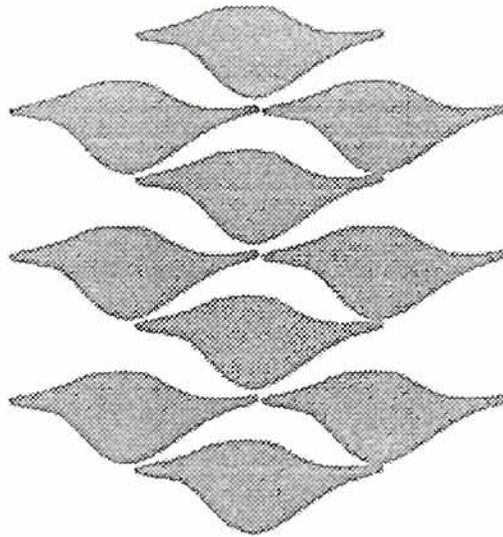




**"IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE
LAS PROTEÍNAS G Y SU RELACIÓN CON LA
FOSFOLIPASA C EN EL MECANISMO DE
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE CÉLULAS
VEGETALES."**



DRA. TERESA HERNANDEZ-SOTOMAYOR

INFORME FINAL

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN



UNIDAD DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Mérida Yuc. a 2 de diciembre de 1999

DR. JAIME MARTUSCELLI
DIRECTOR ADJUNTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MÉXICO, D. F.

Estimado Dr. Martuscelli:

Anexo a la presente el reporte final del proyecto "IDENTIFICACION DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LAS PROTEINAS G Y SU RELACION CON LA FOSFOLIPASA C EN EL MECANISMO DE TRANSDUCCION DE SEÑALES DE CELULAS VEGETALES", 4119P-N9608.

Agradeciendo la atención que preste a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



DRA. TERESA HERNANDEZ SOTOMAYOR
DIRECTORA DEL PROYECTO

CONACYT
RECIBIDO
DIC. 2 1999
RECIBIDO
DAIC

CICY

29 NOV 1999

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
DE YUCATAN, A. C.
DIRECCION GENERAL



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.

DRA. MA. TERESA HERNANDEZ SOTOMAYOR
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL

UNIDAD DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Mérida Yuc. a 2 de diciembre de 1999

DR. JAIME MARTUSCELLI
DIRECTOR ADJUNTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MÉXICO, D. F.

Estimado Dr. Martuscelli:

Anexo a la presente el reporte final del proyecto "IDENTIFICACION DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LAS PROTEINAS G Y SU RELACION CON LA FOSFOLIPASA C EN EL MECANISMO DE TRANSDUCCION DE SEÑALES DE CELULAS VEGETALES", 4119P-N9608.

Agradeciendo la atención que preste a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DRA. TERESA HERNANDEZ SOTOMAYOR
DIRECTORA DEL PROYECTO

pesar de haber obtenido algunas clonas positivas, la secuencia de estas no arrojó ninguna similitud con una proteína G. Respecto a la clonación de la fosfolipasa C a la fecha se tienen nuevas clonas positivas que serán secuenciadas para determinar si alguna de ellas se asemeja a la enzima. Los resultados de esta parte de la investigación están integrados en la tesis de maestría de Lucila Sánchez.

La meta 2, referente a estudiar la regulación de la fosfolipasa C por proteínas G ha sido cumplida al 100% (Suárez-Solis et al. 1998, Hernández-Sotomayor et al. 1998).

La meta 3 también ha sido cumplida en un 100% ya que se tiene 1 estudiante de licenciatura titulado, uno de doctorado titulado y dos de maestría que están por presentar su examen de grado.

POR CUMPLIR: La meta 1 esta cubierta parcialmente, a la fecha se tienen clonas positivas de los genes de la fosfolipasa C las cuales están siendo secuenciadas.

En general, el avance del proyecto en un año ha sido bastante satisfactorio ya que logramos demostrar regulación de la enzima fosfolipasa C por proteínas G, lo cual fue aceptado para su publicación en *Physiol. Plant.* y también se realizó un estudio cinético completo de esta enzima, lo cual ha sido publicado en la revista *Plant Physiol.*

Tesis desarrolladas bajo este proyecto y grado de avance.

1. Víctor M. Suárez-Solis, IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LAS PROTEÍAS G EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus*. Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY. DOCTORADO, fecha de examen 24 de abril de 1998.

2. Lucila Aurelia Sánchez Cach, CLONACION DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA FOSFOLIPASA C EN RAICES TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus* LINEA J1.

Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY. MAESTRIA (100%). Tesis en proceso de revisión.

3. María Luisa Piña Chable, EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOLIPASA C EN RAICES TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus*, Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY. MAESTRIA, Fecha probable de examen: 13 de diciembre de 1999.

Trabajos presentados en congresos.

1. Carrillo-Pech M. R., J. A. Muñoz-Sánchez and S. M. T. Hernández-Sotomayor, Inhibitory regulation of phospholipase C by G-protein activators, VII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: II Symposium México-Estados Unidos, Guanajuato, Gto, 15-18 de marzo de 1998.

2. Hernández-Sotomayor S. M. T., J. A. Muñoz-Sánchez, C. De Los Santos-Briones, M. L. Piña-Chable, M. R. Carrillo-Pech, L. Sánchez-Cach, S. Sharma and V. M. Loyola-Vargas, Regulation of phospholipase C by G-proteins in higher plants, VII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: II Symposium México-Estados Unidos, Guanajuato, Gto, 15-18 de marzo de 1998 (POR INVITACION).

3. Sánchez-Cach L., y S. M. T. Hernández-Sotomayor, Evidencia de la presencia a nivel genómico de la fosfolipasa C en células vegetales, VII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: II Symposium México-Estados Unidos, Guanajuato, Gto, 15-18 de marzo de 1998.

4. Hernández-Sotomayor S. M. T., C. de los Santos Briones, A. Muñoz-Sánchez and V. M. Loyola-Vargas, Kinetic analysis of phospholipase C from *Catharanthus roseus*

transformed roots using different assays, Annual Meeting of the American Society of Plant Physiol., Madison WI, USA, 27 de junio al 1 de julio de 1998.

5. Hernández-Sotomayor S. M. T. , C. de los Santos Briones, A. Muñoz-Sánchez and V. M. Loyola-Vargas, Estudio cinético de la fosfolipasa C de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Mérida, Yuc., 1-6 de noviembre de 1998.

Artículos con resultados del proyecto

Suárez-Solis M., M. R. Carrillo-Pech, J. A. Muñoz-Sánchez, R. Coria-Ortega and S. M. T. Hernández-Sotomayor, Presence of guanine nucleotide-binding proteins in *Catharanthus roseus* transformed roots, *Physiologia Plantarum*, 105: 593-599 (1999).

Hernández-Sotomayor S. M. T., De Los Santos-Briones C., Muñoz-Sánchez J. A. and Loyola-Vargas V. M., Kinetic analysis of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots using different assays, *Plant Physiol.*, 120: 1075-1081 (1999).

TERMINADO EL PROYECTO CONSIDERA:

A) QUE SE OBTUVIERON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS ORIGINALMENTE

Se cumplieron todos los objetivos con la excepción de la clonación del gen de la subunidad alfa, lo cual técnicamente presentó muchos problemas que a pesar de las varias estrategias que se realizaron no se pudieron resolver.

B) QUE ES UN ALINEA DE INVESTIGACION CONCLUIDA, O BIEN SURGIERON NUEVOS PROBLEMAS NO CONTEMPLADOS ORIGINALMENTE

No es una línea de investigación concluida, por el contrario los resultados que surgieron de esta investigación han generado una serie de interrogantes los cuales requieren de continuar con estos experimentos para resolver preguntar como son:

¿Cuál es el activador fisiológico de las proteínas G presentes en las raíces transformadas de *C. roseus*?

¿En qué proceso fisiológico participa la enzima fosfolipasa C en las raíces transformadas de *C. roseus*?

C) QUE LA LINEA DE INVESTIGACION REALIZADA DIO LUGAR O PUEDE DAR LUGAR EN EL FUTURO A APLICACIONES, PATENTES, PLANTAS PILOTO, PROTOTIPOS, ETC.

No, es un proyecto de ciencia básica que tuvo como productos publicaciones de alto nivel y la formación de recursos humanos a nivel maestría y doctorado.

COMENTARIOS GENERALES AL PROYECTO

Específicamente el principal objetivo de este proyecto fue el de investigar la función de la enzima fosfolipasa C y la subunidad alfa de las proteínas G en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

Utilizando membranas de raíces transformadas de *C. roseus* línea J1, ha sido posible identificar la presencia de proteínas capaces de unir nucleótidos de guanosina. En fracciones microsomales se observaron varias proteínas en un intervalo de masa molecular de 17 a 79 kDa, que presentan la capacidad de unir GTP marcado radiactivamente. También se aplicaron otras metodologías para determinar la presencia de las proteínas G heterotrómicas, tales como la ADP-ribosilación y el uso de anticuerpos contra la subunidad alfa. Con estas metodologías se observó que había proteínas en este mismo intervalo de peso molecular las cuales son sustrato para la

toxina del cólera y que los anticuerpos contra la subunidad alfa, fueron capaces de detectar varias proteínas.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto aportan evidencias para sugerir que en las raíces transformadas de *C. roseus* existe regulación de la fosfolipasa C por las proteínas G ya que en presencia de distintos activadores de estas, tales como iones de flúor, magnaesio, nucleótidos de guanina, mastoparan y ácido indol acético se observaron diferentes efectos sobre la actividad enzimática de la enzima *in vitro*.

En presencia de toxinas bacterianas como la del *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis*, las cuales modifican covalentemente a las proteínas G, también fue observada una respuesta en la actividad de la enzima fosfolipasa, al parecer en el sistema estudiado, la regulación de la actividad de la fosfolipasa *in vitro* es a través de proteínas G sensibles a la toxina del cólera pero insensibles a la toxina pertussis.

Debido a que la parte experimental para clonar los genes avanzaba lento y estaba presentando serias dificultades técnicas, se decidió estudiar otros aspectos de la regulación de la enzima como son el efecto de las poliaminas y el aluminio, además de que se incorporaron al proyecto una estudiante de maestría (Maria Luisa Piña Chable y una estudiante de doctorado Ileana Echeverría Machado). Dentro de los resultados más relevantes de esta parte se encuentran los siguientes:

El aluminio es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre. Generalmente se encuentra en forma de aluminosilicatos y conforme el pH del suelo disminuye se solubiliza. La toxicidad del aluminio ha sido reconocida como el factor limitante más importante para la producción agrícola en suelos ácidos. El síntoma principal de la toxicidad por aluminio es la inhibición del crecimiento de las raíces. El aluminio se puede depositaar en la pared celular, pero también es capaz de atravesar la membrana plasmática y entrar al citoplasma de las células. Aún no se conoce cuál

es el mecanismo de toxicidad del Al, se ha propuesto que el Al interacciona con el citoesqueleto, con la calmodulina y con algunos de los elementos de los mecanismos de transducción de señales. En esta parte del proyecto se estudió el efecto del Al sobre la actividad de la enzima PLC proveniente de raíces transformadas de *C. roseus*. También se realizaron estudios para conocer el efecto del Al sobre el crecimiento de estas raíces. Los resultados más relevantes fueron la inhibición de la actividad de la PLC en ensayos *in vitro*, con una IC_{50} de 0.1mM; en ensayos *in vivo* esta misma concentración de Al inhibió la actividad enzimática en períodos cortos de incubación. La adición del $AlCl_3$ en una concentración de 1 mM al inicio del ciclo de cultivo, produjo una inhibición del crecimiento de las raíces transformadas de alrededor del 50% y también inhibió la actividad de la PLC durante todo el ciclo de cultivo.

CLONACION DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LA PROTEINA G.

Utilizando el protocolo de CTAB el ADN genómico se extrajo de cultivos *in vitro* de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* que son mantenidas en un medio de cultivo de Gamborg ó B5 pH 5.7 (FIG. 1).

En una primera estrategia para aislar y clonar el gen de la $G\alpha$ realizamos experimentos con la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando varias combinaciones de 6 diferentes oligonucleótidos que contienen regiones conservadas de $G\alpha$ de otros sistemas como levaduras, animales y *Arabidopsis thaliana* (Condiciones: 94°C-5min, 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min, 72°C-10min), los fragmentos amplificados los visualizamos en geles de agarosa 0.8% (FIG. 2).

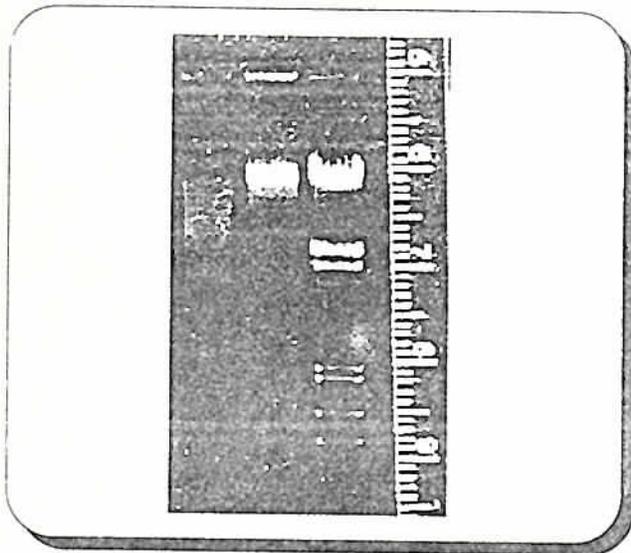


FIG.1 ADN genómico de *C. roseus*.

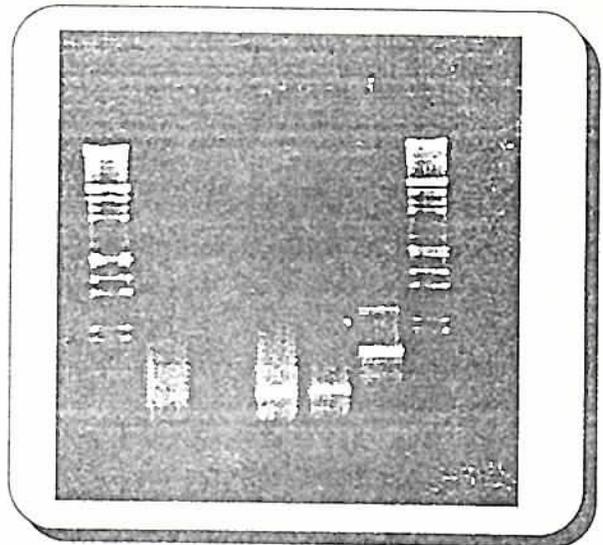


FIG.2 Productos de PCR amplificados con los oligos 1-2,1-3,1-5,16 y 4-6 clonados en pCRII.

Posteriormente realizamos la ligación de los productos de la PCR a un vector pCRII (3.9 Kb), luego con este plásmido transformamos células competentes de *E. coli* (DH5 α), del crecimiento de estas colonias hicimos la extracción del plásmido-ADN, lo desarrollamos en un gel de agarosa 1% y lo transferimos a una membrana de nylon y, realizamos una reacción de hibridación con una sonda de $G\alpha$ de *A. thaliana* previamente marcada con ^{32}P , en las películas de autoradiografía se observamos señal de hibridación en 11 colonias (clasificadas a-k).

En una electroforesis confirmamos la presencia del plásmido en estas 11 colonias, y realizamos una amplificación de cada inserto por medio de una PCR (94°C-5min, 94°C-1min, 45°C-1min, 72°C-1min, 72°C-10min), utilizando las combinaciones de oligos 1-5 y 4-6. Como resultado observamos que en el caso de la clona g se generó un fragmento de 0.5kb y para las clonas b, c y k se obtuvo un fragmento de 0.55kb (FIG.3a y b). Se realizó la reacción de secuenciación de estas cuatro clonas (b, c, g, k) utilizando ^{35}S -dATP. De la búsqueda en diferentes bancos de datos de homología de las secuencias resultantes, no encontramos resultados positivos que nos indicaran haber obtenido algún fragmento del gen de nuestro interés.

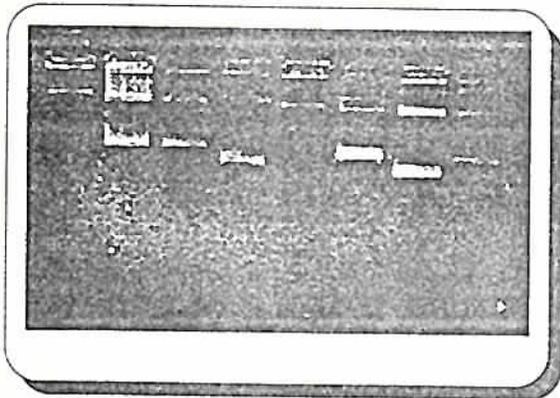


FIG. 3a. Plásmidos de clonas positivas de hibridación con $G\alpha$ de *A. thaliana*; De izquierda a derecha las clonas a,b,c,d,e,g,h,k.

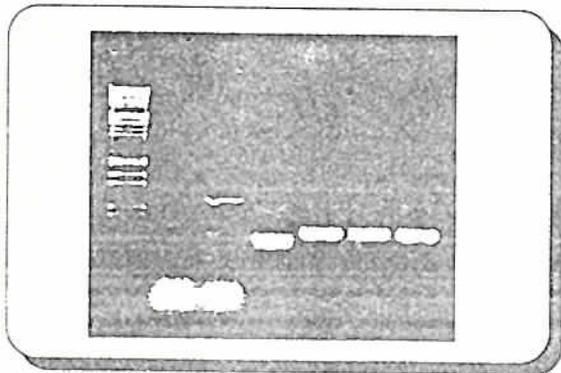


FIG. 3b. Insertos liberados de las clonas positivas de hibridación con $G\alpha$ de *A. thaliana*; En orden de izquierda a derecha: marcadores, clonas d,h,g,k,c,b.

En una nueva estrategia utilizamos el ADN genómico de *C. roseus* y cuatro sondas de $G\alpha$ (*A. thaliana*, *K. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y $G\alpha$ de hígado de rata) para experimentos de Southern (FIG. 4); desarrollando varias electroforesis establecimos las condiciones de pureza y concentración iniciales de la muestra. Luego realizamos la digestión del ADN genómico (70 μ g) utilizando una batería de enzimas de restricción que incluyen Bam HI, Eco RI, Pst I, Xba I y Xho I, después el ADN digerido fue separado en un gel de agarosa 1% y se transfirió a una membrana de nylon durante 8 horas. Hicimos un control positivo cargando en el gel 15 pmoles del ADN de *A. thaliana*.

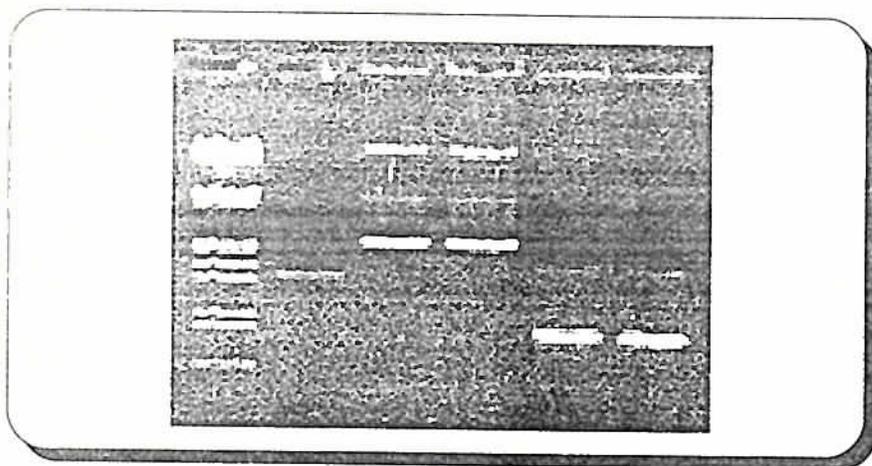


FIG.4 Sondas de $G\alpha$ de diversos organismos, de izquierda a derecha: marcadores, *S. cerevisiae*, hígado de rata, *k. lactis* y *A. thaliana*.

Posteriormente el ADN transferido se sometió a una prehibridación con ADN inespecífico de esperma de salmón durante 2 horas a 50°C. La sonda fue marcada con ³²P-dCTP utilizando el protocolo de Random primer (GIBCO), después realizamos la reacción de hibridación con la sonda marcada a 50°C durante toda la noche y, luego la membrana se lavó tres veces con una solución astringente SSC 2X y SDS al 1% (65°C durante 10 minutos). La membrana se expuso durante una hora en un cartucho de fotografía y se reveló en un equipo automático de revelado STORM (BioRad) (FIG. 5a y b).

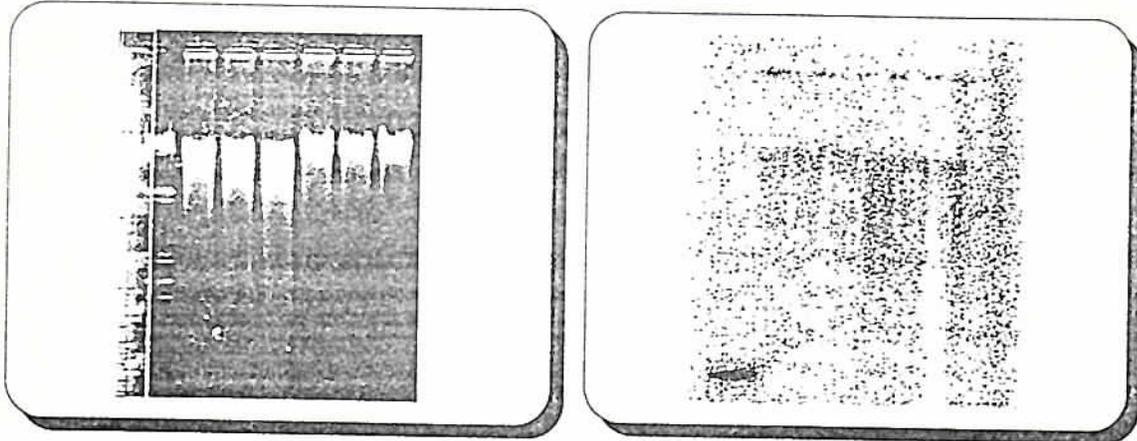


FIG. 5a. ADN genómico de *C. roseus* digerido (70µg). De izq. a der. marcadores, Bam HI, Eco RI, Hind III, PstI, Xba I, Xho I y Control positivo. En el panel derecho se presenta la autoradiografía del southern blot utilizando la sonda de *A. thaliana*.

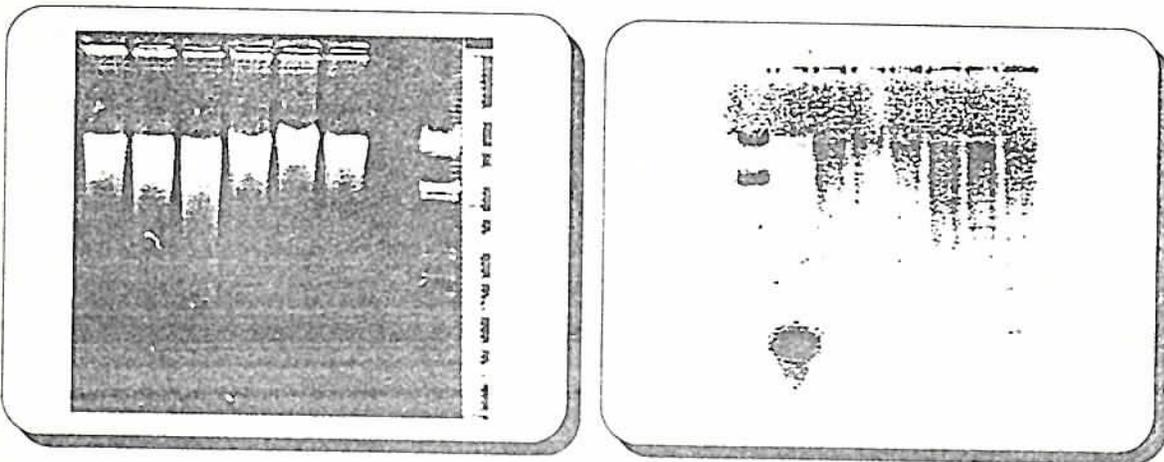


FIG. 5b. Electroforesis de dobles digestiones del ADN genómico de *C. roseus* (70µg) hechas con marcadores, Bam HI, Eco RI, Hind III, PstI y Xba I, PstI y Xho I, Xba I y Xho I por último el Control positivo. En el panel derecho se presenta la autoradiografía del southern blot utilizando la sonda de *A. thaliana*.

Con el objetivo de encontrar la señal de hibridación más intensa en esas condiciones, realizamos varias modificaciones entre las cuales están el uso de algunas dobles digestiones (Pst I y Xba I; Pst I y Xho I; Xba I y Xho I), modificamos la cantidad del ADN genómico en la digestión, utilizamos una mezcla de las cuatro sondas, realizamos modificaciones en la condición de astringencia en los lavados de la membrana con el ADN hibridado, en el tiempo de hibridación y de exposición.

Como resultado seleccionamos el fragmento de ADN que dió señal de hibridación positiva con un tamaño aproximado de 1.5 Kb, este fue generado en la doble digestión con Xba I y Xho I. De la fracción del gel que incluía los fragmentos del ADN entre 1.3 y 1.6 Kb de tamaño, purificamos el inserto con el protocolo del GeneClean (perlas de vidrio y Ioduro de sodio). Como siguiente paso realizamos la clonación de este fragmento de ADN dentro de un vector Bluescript (2.9 Kb). Un vector que fue linearizado con las enzimas Xba I y Xho I, esto se verificó en un gel de agarosa 1%, luego desfosforilamos los extremos del vector con una fosfatasa alcalina de camarón. Realizamos una reacción de ligación a 16°C utilizando el vector Bluescript desfosforilado y el ADN purificado (inserto). Con el producto de la ligación transformamos bacterias *E. coli* (DH5 α) utilizando el protocolo de choque térmico.

Después de encontrar las concentraciones adecuadas del vector y el inserto (FIG. 6a y b) y, con un rendimiento elevado en el crecimiento de colonias transformadas realizamos varias siembras de estas colonias por duplicado en medio de cultivo LB-agar-ampicilina, para hacer experimentos de hibridación con la sonda de $G\alpha$ de *A. thaliana*. Transferimos el ADN de estas colonias directamente a membranas de nylon, luego estas membranas las incubamos con la sonda y las lavamos en condiciones de baja astringencia para luego exponerlas en una película de autoradiografía. 20 colonias de cada placa presentaron señal positiva de hibridación, se marcaron, se seleccionaron las 13 señales más intensas y se sembraron de manera individual en otras placas con medio de crecimiento nuevo.

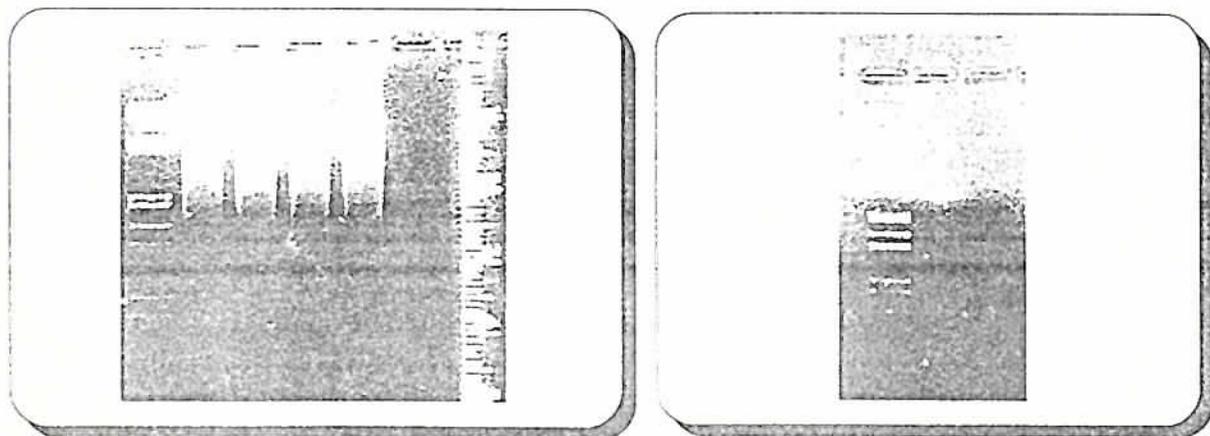


FIG. 6a. A la izquierda se presenta el ADN genómico digerido con Xba I y Xho I para purificar el fragmento entre 1.3 y 1.7 kb. A la derecha se presenta el plásmido Bluescript linearizado.

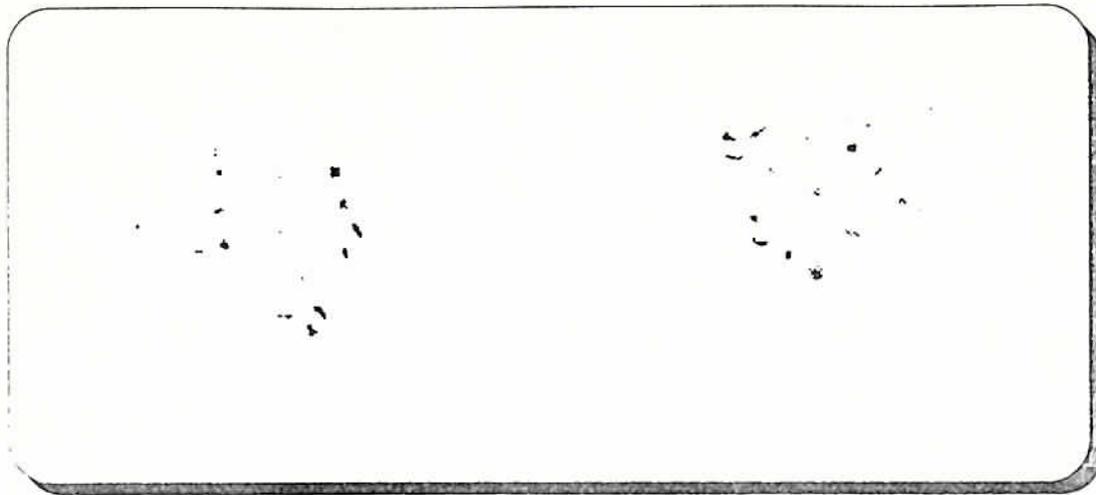


FIG. 6b. Colonias con señal de hibridación positiva con la sonda de $G\alpha$ de *A. thaliana*.

Con estas colonias positivas realizamos un nuevo experimento de hibridación comprobando el resultado anterior, posteriormente hicimos el mismo experimento de hibridación con los plásmidos extraídos de estas clonas (FIG. 7a y b). El resultado fue que solo algunas clonas volvieron a indicar hibridación positiva, en esta ocasión las membranas se lavaron en condiciones de alta astringencia. Luego verificamos la presencia del inserto en las clonas positivas y, únicamente en cinco clonas observamos la liberación de un inserto de un tamaño aproximado de 1.3 a 1.6 Kb. Realizamos un nuevo experimento de hibridación con la misma sonda, lavando las membranas en condiciones de alta astringencia, las cinco clonas dieron señal positiva (FIG. 8a y b).

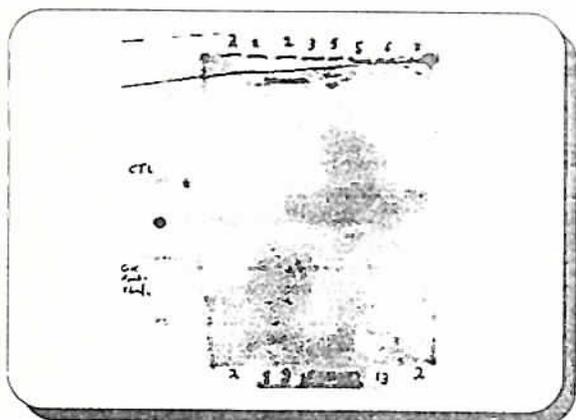


FIG. 7a. Southern del ADN extraído de 13 clonas positivas. De izquierda a derecha arriba: marcadores, 1,2,3,4,5,6 y 7; abajo: marcadores, 8,9,10,11,12, y 13. A la izquierda de la autorradiografía se observa el control positivo.



FIG. 7b. Digestión de los plásmidos de las clonas positivas para observar la presencia del inserto. Únicamente las clonas 1,3,4,12 y 13 presentaron el inserto de ~1.5kb.

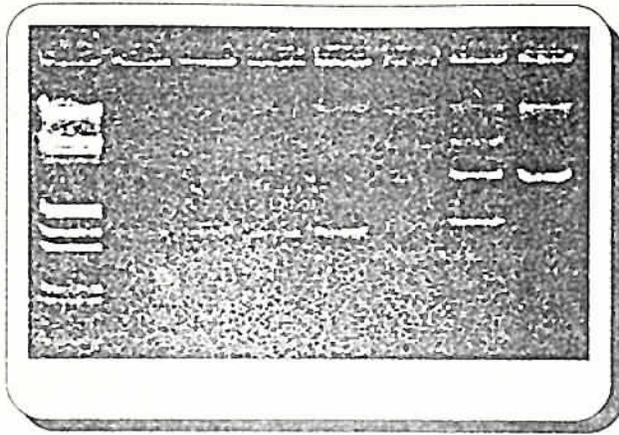


FIG. 8a. Electroforesis de las clonas 1,3,4,12 y 13 de izquierda a derecha con el inserto liberado con Xba I y Xho I.

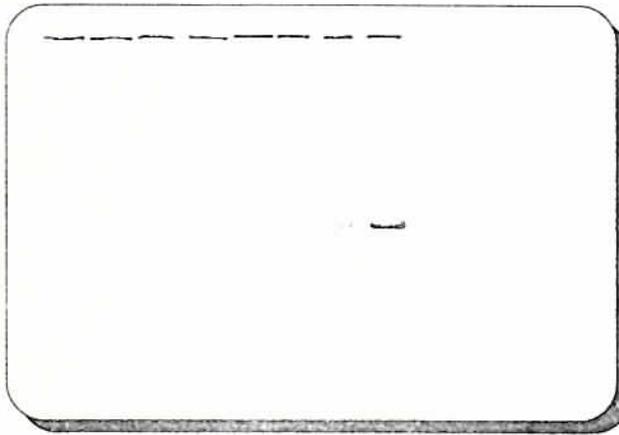


FIG. 8b. Southern con marcadores, las clonas 1,3,4,12 y 13 (de izquierda a derecha) con la sonda $G\alpha$ de *A. thaliana*.

A continuación realizamos la extracción del ADN de estas clonas y cuantificamos su concentración. Este material se envió para su secuenciación a los laboratorios del CINVESTAV-Irapuato y, los resultados en copias se anexan a este informe, después de realizar una búsqueda en las diferentes bases de datos con ninguna de las cinco muestras obtuvimos resultados positivos de homología importante con alguna $G\alpha$.

En conclusión consideramos que se avanzó de manera importante en el manejo y aprendizaje de las diversas técnicas de biología molecular, se tuvo la participación de un estudiante de doctorado, un estudiante de maestría, una estancia de servicio social y de una estancia postdoctoral. La implementación de estas técnicas nos permitió observar indicios positivos en la búsqueda del gen, (se localizaron 4 clonas con hibridación positiva con sondas homólogas de $G\alpha$, hace falta un análisis de secuenciación mas profundo), aún no se ha logrado la clonación del gen y, desafortunadamente el tiempo es nuestra máxima limitante, sin embargo la experiencia adquirida nos va a permitir en un futuro lograr alcanzar el principal objetivo de manera total.