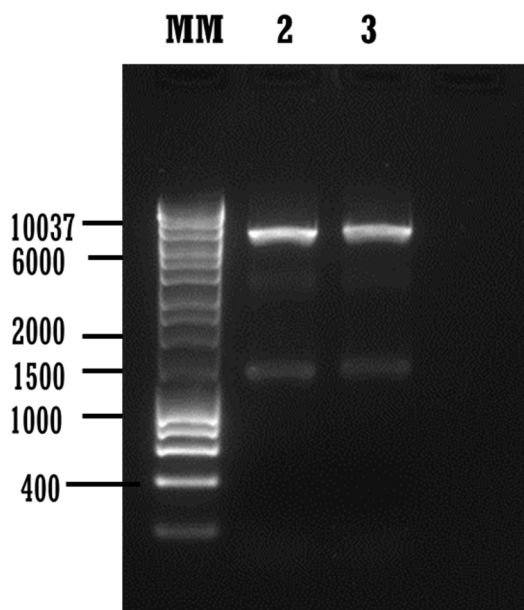


Figura 3.7 Clonas positivas tras ser digeridas con las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

3.1.5 CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR AMPLIFICADO CON *PFU*

Del resultado de la ligación de pET15b con el producto de PCR se obtuvieron varias clonas. De 20 clonas analizadas por PCR en colonia, sólo tres de ellas fueron positivas. Estas clonas fueron asignadas como PETIAR3-3, PETIAR3-5 y PETIAR3-10 (Fig. 3.8).

Para asegurarnos que estas clonas fuesen realmente positivas se digirieron con las enzimas de restricción NdeI y BamHI para que liberasen el fragmento deseado, así mismo para comprobar si realmente estaban clonados en sentido correcto. Para ello fueron sometidas a una reacción de PCR donde fueron amplificadas con el cebador universal T7Promotor y el cebador reverso específico de nuestro gen de interés. De esta manera comprobamos la correcta orientación del inserto (Fig. 3.9).

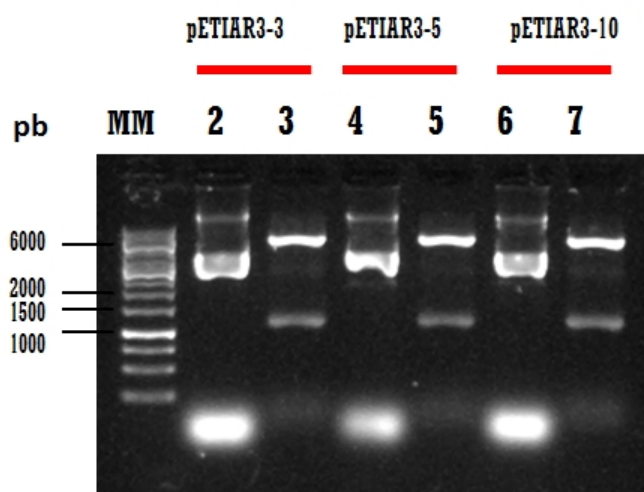


Figura 3.8 Clonas positivas tras ser digeridas con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Carriles 2, 4 y 6 plásmidos superenrollados de las clonas obtenidas; carriles 3, 5 y 7 plásmidos linearizados e insertos liberados tras la digestión.

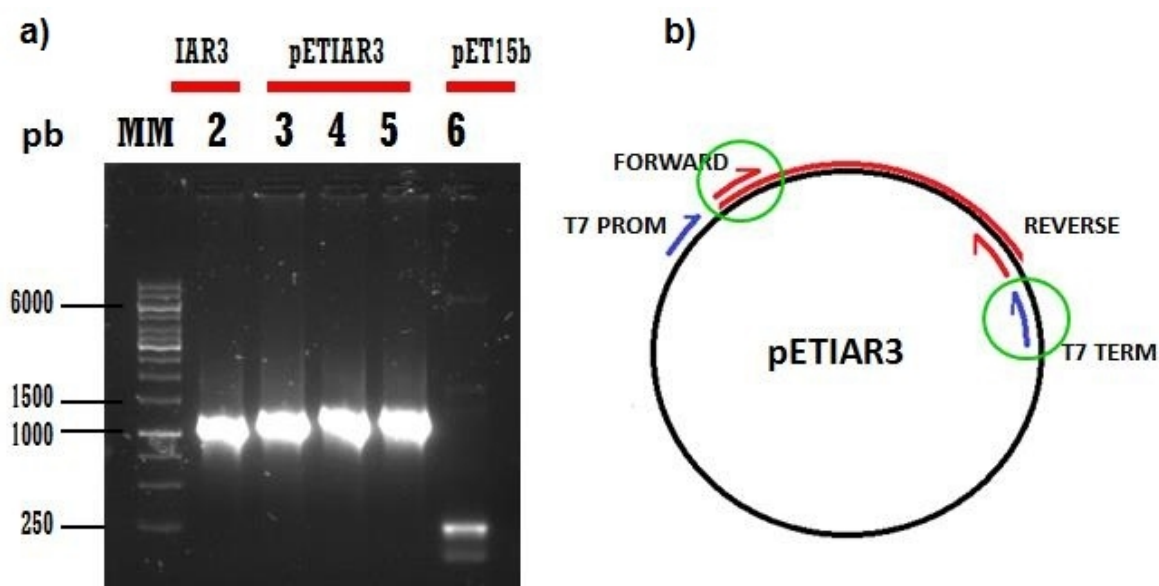


Figura 3.9 Comprobación por PCR de la orientación correcta del inserto. a) Gel de electroforesis de ADN en agarosa 1% (p/v), carriles 3, 4 y 5 bandas positivas obtenidas de las clonas; carriles 2 y 6, testigos a partir de ADNc y a partir de PET15b vacío respectivamente; carril 1, marcador molecular de 1Kb. b) Mapa del plásmido obtenido y los cebadores usados. Las flechas encerradas en verde muestran los cebadores usados (FwCclAR3 y T7 terminador) para comprobar la

orientación; “FwCclAR3” y “RvCclAR3” son los cebadores específicos usados para amplificar el testigo positivo a partir de ADNc; T7 promotor y T7 terminador son los cebadores universales usados para amplificar el testigo de pET15b vacío.

3.1.6 SECUENCIACIÓN

Con el fin de asegurarnos de tener el resultado más exacto, nos encargamos de secuenciar a partir de ambos extremos es por ello que se usaron ambos iniciadores universales T7 promotor y T7 terminador de cada clona obtenida.

Los resultados de la secuenciación fueron alineados con la secuencia de *Cc/AR3* depositada en la base de datos de café (<http://coffee-genome.org/>) para comparar y verificar la fidelidad obtenida en cada una de las clonaciones usando el programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

La alineación mostró que todas las secuencias obtenidas correspondían con la secuencia de *Cc/AR3* depositada en el genoma con un porcentaje mayor al 90 por ciento de identidad. En la mayoría de los casos el extremo tres prima era la que difería en gran medida de la secuencia original pero se debía a los errores inherentes de la secuenciación. Es por ello que se tomó la medida de enviar por ambos extremos. Tras un ensamblaje de los dos extremos constatamos que el porcentaje de identidad incrementaba en gran medida y que solo había una diferencia de un par de nucleótidos. Aquí sólo se muestran los resultados de la secuencia de pETIAR3-3 (Figs. 3.10 y 3.11).

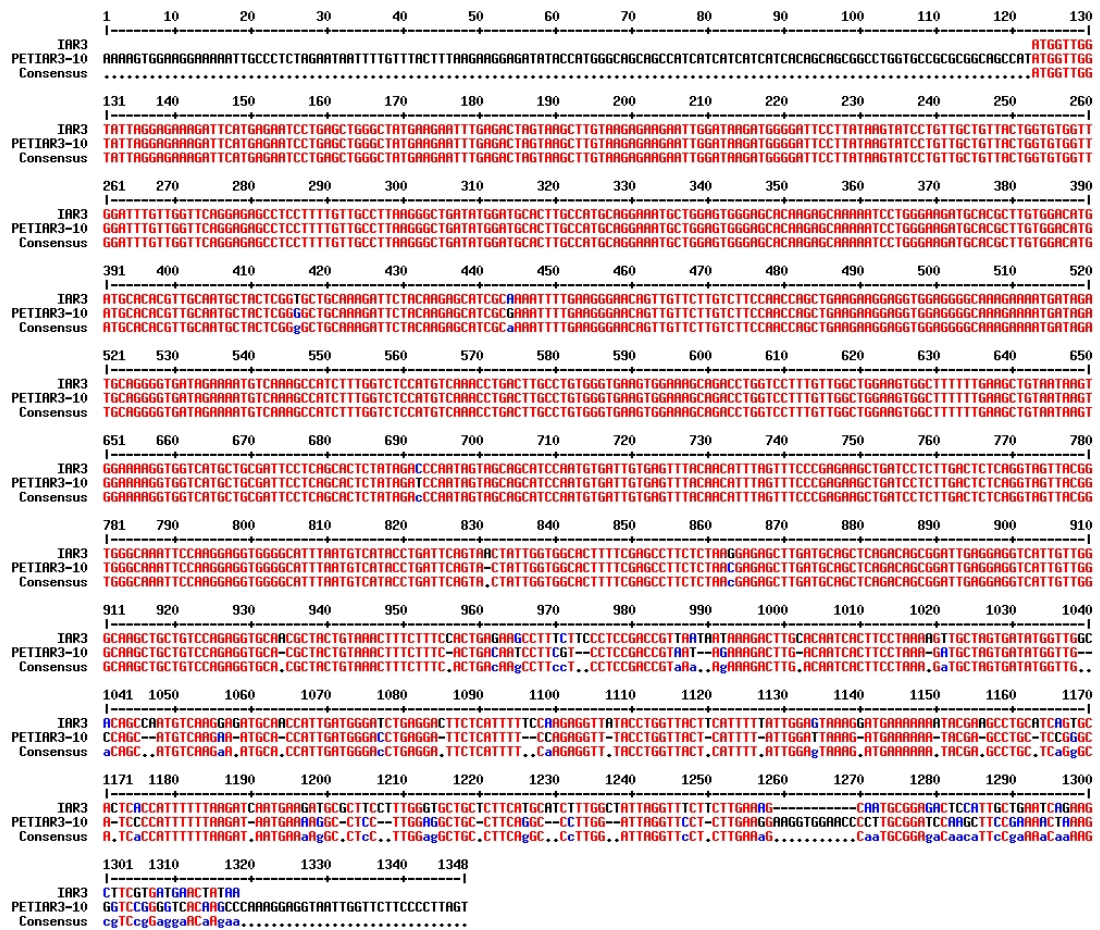


Figura 3.10 Alineamiento de la secuencia pETIAR3-10 obtenida tras la secuenciación y la secuencia depositada en la base de datos de café. El iniciador usado en la secuenciación fue el cebador universal T7 promotor.

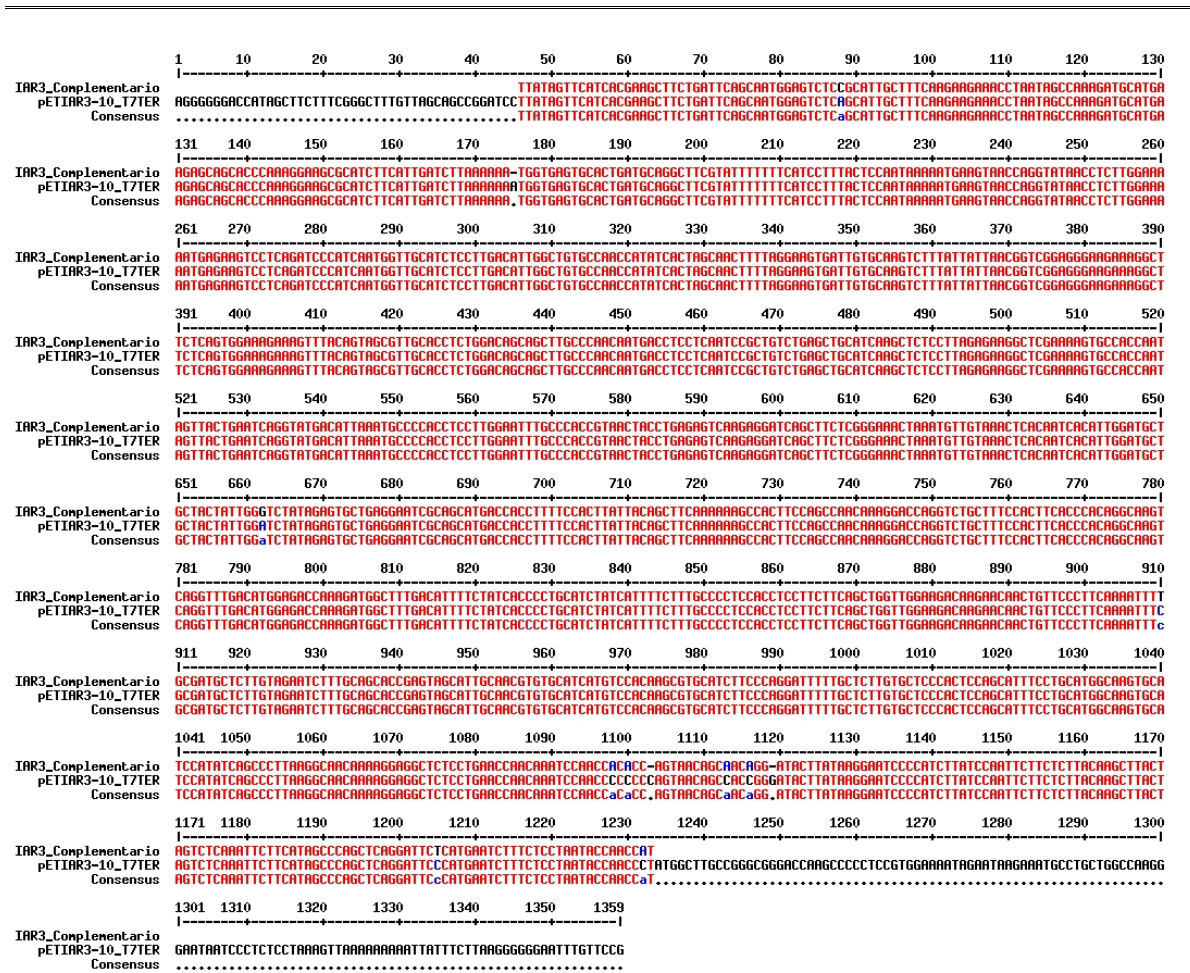


Figura 3.11 Alineamiento de la secuencia pETIAR3-10 obtenida tras la secuenciación y la secuencia complementaria de *CcIAR3* de café. El iniciador usado en la secuenciación fue el cebador universal T7 terminador.

3.1.7 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

Se analizaron las secuencias de los distintos genes de amidohidrolasas presentes en el genoma, se encontró el tamaño del marco de lectura abierto de los nucleótidos de cada gen, el tamaño en aminoácidos que codifican, y la masa molecular teórica de cada hidrolasa (Tabla 3.2). El tamaño varía desde 28 KDa para la hidrolasa más pequeña (ILL1) hasta casi 49 KDa para la hidrolasa más grande (ILL2). La masa teórica de IAR3 es de 42.76 KDa mientras que la masa promedio de estas hidrolasas es de 37.8 KDa.

También se analizó la secuencia de aminoácidos y se encontró que todos los residuos de

aminoácidos involucrados en la catálisis de IAR3 en *Arabidopsis thaliana* están conservados en todas las proteínas de las otras especies comparadas. Entre los cuales se encuentran además de *Arabidopsis* y *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Glycine max*, *Brassica napus*, *Solanum lycopersicum*, *Medicago truncatula*, y *Brassica rapa* en ese orden.

Cuadro 3.2 Tamaño en nucleótidos y aminoácidos de la familia de amidohidrolasas presentes en café.

Amidohidrolasa	Tamaño en nucleótidos (pb)	Tamaño en aminoácidos (aa)	KDa
ILL2	1353	450	48.983
IAR3	1185	394	42.760
ILL6	1053	350	38.226
ILR1	966	321	34.856
ILL5	924	307	33.499
ILL1	801	266	28.486

Los aminoácidos con función de unir metales para su catálisis son los ácidos aspártico, glutámico y la histidina y estos aminoácidos están conservados en todas las secuencias (cuñas en rojo). En la figura 3.12 se muestra que los aminoácidos conservados en *Coffea canephora* son el ácido aspártico 62, el ácido aspártico 90, el ácido glutámico 123, la histidina 147 y la histidina 350. Los aminoácidos que están dentro del sitio activo son los ácidos aspártico y glutámico y también se encuentran conservados en todas las proteínas analizadas (verde). Los aminoácidos en café son los ácidos aspártico 64, y glutámico 122.

También se encontró una secuencia consenso en el carboxilo terminal (H o K) DEL, el

cual es propia de las proteínas que son retenidas dentro del lumen del retículo endoplásmico, lo cual sugiere que estas proteínas tengan una función dentro de este organelo.

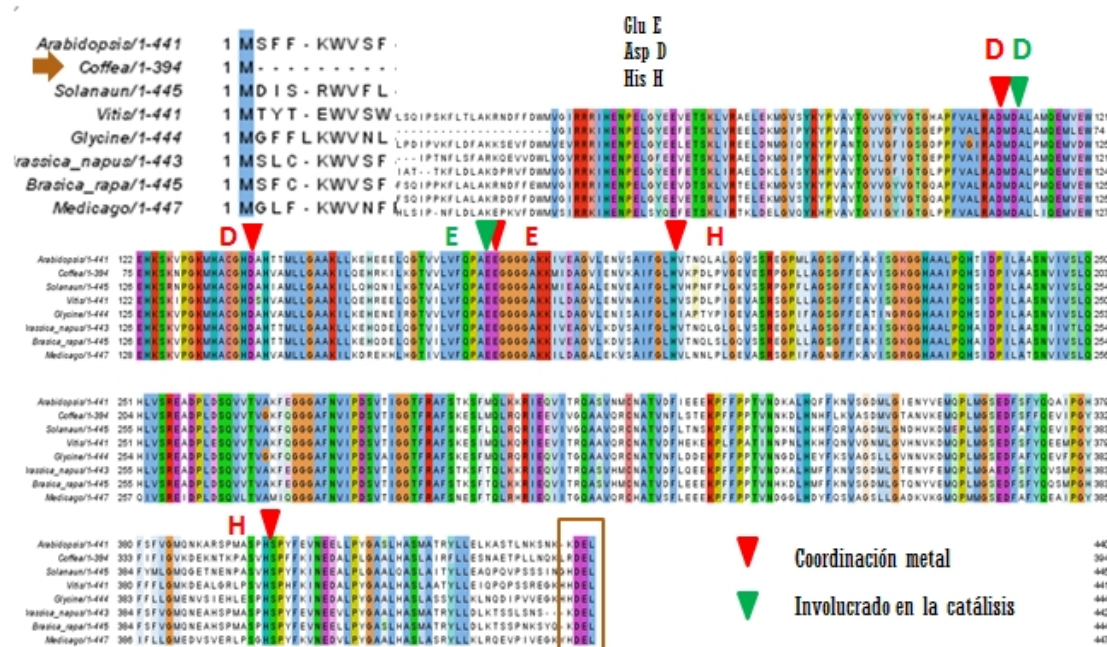


Figura 3.12 Alineamiento de aminoácidos de la proteína IAR3 con otras secuencias homologas. Los aminoácidos señalados con la cuña roja son los aminoácidos que en teoría están involucrados en la coordinación de iones divalentes, mientras que los aminoácidos señalados con las cuñas verdes son los que están involucrados directamente en la catálisis según el consenso.

3.1.8 OBTENCIÓN DE LA PROTEINA RECOMBINANTE His-IAR3

Una vez que nos aseguramos que teníamos las construcciones correctas de los plásmidos se llevó a cabo la expresión de dos de las tres clonas que teníamos disponibles, se utilizaron las clonas pETIAR3-3 y pETIAR3-10, para ellos probamos dos diferentes cepas de bacterias de expresión, la cepa BL21/pKJE7 y Roseta II de *E. coli*.

La primera cepa usada para expresar la proteína recombinante fue BL21/pKJE7. El análisis de las fracciones solubles e insolubles indicó que ambas proteínas (CclAR3-3 e CclAR3-10) se expresaban principalmente como agregados proteicos insolubles y solo

una mínima cantidad se podía encontrar en la fracción soluble (Fig. 3.13). Después de hacer pasar la fracción soluble de ambas proteínas a través de la columna de níquel y realizar la elución con 500 mM de imidazol no se encontró suficiente proteína en ninguno de los dos casos.

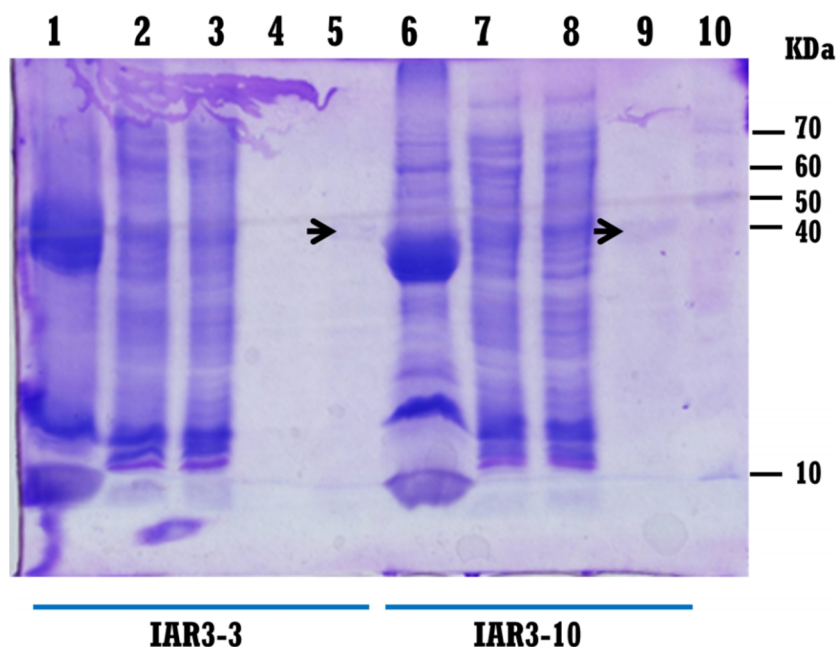


Figura 3.13 Expresión y purificación de la proteína recombinante CclAR3 usando *E. coli* BL21/pKJE7. Carriles 1-5, son fracción insoluble, fracción soluble, fracción no unida a la columna, tercer lavado con 40 mM de imidazol y la elución con 500 mM de imidazol en ese orden, pertenecientes a la purificación de CclAR3-3. Carriles 6-9, son fracción insoluble, fracción soluble, fracción no unida a la columna y la elución con 500 mM de imidazol pertenecientes la purificación de CclAR3-10.

Con la cepa Rosetta II se obtuvieron datos similares a la cepa anterior, la mayor cantidad de proteína seguía permaneciendo en mayor cantidad en la fracción insoluble pero con un bandeo mejor definido y una mínima cantidad en la fracción soluble (Fig. 3.14). Tras hacer pasar la fracción soluble a través de la columna de níquel seguido de la elución con 500 mM de imidazol no se observó ninguna banda clara correspondiente al tamaño de IAR3. Adicionalmente, se observó que había una diferencia de tamaño entre las dos proteínas

expresadas, una masa aproximada de 45 KDa para CclAR3-3 y una de 40 KDa para CclAR3-10, sugiriendo que había una diferencia en la secuencia de los vectores usados que significaban cambios en el marco de lectura.

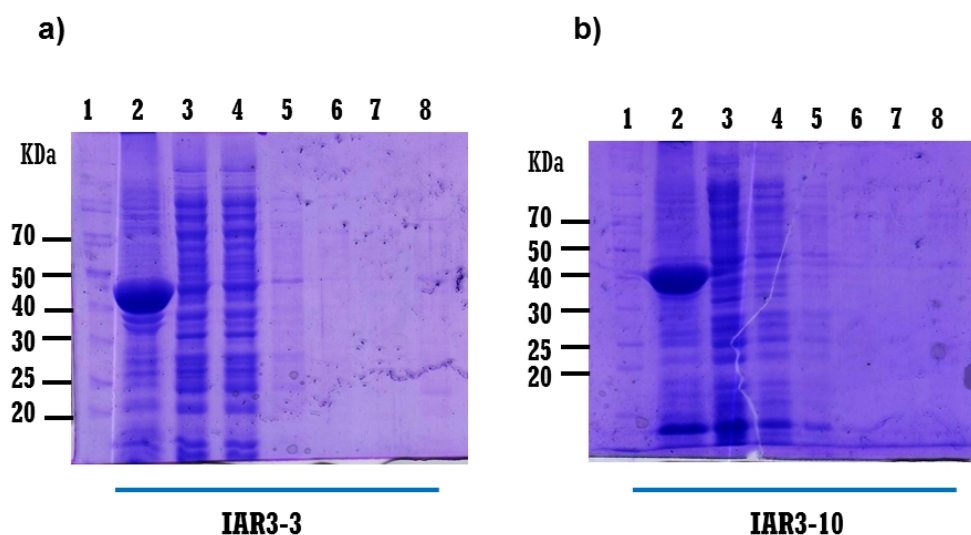


Figura 3.14 Expresión y purificación de la proteína recombinante CclAR3 con la cepa Roseta 2. A) fracciones correspondientes a purificación de CclAR3-3. Carril 1, marcador molecular; carriles 2, 3 y 4, fracciones insoluble, soluble y no unida a la columna, respectivamente; carriles 5, 6 y 7 lavado con 5, 20 y 40 mM de imidazol; carril 8, elución con 500 mM de imidazol. B) fracciones correspondientes a la purificación de CclAR3-10. Carril 1, marcador molecular; carriles 2, 3 y 4, fracciones insoluble, soluble y no unida a la columna respectivamente; carriles 5, 6 y 7 lavado con 5, 20 y 40 mM de imidazol; carril 8, elución con 500 mM de imidazol

Debido a que en ninguna de las dos cepas usadas se expresaban en la fase soluble como se había esperado inicialmente, se decidió solubilizar la proteína que estaba contenida en los cuerpos de inclusión usando urea 7 M y Tritón X-100 0.1% y así poder pasarla a través de la columna de níquel. Las muestras usadas en este proceso fueron los agregados proteicos insolubles pertenecientes a la cepa roseta 2 debido a que tenían una banda mejor definida tras su expresión. Tras la solubilización de los agregados proteicos se prosiguió a dializar la muestra con la proteína para retirar el exceso de urea y Tritón, y proceder a purificar la proteína. En la figura 3.15a se muestra la diferencia más notable de tamaños entre CclAR3-3 (carril 2) e CclAR3-10 (carril 3) después de la solubilización de

los agregados proteicos.

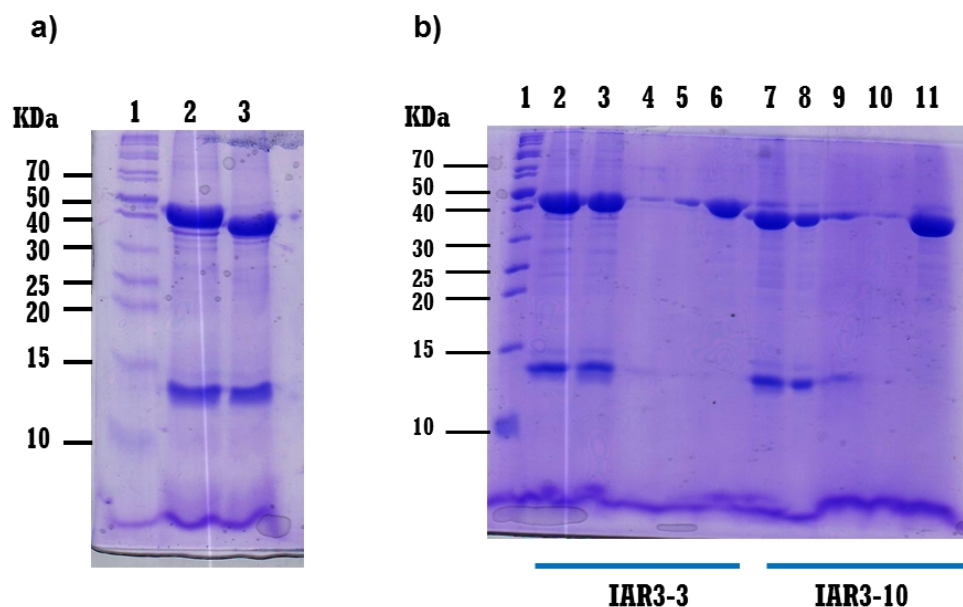


Figura 3.15 Purificación de la proteína recombinante CclAR3 a partir de la fracción insoluble expresada con la cepa Rosetta 2. **a)** Agregados proteicos solubilizados con urea y tritón X-100. Carril 1, marcador molecular; carriles 2 y 3, agregados proteicos pertenecientes a CclAR3-3 e CclAR3-10 respectivamente tratados con urea 7 M y tritón X-100 0.1%. **b)** Purificación de CclAR3-3 e CclAR3-10 después del tratamiento de las fracciones insolubles con urea 7 M y Tritón X-100. Carril 1, marcador molecular; carril 2, fracción insoluble de CclAR3-3 tratado con urea y Tritón X-100; carril 3, fracción de CclAR3-3 no unida a la columna; carriles 4 y 5, lavados con 20 y 40 mM de imidazol respectivamente; carril 6, elución de la proteína recombinantes CclAR3-3 con 500 mM de imidazol. carril 7, fracción insoluble de CclAR3-10 tratado con urea y tritón X-100; carril 8, fracción de CclAR3-10 no unida a la columna; carriles 9 y 10, lavados con 20 y 40 mM de imidazol respectivamente; carril 11, elución de la proteína recombinantes CclAR3-10 con 500 mM de imidazol.

En la figura 3.15b podemos notar la solubilización de ambas proteínas (carriles 2 y 7) y las fracciones no unidas (carriles 3 y 8). El análisis de estas fracciones muestran que una gran cantidad de proteína no es retenida dentro de la columna y una parte se pierde

después de los dos últimos lavados tanto en CclAR3-3 como en CclAR3-10, a pesar de ello se logra una purificación eficiente de ambas proteínas (carriles 6 y 11).

Para asegurarnos que teníamos a la proteína recombinante CclAR3 producto de la expresión realizamos el análisis de Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-histidinas. En la figura 3.16 se observa la comprobación de la obtención de la proteína recombinante CclAR3-3, tanto CclAR3-3 como CclAR3-10 fueron positivos por Western blot.

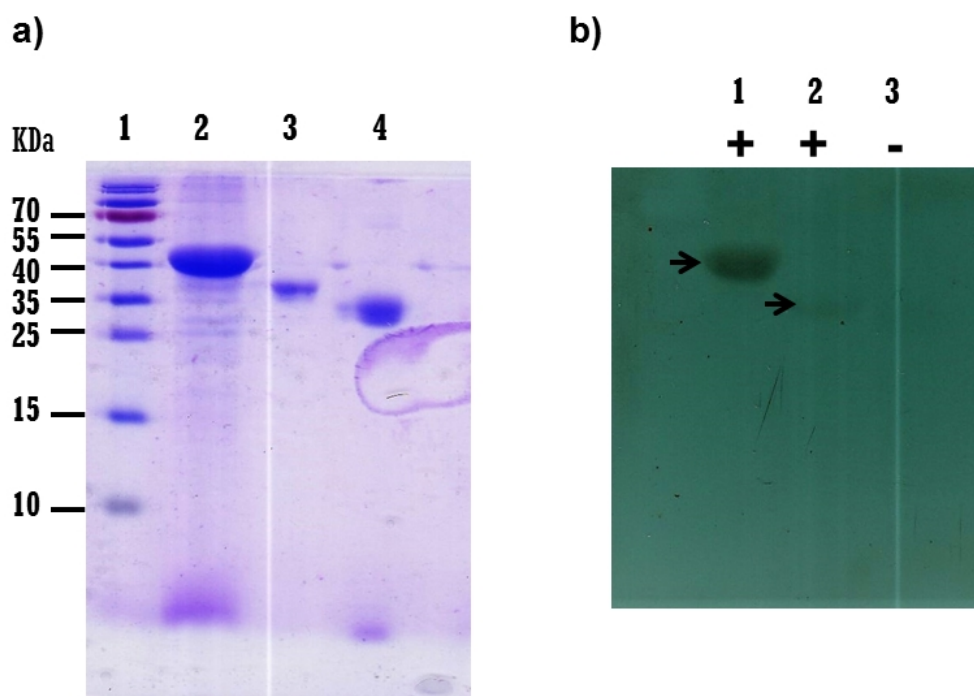


Figura 3.16 Análisis de corroboración de la proteína recombinante por Western blot. **a)** SDS-PAGE de tres proteínas puras. Carril 1, marcador molecular; carril 2, proteína His-CclAR3-3 pura; carril 3, proteína His-TIM (Triosa fosfato isomerasa); carril 4, TIM sin cola de histidinas. **b)** Western blot del gel anterior. Carril 1, His-CclAR3-3 (positivo); carril 2, His-TIM (positivo); carril 3, TIM sin cola de histidinas (negativo).

Con el fin de averiguar cuál era el motivo de la diferencia de tamaños entre CclAR3-3 e CclAR3-10 se realizaron los alineamientos con la secuencia depositada en la base de datos de café. Para ello la secuencia de las clonas en nucleótidos de pETIA3-3 y pETIAR3-10 fueron traducidas a secuencia de aminoácidos y se compararon con la

secuencia traducida de la base de datos de café.

El análisis mostró que con la proteína CclAR3-3 solamente tuvo dos cambios cercanos al amino terminal, el primer cambio fue una asparagina por una lisina, el segundo cambio fue de un ácido glutámico por otra lisina (Fig. 3.17). La masa molecular teórica de la proteína en la base de datos es de 42.76 KDa mientras que la masa molecular teórica de la proteína recombinante es de 44.91KDa esto debido a la masa extra que le otorga la etiqueta de histidinas.

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

IAR3_3      MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMVGIRRKIHENPELGYEEFETSKLVREELDKMGIPYNYPV
CcIAR3      -----MVGIRRKIHENPELGYEEFETSKLVREELDKMGIPYKYPV
              *****

IAR3_3      AVTGVVGVGSGEPPFVALRADMDALAMQEMLEWEHKSKNPGKMHACGDAHVAMLLGAA
CcIAR3      AVTGVVGVGSGEPPFVALRADMDALAMQEMLEWEHKSKNPGKMHACGDAHVAMLLGAA
              *****

IAR3_3      KILQEHREILKGTVVLVFQPAEEGGGAKKMIDAGVIENVKAIFGLHVKPDLPVGESR
CcIAR3      KILQEHREILKGTVVLVFQPAEEGGGAKKMIDAGVIENVKAIFGLHVKPDLPVGESR
              *****

IAR3_3      PGPLLAGSGFFEAVISGKGGHAAIPQHSIDPIVAASNIVSLQHLVSREADPLDSQVTV
CcIAR3      PGPLLAGSGFFEAVISGKGGHAAIPQHSIDPIVAASNIVSLQHLVSREADPLDSQVTV
              *****

IAR3_3      GKFQGGGAFNVIPDSVTIGGTFRAFSKESLMQLRQRIEEVIVGQAAVQRCNATVNFLLSTE
CcIAR3      GKFQGGGAFNVIPDSVTIGGTFRAFSKESLMQLRQRIEEVIVGQAAVQRCNATVNFLLSTE
              *****

IAR3_3      KPFFPPTVNNKDLHNHFLKVASDMVGTANVKEMQPLMGSEDFSFQEVIPGYFIFIGVKD
CcIAR3      KPFFPPTVNNKDLHNHFLKVASDMVGTANVKEMQPLMGSEDFSFQEVIPGYFIFIGVKD
              *****

IAR3_3      EKNTKPASVHSPFFKINEDALPLGAALHASLAIRFLLESNAETPLLNQIKLRDEL
CcIAR3      EKNTKPASVHSPFFKINEDALPLGAALHASLAIRFLLESNAETPLLNQIKLRDEL
              *****

```

Figura 3.17 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CcIAR3-3 recombinante vs CcIAR3 del genoma. Los signos (*) muestran los aminoácidos similares y los signos (:) muestran los aminoácidos que no coinciden con el alineamiento. En el alineamiento se muestran dos cambios de aminoácidos.

El siguiente análisis mostró que la proteína CcIAR3-10 tenía un solo cambio dentro del alineamiento (Fig. 3.18) sin embargo, carecía de 40 aminoácidos esto debido a que se presentó un cambio en el marco de lectura en los últimos 120 nucleótidos de la secuencia de pETAIR3-10 lo que provocó que se insertara de manera errónea un codón de terminación. Por consiguiente el producto proteico es más pequeño con respecto a la secuencia de la reportada en la base de datos. La masa teórica de la proteína recombinante IAR3-10 es de 40.54 KDa incluyendo la masa de la etiqueta de histidinas.

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

CcIAR3      -----MVGIRRKIHENPELGYEEFETSKLVREELDKMGIPYKYPV
IAR3-10     MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMVGIRRKIHENPELGYEEFETSKLVREELDKMGIPYKYPV
              *****

CcIAR3      AVTGVVGVFVSGEPFVALRADMDALAMQEMLEWEHKSKNPGKMHACGDAHVAMLLGAA
IAR3-10     AVTGVVGVFVSGEPFVALRADMDALAMQEMLEWEHKSKNPGKMHACGDAHVAMLLGAA
              *****

CcIAR3      KILQEHKILKGTVVLVFQPAEEGGGAKKMIDAGVIENVKAIFGLHVKPDLPVGEVESR
IAR3-10     KILQEHREILKGTVVLVFQPAEEGGGAKKMIDAGVIENVKAIFGLHVKPDLPVGEVESR
              *****

CcIAR3      PGPLLAGSGFFEAVISGKGGHAAIPQHSIDPIVAASNIVSLQHLVSRREADPLDSQVVTV
IAR3-10     PGPLLAGSGFFEAVISGKGGHAAIPQHSIDPIVAASNIVSLQHLVSRREADPLDSQVVTV
              *****

CcIAR3      GKFQGGGAFNVIPDSVTIGGTFRAFSESLMQLRQRIEEVIVGQAAVQRCNATVNFLSTE
IAR3-10     GKFQGGGAFNVIPDSVTIGGTFRAFSESLMQLRQRIEEVIVGQAAVQRCNATVNFLSTE
              *****

CcIAR3      KPFFPPTVNNKDLHNHFLKVASDMVGTANVKEMQPLMGSEDFSFQEVIPGYFIFIGVKD
IAR3-10     KPFFPPTVNNKDLHNHFLKVASDMVGTANVKEMQPLMGSEDFSFQEVIPGYFIFIGVKD
              *****

CcIAR3      EKNTKPASVHSPFFKINEDALPLGAALHASLAIRFLLSNAETPLLNQKLDEL
IAR3-10     EKNTKPASVHSPFF-----
              *****

```

Figura 3.18 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CcIAR3-10 recombinante vs CcIAR3 del genoma. Los signos (*) muestran los aminoácidos similares y los signos (:) muestran los aminoácidos que no coinciden con el alineamiento. En el alineamiento se muestra un solo cambio de aminoácidos, sin embargo, la secuencia de CcIAR3-10 permanece incompleta con respecto a CcIAR3.

3.3 DISCUSIÓN

Una de las principales características del AIA, principal regulador de la ES, es que puede conjugarse con aminoácidos, azúcares y proteínas. El 95% del total de auxina en la planta se encuentra en forma conjugada y solo una pequeña cantidad esta en forma libre y por lo tanto activa. A pesar de ello la planta puede rápidamente cambiar la concentración de auxina respondiendo a diversos estímulos externos o necesidades que ella requiera. El mecanismo por el que la planta logra abastecerse rápidamente de auxina activa es mediante la hidrólisis de estos conjugados y los principales protagonistas de dicho mecanismo son las amidohidrolasas. Estas enzimas son piezas clave dentro del panorama metabólico de las auxinas y son responsables de una rápida respuesta por parte de la planta a señales dependientes a este regulador. Han sido descritas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas y entre todas ellas IAR3 es la enzima que posee más especies ortólogas que cualquier otro miembro de la familia de las hidrolasas, por lo que se sugiere es el más conservado (Campanella et al., 2003).

Nuestro análisis es consistente con este dato ya que gran parte de la secuencia de aminoácidos de CclAR3 en *C. canephora* está altamente conservado.

Estas hidrolasas estructuralmente pertenecen a la familia de las peptidasas M20, proteínas que típicamente tienen dos cationes en su centro activo (Ludwig-Müller, 2011). El análisis del alineamiento muestra que CclAR3 pertenece a esta familia y que tiene al menos cinco residuos de aminoácidos relacionados directamente con la coordinación de los iones, los cuales son el ácido aspártico (D) 62 y 90, ácido glutámico (E) 123 y las histidinas (H) 147 y 350, mientras que solo dos residuos están involucrados en la catálisis de manera directa, el ácido aspártico (D) 64 y el ácido glutámico (E) 122. En la hidrolasa ILL2 de *A. thaliana* se ha sugerido la identificación de la cisteína (C) 137, ácido glutámico (E) 173 y la histidina (H) 397 que une al primer cofactor mientras que la cisteína (C) 137, la histidina (H) 139 y 197 como segundo sitio de unión del cofactor (Bitto et al., 2009).

Se ha reportado que mutaciones de la histidina 405 de una hidrolasa de bacteria, el cual corresponde a la histina 397 de ILL2 deja una completa pérdida de la actividad enzimática (Bitto et al., 2009). Por lo que nos deja de manifiesto el papel central que tiene la histidina en la unión del cofactor.

Se ha establecido de manera experimental que estas hidrolasas pueden usar Mn^{2+} o Cu^{2+} como cofactores (LeClere et al., 2002) por lo que se sugiere que la hidrolasa CclAR3 pueda usar estos mismos cofactores.

Adicionalmente la enzima CclAR3 tiene una secuencia característica (H/KDEL) en el extremo carboxilo terminal el cual es propio de proteínas que se encuentran dentro del lumen del retículo endoplásmico. Esta secuencia es compartida por la mayoría de las hidrolasas en *A. thaliana* (Davies et al., 1999) y otras hidrolasas estudiadas en otras especies (Campanella et al., 2003) por lo que sugiere que estas enzimas puedan estar hidrolizando conjugados dentro del retículo endoplásmico. Debido a que en *C. canephora* CclAR3 es la única proteína que contiene esta secuencia es probable que las demás hidrolasas sean proteínas de citosol.

A pesar que hay evidencia bioinformática que indica la localización de estas enzimas dentro de lumen del retículo endoplásmico o citosol no existe evidencia experimental que manifieste la localización a nivel celular de cualquiera de estas hidrolasas de AIA (Ludwig-Müller, 2011). Pero un dato interesante que apoya esta sugerencia es el hecho que el transportador de auxina PIN5 tenga un papel en el flujo de auxina del retículo endoplásmico hacia el citosol (Friml y Jones, 2010). Esto implicaría que el AIA pueda entrar y salir libremente del retículo endoplásmico y con ello la posibilidad que el AIA pueda ser conjugado por posibles enzimas GH3 localizada al interior del retículo endoplásmico y ser desconjugados por las amidohidrolasas localizadas en el retículo endoplásmico como es el caso de CclAR3 en *C. canephora*.

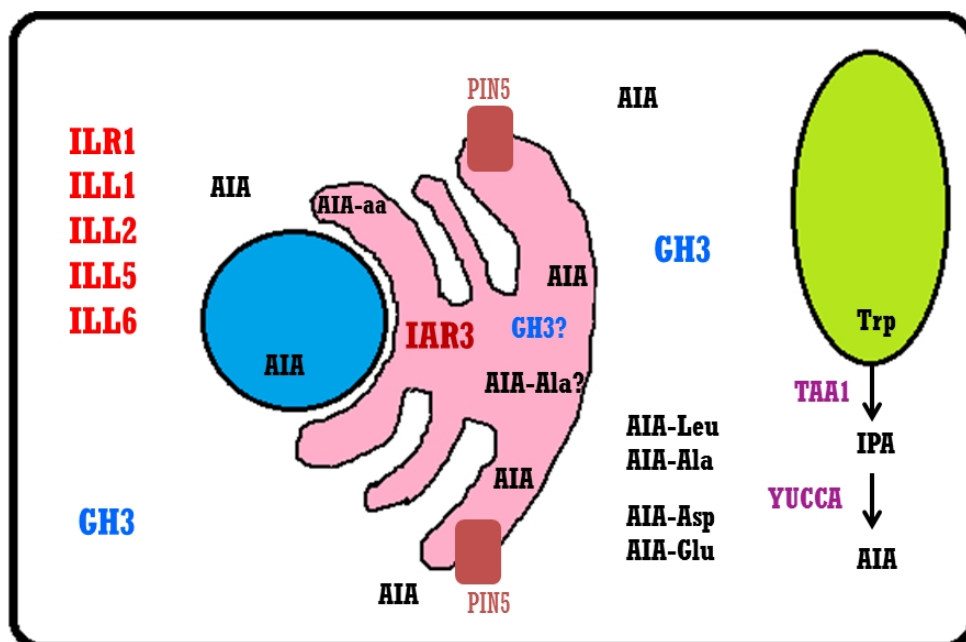


Figura 3.19 Panorama general del posible metabolismo de AIA dentro de la célula en *C. canephora*. Este diagrama toma en cuenta las enzimas TAA1 y YUCCA de la biosíntesis de AIA; las hidrolasas de AIA ILR1, ILL1, ILL2, 1LL5 e 1LL6; las amidosintetasas GH3; y a PIN5 un transportador de AIA. Además del AIA libre también se observa intermediarios de la ruta de biosíntesis de AIA y varios de sus conjugados.

CcIAR3 codifica para una proteína de aproximadamente 42 KDa mientras que su homólogo en *A. thaliana* tiene un tamaño aproximado de 48 KDa (Davies et al., 1999)

Por otra parte realizando una comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas recombinantes obtenidas contra la secuencia de *CcIAR3* en la base de datos del genoma de *C. canephora* se notaron sustituciones en dos residuos de aminoácidos en *CcIAR3*-3 y solamente una en *CcIAR3*-10 sin embargo en ésta última hubo un truncamiento de la secuencia de los últimos 40 aminoácidos debido a que se insertó de manera errónea un codón de terminación provocado por un cambio en el marco de lectura en los últimos 120 nucleótidos.

Pese a ello en ninguna de las dos proteínas recombinantes se presentaron cambios en residuos de aminoácidos que pudieran estar involucrados en la catálisis.

En el caso de *CcIAR3*-10 valdría la pena analizar la actividad enzimática con el fin de

estudiar su funcionalidad, cabe resaltar que a pesar de que hubo un truncamiento de su secuencia ningún aminoácido implicado en la catálisis resultó afectado.

A diferencia de otros trabajos en donde las amidohidrolasas recombinantes se expresaron de manera exitosa en la fracción soluble del extracto de *E. coli* (Davies et al., 1999), (LeClere et al., 2002) las amidohidrolasas CclAR3-3 y CclAR3-10 recombinantes que se aislaron en este trabajo se encontraron mayoritariamente en la fracción insoluble formando cuerpos de inclusión probablemente debido a la sobreexpresión del gen por el vector empleado reduciendo la eficiencia en el plegamiento y conformación estructural de la proteína.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

CclAR3 es una proteína que está altamente conservada en la mayoría de su secuencia de aminoácidos con respecto a otras amidohidrolasas estudiadas.

CclAR3 tiene al menos cinco residuos de aminoácidos relacionados directamente con la coordinación de los iones, los cuales son el ácido aspártico (D) 62 y 90, ácido glutámico (E) 123 y las histidinas (H) 147 y 350, mientras que solo dos residuos están involucrados en la catálisis de manera directa, el ácido aspártico (D) 64 y el ácido glutámico (E) 122

Se sugiere que CclAR3 puede actuar en el lumen del retículo endoplásmico debido a que presenta una secuencia K/HDEL, el cual se ha visto conservado en varias proteínas propias del lumen de este organelo.

La proteína recombinante IAR3-3 que se obtuvo en este trabajo tiene una masa aproximada de 45 KDa con cambios en dos de sus aminoácidos con respecto a la reportada en el genoma e IAR3-10 que solo presentó la diferencia en uno solo de sus residuos pero con un tamaño aproximado de 40 KDa debido a que se añadió por error un codón de terminación en los últimos 40 aminoácidos.

4.2 PERSPECTIVAS

Una vez obtenida la proteína recombinante el siguiente paso es llevar a cabo los ensayos de actividad enzimática para establecer las condiciones de pH, temperatura y cofactores. Finalmente deberá llevarse a cabo la cinética enzimática de la enzima con el fin de determinar la afinidad de la enzima por alguno de los dos sustratos conocidos, AIA-Ala o AIA-Leu.

También deberá llevarse a cabo la cristalización de la proteína CclAR3. Esto permitirá comparar entre si las estructuras terciarias de las hidrolasas, tanto en presencia como en ausencia del sustrato.

Será muy importante clonar, expresar y purificar cada una de las amidohidrolasas presentes en el genoma del cafeto, así como llevar a cabo ensayos de cinética enzimática con el fin de obtener un panorama global sobre el comportamiento de estas enzimas y su regulación y participación durante la ES.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayil-Gutiérrez, B., R. M. Galaz-Avalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Bajguz, A. y A. Piotrowska (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70, 957-969.
- Bartel, B. y G. R. Fink (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 268, 1745-1748.
- Bitto, E., C. A. Bingman, L. Bittova, N. L. Houston, R. S. Boston, B. G. Fox y G. N. Phillips (2009). X-ray structure of ILL2, an auxin conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins*, 74, 61-71.
- Campanella, J. J., J. Ludwig-Müller, V. Bakllamaja, V. Sharma y A. Cartier (2003). ILR1 and sILR1 IAA amidohydrolase homologs differ in expression pattern and substrate specificity. *Plant Growth Regulation*, 41, 215-223.
- Campanella, J. J., A. F. Olajide, V. Magnus y J. Ludwig-Müller (2004). A novel auxin conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. *Plant Physiology*, 135, 2230-2240.
- Carneiro, M. F. (1997). Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica*, 96, 167-172.
- Carneiro, M. F. (1999). Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechNet*, 1, 1-7.
- Davies, R. T., D. H. Goetz, J. Lasswell, M. N. Anderson y B. Bartel (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 11, 365-376.
- De Jong, A. J., E. D. L. Schmidt y S. C. De Vries (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22, 367-377.
- De los Santos-Briones, C. y S. M. T. Hernández-Sotomayor (2006). Coffee biotechnology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 217-227.
- Del Castillo, L., M. L. Robert, A. Larqué y I. Higuera (2009). CICY: treinta años de labor científica y educativa, CICY, Mérida. 356 p.
- Dudits, D., L. Bögre y J. Györgyey (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science*, 99, 473-482.

-
- Eckardt, N. A. (2001). New insights into auxin biosynthesis. *The Plant Cell*, 13, 1-3.
- Friml, J. y A. R. Jones (2010). Endoplasmic reticulum: The rising compartment in auxin biology. *Plant Physiology*, 154, 458-462.
- Komamine, A., N. Murata y K. Nomura (2005). Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41, 6-10.
- Korasick, D. A., T. A. Enders y L. C. Strader (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2541-2555.
- LeClere, S., R. Tellez, R. A. Rampey, S. P. T. Matsuda y B. Bartel (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 20446-20452.
- Ljung, K., R. P. Bhalerao y G. Sandberg (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28, 465-474.
- Ljung, K., A. K. Hull, M. Kowalczyk, A. Marchant, J. Celenza, J. D. Cohen y G. Sandberg (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 50, 309-332.
- Ljung, K., A. K. Hull, J. Celenza, M. Yamada, M. Estelle, J. Normanly y G. Sandberg (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 17, 1090-1104.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1757-1773.
- Mano, Y. y K. Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2853-2872.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Neuenschwander, B. y T. W. Baumann (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 10, 608-612.
- Nomura, K. y A. Komamine (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology*, 79, 988-991.
- Ouyang, J., X. Shao y J. Li (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis*

-
- thaliana*. The Plant Journal, 24, 327-334.
- Park, W. J., V. Kriechbaumer, A. Muller, M. Piotrowski, R. B. Meeley, Gierl A. y E. Glawischnig (2003). The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. Plant Physiology, 133, 794-802.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2, a001446.
- Quiroz-Figueroa, F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Reports, 20, 1141-1149.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006a). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86, 285-301.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006b). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: Plant cell culture protocols, Loyola-Vargas, V. M. y F. A. Vázquez-Flota, (eds). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 111-117.
- Rampey, R. A., S. LeClere, M. Kowalczyk, K. Ljung, G. Sandberg y B. Bartel (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. Plant Physiology, 135, 978-988.
- Ruiz Rosquete, M., E. Barbez y J. Kleine-Vehn (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. Molecular Plant, 5, 772-786.
- Schmidt, E. D. L., F. Guzzo, M. A. J. Toonen y S. C. De Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development, 124, 2049-2062.
- Seidel, C., A. Walz, S. Park, J. D. Cohen y J. Ludwig-Müller (2006). Indole-3-acetic acid protein conjugates: novel players in auxin homeostasis. Plant Biology, 8, 340-345.
- Sharp, W. R., M. R. Söndahl, L. S. Caldas y S. B. Maraffa (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Horticultural Review, 268-310.
- Simon, S. y J. Petrásek (2011). Why plants need more than one type of auxin. Plant Science, 180, 454-460.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 81, 395-408.
- Söndahl, M. R., L. C. Monaco y W. R. Sharp, (1981). *In vitro* methods applied to Coffee, en: Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture, Thorpe, T. A.,
-

-
- (ed). Academic Press. New York. pp. 325-347.
- Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Botanica Neederlandica*, 19, 509-514.
- Sundberg, E. y L. Ostergaard (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1, a001628.
- Tomas, A. y C. Perrot-Rechenmann (2010). Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 297-306.
- Williams, E. G. y G. Maheswaran (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57, 443-462.
- Won, C., X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory y Y. Zhao (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 18518-18523.
- Woodward, A. W. y B. Bartel (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735.
- Yang, X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 36-57.
- Zhao, Y., A. K. Hull, N. R. Gupta, K. A. Goss, J. Alonso, J. R. Ecker, J. Normanly, J. Chory y J. L. Celenza (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development*, 16, 3100-3112.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 49-64.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5, 1411-1423.