

03072

3  
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.**

**"IDENTIFICACION DE PROTEINAS CON DOMINIOS  
SH3 EN PLANTAS".**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

**BIOL. NELSON AVONCE VERGARA.**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**CUERNAVACA MORELOS 1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A mis compañeros del laboratorio y a todos los miembros del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología/UNAM, prefiero no hacer una lista por temor a olvidarme de alguno.**

**A mi comité tutorial:**

**Dr. Federico Sánchez Rodríguez.  
Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles.  
Dra. Laura Camarena Mejía.**

**A mi comité revisor:**

**Dr. Federico Sánchez Rodríguez.  
Dra. Gladys Cassab López.  
Dra. Yvonne Rosenstein Azoluay.  
Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez.  
Dr. Víctor Valdés López.**

**Al Dr. Federico Sánchez, por la oportunidad que me brindó de colaborar en su grupo de trabajo y por haber contribuido en gran medida en mi formación académica.**

**A CoNaCyT por el apoyo económico que me otorgó durante la realización de la Maestría, mediante la beca con número de registro: 84202.**

**Al Instituto de Biotecnología/UNAM.**

# CONTENIDO

I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	2
II.1.- Dominios SH2.....	5
II.2.- Dominios WW.....	6
II.3.- Dominios PH.....	7
II.4.- Dominios SH3.....	8
II.5.- Función de los Dominios SH3.....	12
II.6.- Proteínas del citoesqueleto con Dominios SH3.....	12
II.7.- SH3 y proteínas G y cinasas de tirosina.....	13
II.8.- Gemación en levaduras.....	15
II.9.- RELACION <i>Rhizobium-Leguminosas</i> .....	16
II.10.- Eventos tempranos de la nodulación.....	16
II.11.- Infección.....	18
III.- ANTECEDENTES-Transducción de señales en plantas.....	
Presencia de algunos transductores de animales.....	22
III.1.- El citoesqueleto.....	24
III.2.- Transducción de señales durante el proceso de organo- génesis del nódulo simbiótico de frijol. Similitudes con procesos mediados por SH3.....	25
IV.- OBJETIVO.....	27
V.- HIPOTESIS.....	27
VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
VII.- RESULTADOS.....	29
VII.1.- Expresión, purificación y marcaje de las proteínas GST-SH3 y GST.....	29
VII.2.- Detección de Proteínas con sitios de unión para dominios SH3.....	30
VII.3.- Detección de Proteínas con dominios SH3.....	34
VII.4.- Complementación de la mutante <i>sls1</i> de levadura.....	35
VII.5.- Detección de secuencias de DNA homólogas a SH3 en <i>M. crystallinum</i> y <i>P. vulgaris</i> .....	37
VII.6.- Tamizados en el banco de cDNA de <i>P. vulgaris</i> , utilizando el producto de PCR marcado radioactivamente como sonda molecular.....	43
VII.7.- RT-PCR-"Differential display".....	43
VIII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	48
IX.- MATERIALES Y METODOS.....	54
IX.1.- Expresión de las proteínas GST-SH3 y GST.....	54

IX.2.- Purificación de las proteínas GST-SH3 y GST.....	54
IX.3.- Biotinación de proteínas.....	55
IX.4.- "Dot blot" con biotina.....	55
IX.5.- Determinación de la concentración de proteínas (biotinadas y no biotinadas).....	56
IX.6.- Cinética de nodulación de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	56
IX.7.- Extracción de proteínas de nódulo.....	57
IX.8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	59
IX.9.- Electrotransferencia de proteínas.....	60
IX.10.- Ensayos de unión a dominios SH3-proteínas con sitios de unión a dominios SH3.....	60
IX.11.- Inmunodetección de proteínas con sitios de unión a SH3.....	61
IX.12.- Detección de proteínas de nódulo de <i>P. vulgaris</i> con dominio(s) SH3.....	61
IX.13.- Titulación del banco de cDNA.....	62
IX.14.- Tamizados del banco de cDNA de nódulo de <i>P. vulgaris</i> para aislar clones que expresen proteínas con sitio(s) de unión a dominios SH3.....	63
IX.15.- Tamizados del banco de cDNA de nódulo de <i>Phaseolus vulgaris</i> para aislar clones que expresen proteínas con dominios SH3.....	65
IX.16.- Transformación de la cepa DDY 495 de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con el banco de expresión de <i>M. crystallinum</i> .....	66
IX.17.- Minipreparaciones de DNA plasmídico.....	69
IX.18.- Amplificación del dominio SH3 de Src.....	70
IX.19.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	71
IX.20.- Purificación de fragmentos de DNA contenidos en geles de agarosa.....	72
IX.21.- Purificación de fragmentos de DNA inmersos en geles de poliacrilamida.....	72
IX.22.- Marcaje radioactivo de sondas de DNA.....	73
IX.23.- Hibridación tipo Southern blot.....	74
IX.24.- RT-PCR-"differential display".....	75
IX.25.- Secuenciación nucleotídica por PCR.....	78
X.- BIBLIOGRAFIA.....	80

## I.- RESUMEN

### IDENTIFICACION DE PROTEINAS CON DOMINIOS SH3 EN PLANTAS.

Las respuestas de los organismos a cambios en el medio ambiente, así como los procesos de crecimiento y desarrollo, requieren de una coordinación celular precisa y exacta. Para elaborar las respuestas, las células utilizan mecanismos moleculares que les permiten percibir y desarrollar una serie de eventos que conducirán a una respuesta específica, lo cual es conocido como vías de transducción de señales.

Dentro de estos mecanismos, las interacciones entre proteínas son primordiales y se llevan a cabo a través de distintos dominios. Los dominios de unión proteína-proteína (SH2, SH3, etc.) son módulos proteicos capaces de reconocer secuencias específicas en sus proteínas blanco. Estos dominios son capaces de dirigir y regular vías de transducción de señales de una manera precisa.

En sistemas animales, se han descrito una gran variedad de proteínas que contienen dominios de unión, mientras que en plantas esto no ha ocurrido. Nosotros nos planteamos el objetivo general de identificar proteínas en plantas con dominios SH3, así como proteínas con el sitio de unión reconocido por estos dominios. Utilizamos como modelo la organogénesis del nódulo simbiótico del frijol *Phaseolus vulgaris*, que se desarrolla durante la interacción con Rhizobia, bacterias fijadoras de nitrógeno. Nuestra hipótesis presume que durante los eventos moleculares que conducen al desarrollo de este nuevo órgano, las vías de transducción de señales que se llevan a cabo pudieran utilizar proteínas con dominios SH3. Se usaron como detectores moleculares, al dominio SH3 de v-Src fusionado a la proteína GST, así como a un conjunto de anticuerpos anti-SH3. También se utilizó la secuencia de nucleótidos del dominio SH3 de v-Src como sonda molecular para detectar secuencias similares en los genomas de *Phaseolus vulgaris* y *Mesembryanthemum crystallinum*.

Los resultados presentados en este trabajo muestran la detección de proteínas en extractos del nódulo del frijol con dominios SH3 y sitios de unión para dominios SH3; así como la detección de secuencias genómicas similares al dominio SH3 de v-Src.

## II.-INTRODUCCION

El éxito de la supervivencia de los organismos eucariontes depende de la habilidad de coordinar a todos los eventos y a todas las células que lo conforman para poder crecer y desarrollarse ordenadamente, así como para percibir y responder a cambios en su medio ambiente. Las respuestas a los cambios en el medio ambiente, son llevadas a cabo por un proceso de estímulo-respuesta, donde el estímulo es percibido por una célula o un grupo de células, y ésta(s) genera(n) señales, las cuales son transmitidas al interior de la célula u otras células donde ocurre un cambio bioquímico. Estos procesos normalmente son rápidos, sensibles y específicos; a menudo involucran la participación de proteínas receptoras que reconocen a los estímulos y a proteínas efectoras que actúan como segundos mensajeros, las cuales son capaces de transmitir la señal y/o amplificarla en el interior celular. Estos elementos que participan en la respuesta a un estímulo regulan su intensidad, actuando de manera positiva o negativa, es decir, promoviendo o restringiendo la transducción de la señal generada.

En sistemas animales, muchos de estos mecanismos se han estudiado en detalle, lográndose conocer muchos de los elementos que conforman las vías de transducción de señales, así como su interconexión con otros procesos celulares (Cohen, et al. 1995). Los sistemas vegetales no han sido estudiados tanto como los animales. El hecho de que las plantas sean sésiles las obliga a afrontar los cambios en el medio ambiente mediante un programa de desarrollo genéticamente flexible y en consecuencia, deben de tener mecanismos más complejos o diferentes a los de los animales. Sin embargo, tanto las plantas como los animales emplean elementos básicos comunes en los mecanismos de transducción de señales, como los segundos mensajeros, la fosforilación y desfosforilación de proteínas, las proteínas G, etc. (Bowler y Chua 1994).

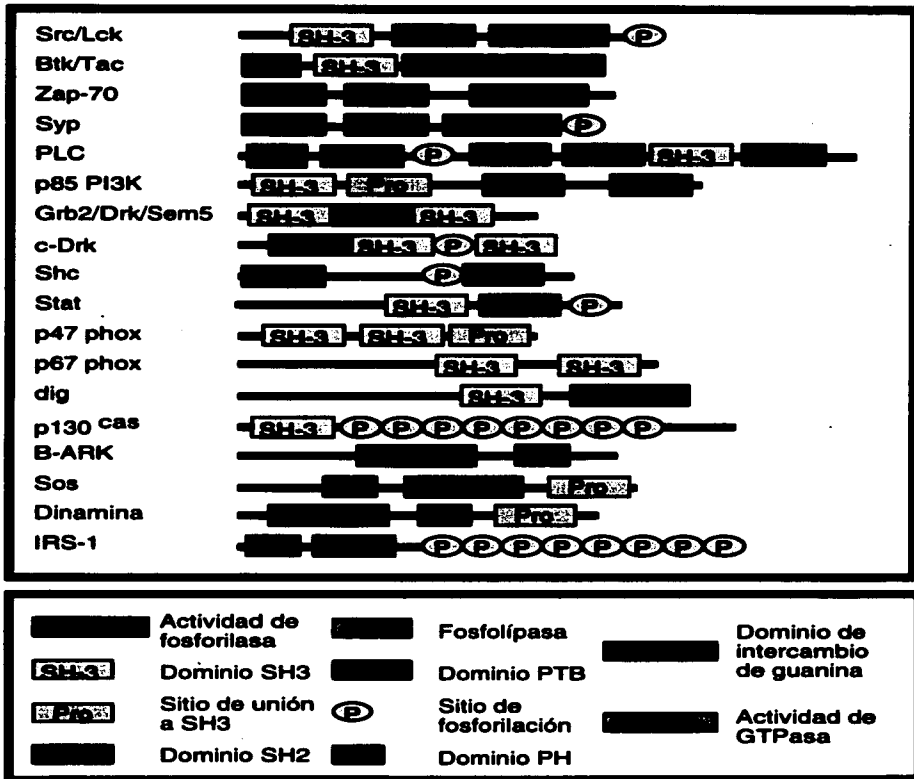
La transducción de señales es un proceso en el cual una señal cambia al pasar de un transductor a otro, conduciéndola a través de la célula. Los primeros pasos descritos en la transducción de señales, involucran el uso masivo de moléculas pequeñas conocidas como "segundos mensajeros". Originalmente el AMPc fue la primera molécula descrita con estas características. Posteriormente, con el descubrimiento de que las proteínas como las cinasas y las fosfatasa son transductores de señales, se concluyó que estos procesos debían ser precisos, capaces de controlar el envío de señales a sus blancos específicos.

A diferencia de las enzimas clásicas, las cuales están diseñadas para modificar un gran número de moléculas sustrato, las proteínas transductoras como las cinasas, fosfatasas, etc., generalmente realizan su actividad sólo en un número limitado de moléculas (su blanco). El dominio catalítico (en caso de transductores con actividad enzimática) se encuentra separado del denominado "dominio de unión", el cual puede funcionar en diferentes procesos: atrayendo sustratos al dominio catalítico, uniéndose a proteínas "corriente arriba" de la vía de transducción o localizando complejos proteicos en regiones subcelulares particulares (Pawson, 1995).

Estos dominios de unión, son módulos proteicos independientes que regulan las interacciones proteína-proteína (Koch, et al. 1991; Pawson, 1995) mediante una estructura que muchas veces es común entre los miembros de un mismo tipo de módulo, acoplado a un control fino de la especificidad, y determinan el sistema de vía de transducción de la señal particular de la que se trate.

Los primeros dominios de unión descritos fueron los SH2 y SH3 (Src homology), los cuales además de encontrarse en la proteína Src, se han encontrado en otras cinasas y en proteínas con diferentes actividades. Muchas de las proteínas que contienen dominios de unión, pueden poseer 2 o más de ellos, frecuentemente de diferente tipo, dándole más versatilidad a la interacción (Fig. 1). A la fecha se han descrito otros dominios de unión proteína-proteína, los PH, WW, y PTB (Cohen, et al. 1995); todos ellos representan módulos regulatorios comunes presentes en muchas vías de transducción de señales y son usados para construir complejas redes de interacciones proteicas (Fig. 1).





**FIGURA 1. ESQUEMA QUE MUESTRA ALGUNAS PROTEINAS CON DOMINIOS INVOLUCRADOS EN TRANSDUCCION DE SEÑALES.**

## II.1.- Dominios SH2.

Los dominios SH2 son módulos proteicos de aproximadamente 100 aminoácidos, que están presentes en proteínas que participan y regulan vías de transducción de señales que involucran al metabolismo de fosfolípidos (Pelicci, et al. 1992), fosforilación y defosforilación de tirosinas (Amrein, et al. 1993), activación de proteínas GTPasas tipo Ras, expresión genética, tráfico de proteínas y estructura del citoesqueleto (Pawson, 1995). Los dominios SH2 son capaces de reconocer y unirse a regiones de otras proteínas que contienen tirosinas fosforiladas (Mayer, et al. 1991). *In vitro*, se ha demostrado que los SH2 se unen a péptidos de 5 a 10 aminoácidos que contienen un residuo de tirosina fosforilado. Cuando la secuencia del fosfopéptido es la óptima para el dominio SH2 empleado, la unión se establece con una afinidad relativamente alta ( $K_d=10-100nM$ ); por el contrario, con fosfopéptidos con secuencias al azar su afinidad es aproximadamente 1000 veces menor (Felder, et al. 1993), y es nula cuando no se encuentra la tirosina fosforilada. La unión al fosfopéptido es bipartita; es decir, se lleva a cabo por dos regiones del dominio SH2 (Pascal, et al. 1994). La primera es una pequeña región de residuos básicos que contiene invariablemente una Arg, la cual forma un puente de hidrógeno con la tirosina fosforilada del sitio de unión. La segunda superficie de contacto tiene una secuencia más variable entre los dominios SH2, y reconoce los residuos que se encuentran inmediatamente hacia el extremo carboxilo de la tirosina fosforilada. De esto se deduce que la tirosina fosforilada es básica para la unión, y que la secuencia que la rodea determina la especificidad de la unión del dominio SH2.

La organización bipartita en la unión del dominio SH2, permite a la fosforilación de la tirosina funcionar como un switch determinante entre todo o nada en la interacción entre el dominio y su sitio de unión. Mientras la secuencia hacia el carboxilo de la tirosina fosforilada determina a que dominio SH2 le corresponde unirse (y en consecuencia a que vía(s) de transducción de señales corresponde). La tirosina fosforilada puede afectar otros procesos en las proteínas que contienen dominios SH2, como la estimulación de la actividad enzimática, relocalización dentro de la célula y aumento de la fosforilación de tirosinas (Pawson, 1995).

Muchas proteínas que contienen dominios SH2 participan en los procesos de transducción de señales que son derivados de la autofosforilación de proteínas receptoras, como los receptores para el

factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR); éstas se unen específicamente a los sitios de fosforilación que se encuentran en los dominios citoplásmicos de estos receptores. Estos receptores pueden tener varios sitios de fosforilación, la principal función de estos sitios, es la unión específica de proteínas citoplásmicas blanco con dominios SH2. Por ejemplo el dominio SH2 de PLC- $\gamma$  reconoce la tirosina fosforilada en la posición 1021 del  $\beta$ -PDGFR; y al hacerlo, la PLC- $\gamma$  se activa e hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. Si se mutageniza el sitio de unión para PLC- $\gamma$  en  $\beta$ -PDGFR, PLC- $\gamma$  es incapaz de unirse y por lo tanto de activarse; sin que se modifique la interacción de otras proteínas que se unen normalmente (Cohen, et al. 1995).

## II.2.- Dominios WW.

Los dominios WW son otro tipo de módulos proteicos capaces de mediar interacciones proteína-proteína; se han encontrado en proteínas sin una aparente función común, sin embargo todas ellas están relacionadas con procesos de señalización o regulación celular (Bork y Sudol 1994; Chen y Sudol 1995; Hoffmann y Bucher 1995; Staub et al. 1996) como distrofina y utrofina (humano, ratón y pollo), RSP5 (*S. cerevisiae*), Nedd4 (ratón), YAP (humano, ratón y pollo), Yo61 (*C. elegans*), YKB2 (levadura), Amoe (Amiba), ess1 (*S. pombe*) y FE65 (rata).

Algunas de estas proteínas contienen además otro tipo de señales de interacción proteína-proteína, como el caso de YAP, la cual mediante una región rica en prolina localizada hacia el extremo carboxilo del dominio WW es capaz de interactuar con el dominio SH3 de la oncoproteína Yes (Sudol, 1994). Otras proteínas como distrofina y utrofina, contienen también dominios de unión a actina (Ahn y Kunkel 1993), lo cual relaciona la función de los dominios WW, con el citoesqueleto, al igual que muchas proteínas que contienen dominios SH2, SH3 y PH.

Estos dominios están constituidos de aproximadamente 40 aminoácidos, de los cuales, solo existen dos residuos estrictamente conservados, se trata de dos residuos de triptófano (W), que dan nombre al dominio WW.

Se han caracterizado proteínas capaces de interactuar con dominios WW (Chen y Sudol 1995, Staub, et al. 1996). Los dominios WW reconocen secuencias ricas en prolina denominadas motivos PY, con el consenso

preliminar PPPXY. Esta secuencia aunque muy parecida a la reconocida por los dominios SH3 (PXXP), difiere lo suficiente para no poder ser reconocida por éstos. Este tipo de secuencias se encuentra representada en proteínas virales como Gag (avian retrovirus) y LMP2 (Epstein Barr virus), ambas proteínas se cree que están involucradas en procesos de transformación celular y modulan proteínas con actividad de cinasas de tirosina (Foster, et al. 1985; Burkhardt, et al. 1992).

### **II.3.- Dominios PH.**

Los dominios PH (Pleckstrin Homology) han sido detectados en un amplio rango de proteínas como las cinasas (de serina/treonina y tirosina), algunas isoformas de fosfolipasa C, algunos reguladores de proteínas G, la dinamina (GTPasa) y varias proteínas de citoesqueleto (Mayer, et al. 1993; Haslam, 1993; Musacchio, 1993; Bender, et al. 1996). Estos dominios están constituidos de aproximadamente 100 residuos, la identidad a nivel de secuencia de aminoácidos es generalmente baja (Musacchio, et al. 1993); sin embargo, las estructuras tridimensionales determinadas para varios dominios PH, muestran que son virtualmente idénticos (Downing, et al. 1994; Macias, et al. 1994; Yoon, et al. 1994; Ferguson, 1994), apoyando la idea que estos dominios constituyen unidades funcionales independientes.

No se sabe mucho al respecto de los ligandos de los dominios PH, se ha reportado que fosfolípidos como el fosfatidilinositol-4,5 bifosfato son capaces de asociarse con los residuos positivamente cargados en una región variable del dominio (Harlan, et al. 1994), de modo que la asociación del dominio PH con su ligando no sería entre proteína-proteína, sino entre proteína-lípido. También se ha encontrado que los dominios PH son capaces de interactuar con la proteína cinasa C (Yuko, et al. 1994) y las subunidades Beta y Gamma de las proteínas G heterodímeras (Touhara, et al. 1994) aunque en esta interacción participa únicamente el extremo carboxilo del dominio y además requiere la intervención de residuos de aminoácidos que no pertenecen al dominio.

A pesar de que no se sabe con certeza la función de los dominios PH, debido a que comparten características de otros dominios de interacción proteína-proteína, que su estructura tridimensional es un módulo independiente (al igual que los dominios SH2 y SH3), y que interactúan con lípidos y proteínas, se postulan como dominios de interacción proteína-

proteína o proteína-lípido que participan en procesos de transducción de señales.

#### II.4.- Dominios SH3.

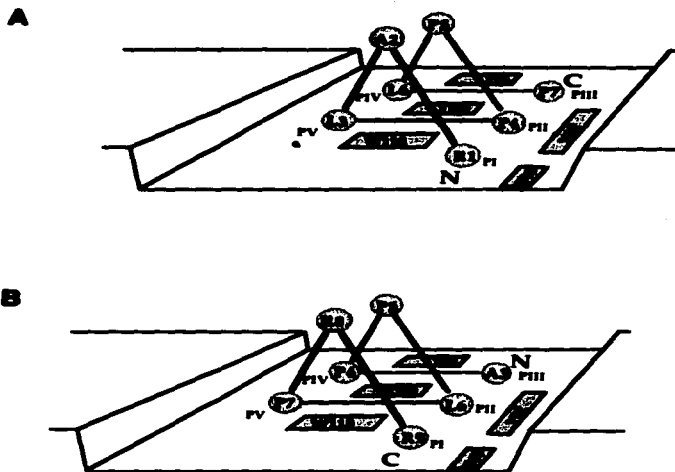
Los dominios SH3 son módulos proteicos compuestos de aproximadamente 50 a 70 aminoácidos capaces de mediar interacciones proteína-proteína. Se encuentran en varias proteínas con actividades diversas, como algunas enzimas (fosfolipasa C y cinasas de tirosina), diversas proteínas estructurales (del citoesqueleto), un conjunto de proteínas reguladoras (proteínas G, GAP), y finalmente un grupo de proteínas adaptadoras (Crk, Grb2). Todas estas diversas proteínas tienen un común denominador, están involucradas en los procesos de la transducción de señales (Morton, y Campbell, 1994; Schlessinger, 1994). Muchas de las proteínas que contienen dominios SH3, también poseen dominios SH2, PH y WW (Fig. 1), lo que les permite un manejo más versátil de las conexiones específicas entre proteínas que se logra con el empleo de estos módulos de interconexión proteica.

Los primeros ligandos descritos para los dominios SH3, fueron las proteínas 3BP1 y 3BP2 (Cicchetti, et al. 1992). El análisis de la secuencia de estas proteínas, demostró que 3BP1 tiene homología con la proteína GAP-rho (GTPase-activating protein); mientras que 3BP2 contiene un dominio SH2. Eliminando segmentos de estas proteínas y detectando las interacciones mediante ensayos de unión, este mismo grupo demostró que el sitio de unión para el SH3, consistía en una región de 9 a 10 aminoácidos rica en residuos de prolina (Ren, et al. 1993). Otros estudios utilizando la proteína adaptadora Grb2 (growth factor receptor-bound protein), demostraron que los dos dominios SH3 que contiene, unen a la proteína mSos1 (murine Son of sevenless 1), un factor de intercambio de nucleótido de guanina de la proteína Ras. Al igual que en las proteínas 3BP1 y 3BP2, se encontró que el sitio de unión para los dominios SH3 de Grb2, consistían en regiones ricas en prolina -PXXP- (Yu, et al. 1994).

Reportes posteriores demostraron que los dominios SH3 de algunas proteínas eran capaces de interactuar con varios sitios de unión de diferentes proteínas. Por ejemplo, se encontró que el dominio SH3 de la subunidad p85 de la enzima heterodimérica PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa) puede asociarse con la proteína dinamina (Gout, et al. 1993) y

también con CDC42 (GTPase-activating protein) (Barfod, et al. 1993); de igual manera, el dominio SH3 de la cinasa de tirosina Src, reconoce a CDC42 (Barfod, et al. 1993); a PI3K p85 (Liu, et al. 1993) y a paxilina (Weng, et al. 1993). Con estos datos se demostró que los dominios SH3, además de reconocer su sitio de unión específico *in vitro*, son capaces de reconocer a otros sitios de unión de otras proteínas, sugiriendo que en las bases estructurales de reconocimiento dominio-sitio de unión existen aspectos comunes, pero también existen mecanismos que establecen especificidad en las interacciones. En otras palabras, existe reconocimiento cruzado entre los dominios SH3 y sus sitios de unión, pero aún este reconocimiento cruzado no funciona de manera general entre todos los dominios SH3 y los sitios de unión.

Con el empleo de bancos combinatorios de péptidos sintéticos, y los datos aportados con la determinación de la estructura tridimensional de varios dominios SH3 (Koyama, et al. 1993; Kohda, et al. 1993; Teresawa, et al. 1994; Goudreau, et al. 1994), se estableció que existían dos clases de sitios de unión para cada uno de los dominios SH3 de p85 y Src (Chen, et al. 1993; Yu, et al. 1994). La secuencia consenso de los sitios de unión denominados clase I es RXLPPZP (Z=L para Src; Z=R para PI3K; X significa cualquier aminoácido). Por otro lado, la clase II tiene el consenso XPPLPXR. Estos dos tipos de sitios de unión permiten acoplar al ligando con el dominio SH3 en dos orientaciones diferentes (Feng, et al. 1994; Lim, et al. 1994), de tal manera que son opuestas una respecto a la otra (amino-carboxilo y carboxilo-amino, clase I y clase II respectivamente) (Fig. 2), notablemente, los dominios SH3 pueden unirse potencialmente en cualquier orientación; sin embargo, los dominios SH3 tienden a seleccionar ligandos que unen en una sola orientación (Sparks, et al. 1996a). Ambas clases de sitios de unión adoptan la misma conformación tridimensional al acoplarse con el dominio SH3 (Feng, et al. 1994). La llamada hélice PPII, es una conformación extendida en la cual todas las prolinas están en una configuración en *trans* y la porción central del ligando forma un "left-handed type II polyprolin helix" con tres residuos por vuelta (Yu, et al. 1994).



**FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS DOS TIPOS DE SITIOS DE UNION, DENOMINADOS CLASE I (A) Y CLASE II (B) PARA EL DOMINIO SH3 DE c-Src.** Los aminoácidos representados dentro de los círculos corresponden al sitio de unión, y los indicados dentro de los cuadros pertenecen al dominio SH3. Nótese el cambio de orientación amino-carboxilo y carboxilo-amino del sitio de unión del SH3 de Src entre A y B. (Feng, et al. 1994).

Los análisis estructurales y mutagénicos en los complejos dominio SH3-sitio de unión, demostraron que el esqueleto del ligando está constituido por 7 residuos de aminoácidos, con la secuencia consenso X-P-p-X-P, donde X es por lo general un aminoácido alifático y las P (prolinas) son esenciales para una unión de alta afinidad; el residuo No. 3 (p), tiende a ser prolina. Cada par de aminoácidos X-P, entra en una región hidrofóbica formada por aminoácidos aromáticos conservados en el dominio SH3, proporcionando la mayor parte de la energía necesaria para la unión. Existe una tercera región en el dominio SH3 que participa en la interacción con el sitio de unión, y ésta es una región de secuencia más variable que las que reconocen los pares de X-P. Se sugiere que esta variabilidad es responsable de dar especificidad a la interacción dominio-sitio de unión, ya que la región de pegado en el sitio de unión, también es variable. En diferentes interacciones dominio SH3-sitio de unión, se ha visto que esta tercera región interactúa con diferentes aminoácidos, por ejemplo, en el SH3 de Src un residuo de ácido aspártico (D) establece un puente de hidrógeno con una arginina (R) presente en el sitio de unión; mientras que para el SH3 de Abl el residuo correspondiente, una treonina (T), aparentemente interacciona con residuos más hidrofóbicos como metionina (M) o triptófano (W) presentes en el sitio de unión (Feng, et al. 1994; Lim, et al. 1994; Musacchio, et al. 1994; Wittekind, et al. 1994; Rickles, et al. 1994).

En estudios realizados con bancos de péptidos degenerados y phage display, se demostró que los dominios SH3 presentan diferentes afinidades por diferentes sitios de unión (Yu, et al. 1994; Chen, et al. 1993; Rickles, et al. 1994). Al parecer, la especificidad es conferida por las interacciones entre dos regiones del dominio SH3 que son de secuencia variable y flanquean la región hidrofóbica principal que reconoce la región central del sitio de unión, y los residuos del sitio de unión que no son prolinas. Se ha demostrado *in vitro* que algunos dominios SH3 pertenecientes a proteínas relacionadas cercanamente, son capaces de reconocer un mismo sitio de unión (reconocimiento cruzado), (Rickles, et al. 1994; Sparks, 1996a), como el caso de las cinasas de tirosina Src, Yes, Lyn y Fyn, las cuales pertenecen a la familia génica de Src (Abrams y Zhao 1995). Esto sugiere que los dominios SH3 de estas proteínas poseen preferencias muy similares para reconocer sus sitios de unión específicos. Sin embargo, el reconocimiento cruzado no parece ser común entre los distintos dominios SH3, Sparks (1996a) demostró que de 220 entrecruzamientos potenciales, solo 33 fueron positivos, sugiriendo que la selectividad de cada SH3 es una regla



más que una excepción; y que los dominios SH3 son capaces de discernir diferencias sutiles en la estructura primaria de sus ligandos.

### **II.5.- Función de los dominios SH3.**

La importancia de los dominios SH3 en los procesos biológicos fue primero analizada mediante el análisis mutagénico de dominios SH3; por ejemplo, mutaciones en el dominio SH3 de la proteína adaptadora v-Crk mostraron que provocan una disminución en el potencial transformante de ésta proteína en células HeLa. La expresión de la v-Crk ó la sobreexpresión de la versión celular de la proteína (c-Crk) conducen a un aumento en los niveles de fosforilación de tirosinas y provocan la transformación de células HeLa (Knudsen, 1994). Mutantes de las proteínas Src y Abl, carentes del dominio SH3, muestran un aumento en su potencial transformante en células NIH 3T3 y fibroblastos de ratón, respectivamente (Hirai y Varmus 1990; Jackson y Baltimore 1989). Por otro lado, mutaciones en los dominios SH3 de la proteína adaptadora SEM-5 de *C. elegans*, muestran un bloqueo en las vías de transducción de señales que conducen al desarrollo de la vulva (Mayer y Baltimore). Debido a que los dominios SH3 están presentes en una gran variedad de proteínas con diversas actividades, son muchos los procesos en los cuales intervienen, como la compartimentalización subcelular y la regulación de la actividad enzimática.

### **II.6.-Proteínas de citoesqueleto con dominios SH3.**

Los procesos de compartimentalización de las proteínas en el interior celular juegan un papel muy importante en los procesos de transducción de señales. Los dominios PH, SH2 y SH3 parecen controlar la localización celular de muchas proteínas que participan en la transducción de señales; en especial, los dominios SH3 han sido relacionados con estos eventos, además de participar en el control de la morfología celular. El citoesqueleto juega un papel muy importante en estos procesos. Varias proteínas asociadas al citoesqueleto contienen dominios SH3, incluyendo a la alfa-espectrina (Rotin, et al. 1994); la miosina I (Stöffler, et al. 1995); la paxilina (Turner y Miller 1994); la VASP (Haffner, et al. 1995); la GAP (McGlade, et al. 1993) y la dinamina (Seedorf, et al. 1994). En levadura se han

encontrado varias proteínas que contienen dominios SH3 o sitios de unión a SH3 y participan en la organización o polarización del citoesqueleto de actina (Goodson, et al. 1996; Freeman, et al. 1996; Kavanaugh, et al. 1994; Holtzman, et al. 1993; Chenevert, et al. 1992). También en otros sistemas ha sido descrita la relación de las proteínas con dominios SH3 o sitios de unión a SH3 asociadas al citoesqueleto, con los procesos de transducción de señales. Entre estas proteínas se incluyen receptores, como los del sistema del factor de crecimiento epidérmico/factor de crecimiento derivado de plaquetas, los cuales se unen mediante sus dominios SH2, a proteínas citoplásmicas que contienen dominios SH2 y SH3 como la fosfolipasa C-gamma y la proteína 2 de unión al factor de crecimiento (Koch, et al. 1991; Mayer, et al. 1993). Estos receptores permanecen anclados al citoesqueleto, como proteínas de unión a actina (den Hartigh, et al. 1992). Otro receptor recientemente descrito que está anclado al citoesqueleto, es el TCR (T-cell antigen receptor) el cual es un complejo formado de varias subunidades capaz de inducir varias vías de transducción de señales que culminan en la activación de las células T (Caplan, et al. 1995). Varios canales iónicos, incluyendo aquellos que son regulados por cinasas de tirosina, contienen regiones ricas en prolinas (Holmes, et al. 1996), como el "amiloride-sensitive Na+" que permanece anclado a la membrana apical de células polarizadas mediante la interacción de su región rica en prolinas en su extremo carboxilo y el dominio SH3 de la alfa-espectrina (Rotin, et al. 1994). Otro ejemplo de localización subcelular mediada por dominios SH3, corresponde a la proteína adaptadora Grb2, en la cual el dominio SH3 es responsable de su localización en la membrana de fibroblastos de rata (Bar-Sagi, et al. 1993).

## **II.7.- SH3, proteínas G y cinasas de tirosina.**

Existen muchos ejemplos de interacciones mediadas por dominios SH3 entre proteínas que participan en las vías de transducción de señales que involucran las llamadas proteínas G pequeñas (21 kDa), haciendo de este mecanismo de interacción proteica, un proceso usado con frecuencia por la célula (Cohen, et al. 1995). Por ejemplo, la interacción del dominio SH3 amino terminal de la proteína adaptadora Grb2 con el factor de intercambio de guanina SOS modula la actividad de Ras (Olivier, et al. 1993); mientras que el dominio SH3 carboxilo terminal de Grb2, interactúa con Vav, un factor de intercambio de guanina exclusivo de células

hematopoiéticas. Otro factor de intercambio de guanina que contiene un sitio de unión a SH3 es C3G, con el que interactúa por el dominio SH3 de Crk, otra proteína adaptadora (Knudsen, 1994). En *S. cerevisiae*, varios análisis genéticos sugieren que la proteína Bem1p (que contiene 2 dominios SH3) interactúa con el factor de intercambio de guanina BUD5 y una proteína GTPasa activadora, Bem2p (Cohen, et al. 1995). Bem1p participa en la regulación de la polarización celular (Chenevert, et al. 1992), formando parte de una intrincada red de interacciones proteicas donde participan factores de intercambio de guanina como Cdc24p y GTPasas tipo-Ras (Rsr1p/Bud1p) (Matsui, et al. 1996). Varias de las proteínas que funcionan como factores de intercambio de guanina como Vav y CDC25, o proteínas activadoras por GTP (guanosine triphosphatase-activating proteins) como RasGAP, contienen sus propios dominios SH3, además de sitios de unión a otros SH3 (Mayer y Baltimore 1993; Smit, et al. 1996).

Las interacciones mediadas por los dominios SH3 juegan también un papel importante en el sistema de oxidación de NADPH en fagocitos (de Mendez, et al. 1996). Este sistema cataliza la reducción de oxígeno molecular a superóxido. En respuesta a estímulos generados por bacterias o por el huésped durante el proceso de infección, la oxidasa de NADPH es activada mediante el acoplamiento de tres proteínas citosólicas esenciales, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y la GTPasa Rac, al acarreador de electrones transmembranal flavocitocromo b<sub>558</sub>, un heterodímero formado de dos subunidades, gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>. Las proteínas p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>, contienen cada una dos dominios SH3, mientras que p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> contienen sitios ricos en prolinas, implicándolos en varias interacciones entre ellos (de Mendez, et al. 1996). Mutaciones en las regiones ricas en prolinas, tienen como consecuencia la no activación del sistema, lo que provoca enfermedades como la granulomatosis crónica (Finan, et al. 1994), demostrando que los dominios SH3, son elementos esenciales en la activación de la oxidasa de NADPH (Finan, et al. 1994; de Mendez, et al. 1996).

Uno de los procesos celulares mejor caracterizados es la formación de la yema en levaduras. Este proceso involucra la participación de los dominios SH3 en una intensa transducción de señales, que además involucra al citoesqueleto, regulación de actividades enzimáticas (cinasas) y a segundos mensajeros. En esta vía participan varias proteínas que además de contener dominios SH3, tienen también dominios SH2 o PH, sitios de unión a SH3 o tirosinas susceptibles de fosforilación.

## II.8.- Gemación en levaduras.

La gemación en levaduras es un proceso que se ha estudiado desde hace varios años, lográndose caracterizar en detalle algunos de los elementos que lo constituyen. Mediante diversos estudios, se ha determinado que el proceso de gemación está íntimamente ligado al citoesqueleto, y en especial al denominado citoesqueleto cortical formado por microfilamentos de actina (Barnes, et al. 1990; Drubin, 1991). La utilización de la levadura como modelo de estudio del citoesqueleto y su relación con el proceso de gemación se ha visto favorecida por el hecho que en *Saccharomyces cerevisiae* existe solo un gene para actina, denominado ACT1 (Ng, y Abelson 1980) , por lo tanto, el análisis genético (mediante la generación de mutantes) del microorganismo ha permitido detectar a muchos genes que codifican para proteínas del citoesqueleto o que se asocian a él (Novick y Botstein 1985; Holtzman, 1993; Goodson, 1996).

Las levaduras inician la formación de la yema eligiendo un sitio y confinando material de crecimiento hacia esta región, de tal manera que durante este proceso, el crecimiento en una levadura es asimétrico. La elección del sitio de gemación no es azaroso, es determinado por el "mating type" (Drubin, 1991). Dos estructuras de actina distintas han sido identificadas como básicas para este proceso, una formada por largos cables de actina, y otra estructura consistente de pequeños parches corticales de actina. Los filamentos largos de actina son encontrados principalmente en la célula madre, extendiéndose a lo largo del eje de crecimiento hacia la célula hija emergente y se cree que podrían funcionar en la secreción espacialmente dirigida (Holtzman, et al. 1993). Los parches corticales de actina, se concentran en la yema naciente. Conforme la yema se alarga, los parches se distribuyen por toda la corteza de las células madre e hija, para posteriormente concentrarse en el cuello que separa las células. Las regiones donde se concentran los parches corticales de actina, son las mismas donde ocurren la deposición activa de pared celular y el crecimiento celular, sugiriendo una conexión entre ambos fenómenos (Chowdhury, et al. 1992).

Mediante análisis de mutantes, han sido detectadas varias proteínas que participan en el proceso de gemación en levadura, como BUD1, BUD2, BUD3, BUD4 Y BUD5 (Drubin, 1991); SAC6 (Adams, et al. 1989); Cofilina (Moon, et al. 1993); ABP1 (Drubin, et al. 1990); CAP o Srv2p (Freeman, et al. 1996); Bem1 (Chenevert, et al. 1992); MYO5 (Goodson, et al. 1996); TCP-

1 (Bich-Nga, et al. 1994) y Sla1 y Sla2 (Holtzman, et al. 1993).

Algunas de estas proteínas contienen dominios SH3, como ABP1 (un dominio SH3), Bem1 (dos dominios SH3) y Sla1 (tres dominios SH3) y se ha demostrado que los dominios SH3 juegan un papel fundamental en las actividades de estas proteínas, y en general, en el proceso de gemación de la levadura (Chenevert, et al. 1992; Drubin, 1991).

## **II.9.- RELACION *Rhizobium-Leguminosas.***

La relación simbiótica que se establece entre bacterias conocidas como Rhizobia (de los generos *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) y plantas leguminosas (frijol, soya, etc.), puede dividirse en varias etapas. Primeramente los dos simbioses deben de reconocerse mutuamente, esto lo logran mediante una completa comunicación química. Posteriormente, la bacteria se introduce a la planta, al mismo tiempo que la planta empieza la formación de un nido en el cual la bacteria se alojará en su forma diferenciada (bacteroide). Hacia el final del proceso, la planta ha desarrollado un nuevo órgano en la raíz, en donde los bacteroides son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en forma de amonio. El amonio es aprovechado por la planta, y ésta a su vez surte a la bacteria de compuestos carbonados, para su alimentación de simbiosis.

Cada uno de los procesos involucra la participación de varios genes de la bacteria y de la planta, volviéndola complicada y fascinante, y al mismo tiempo, un modelo excelente de estudio para varios eventos biológicos a nivel celular y molecular, como la posible participación de proteínas con dominios SH3 en los procesos de transducción de señales. A continuación se describen con más detalle las etapas del proceso de simbiosis entre Rhizobia y plantas leguminosas.

## **II.10.- Eventos tempranos de la nodulación.**

La comunicación entre los simbioses es básica en esta etapa. Por un lado, la planta produce flavonoides, los cuales cumplen un papel quimioatrayente y de activador de ciertos genes de la bacteria. La bacteria por su parte, produce los factores de nodulación, los cuales serán reconocidos por la planta.

Los genes de la bacteria que son responsables de la síntesis de los factores de nodulación, son conocidos como genes *nod*. Estos genes sólo son expresados en la bacteria en la simbiosis, excepto *nod D*, que se expresa constitutivamente. El producto de este gen, la proteína NOD D se une específicamente a los flavonoides de la planta (Goethals, et al. 1992), de esta manera se activa y es capaz de promover la expresión de los genes *nod* (Fisher y Long 1992).

La estructura de los factores de nodulación se conoce en detalle. En general constan de un esqueleto de 3 a 5  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminas con un ácido graso unido al extremo no reductor del azúcar (Fisher y Long 1992; Carlson, et al. 1994). Pueden tener modificaciones en ambos extremos. El producto de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* son los encargados de la síntesis del esqueleto de los factores NOD. Las modificaciones o decoraciones que pueda sufrir el esqueleto de los factores NOD, se deben a la acción de otras proteínas. Estas sustituciones a la estructura básica, son las que determinan la especificidad al hospedero así como su actividad biológica (Mylona, et al. 1995).

En general los *Rhizobia* tienen la habilidad de interactuar sólo con un número limitado de plantas hospederas, sin embargo, existen algunas cepas como *Rhizobium* NGR234 y *Rhizobium* GRH2, que son más promiscuas. Esta cepa en particular secreta 18 diferentes tipos de factores NOD, mientras que la mayoría de las cepas producen sólo un reducido número de factores diferentes. Evidencias como la anterior, apoyan la hipótesis de que son los diferentes tipos de factores NOD los que determinan en parte la especificidad en la relación simbiótica (Price, et al. 1992; López-Lara, et al. 1995)

En *Vicia sativa*, se ha demostrado que los primeros indicios en la planta de la inminente iniciación de la simbiosis se localizan en una región determinada de la raíz, la cual corresponde a una zona de pelos radicales jóvenes que casi han alcanzado su tamaño maduro (Heidstra, et al. 1994). Estas repuestas de la planta consisten en depolarización de la membrana (Ehrhardt, et al. 1992); rearrreglos del citoesqueleto (filamentos de actina), aumento en el flujo de calcio y protones; incremento en el flujo citoplásmico (Heidstra, et al. 1994) y en la expresión de algunos genes como ENOD 5 (Scheres, 1990a) ENOD 12 (Scheres, 1990b) y *Mtripl* (Cook, et al. 1995). Los factores de nodulación purificados son capaces de activar este mismo proceso, demostrando que son ellos los responsables de desencadenar estos eventos bioquímicos que son el preludio a los cambios

morfológicos que eventualmente se presentarán en las puntas de los pelos radiculares susceptibles a la infección.

Una hora después del contacto de los factores NOD con los pelos radiculares empieza a ser visible un ensanchamiento en la punta; posteriormente ésta empieza a elongarse y se curva hacia un lado, resultando en un pelo radicular claramente deformado al cabo de 3 horas. Las bacterias que son englobadas por la punta del pelo radicular, son las que eventualmente infectarán a la planta (Heidstra, et al. 1994).

### II.11.- Infección.

Para la introducción de la bacteria, la planta desarrolla una estructura especializada conocida como hilo de infección. Este conducto por donde las bacterias viajarán, se inicia en las puntas de los pelos radiculares enroscados, la cual forma mediante la hidrólisis de las paredes celulares, invaginación de la membrana plasmática y deposición de la nueva pared celular (Mylona, et al. 1995). El hilo de infección se extiende desde la punta del pelo radicular hasta lo que se conoce como primordio del nódulo, en donde las bacterias serán liberadas. El primordio es una región de células corticales que ha sido reactivada mitóticamente para dar origen al nódulo. En aquellas leguminosas (como alfalfa y chícharo) que forman nódulos de tipo indeterminado, el primordio se desarrolla en las capas corticales internas, por lo que el hilo de infección debe de atravesar las capas externas de la corteza. Antes de la penetración del hilo de infección, las células corticales externas experimentan cambios morfológicos, el núcleo se mueve hacia el centro de la célula, los microtúbulos y el citoplasma se reorientan radialmente formando una estructura cónica, conocida como el puente citoplásmico, similar a la banda de preprofase. El hilo de infección atraviesa las células corticales por medio de los puentes citoplásmicos radialmente orientados, los cuales son llamados en consecuencia hilos de preinfección (Van Brussel, et al. 1992). Los cambios que se presentan en las células que forman el hilo de preinfección recuerdan a aquellos que se presentan en células que entran al ciclo celular. Al parecer las células corticales externas se detienen en la fase G2, por eso nunca se dividen, mientras que las células corticales internas completan el ciclo hasta dividirse. Esto muestra que parte del proceso de infección es derivado de un proceso general, el ciclo celular. De alguna manera, *Rhizobium* ha

aprendido a modificar este mecanismo para acoplarlo al proceso de la infección (Mylona, et al. 1995).

Durante la reactivación de las células corticales por *Rhizobia*, se inducen genes que controlan el ciclo celular, como *cdc2* y ciclinas mitóticas (Yang, et al. 1994), además de genes específicos del nódulo (nodulinas) como ENOD12 (Scheres, et al. 1990b), Gm93 (Kouchi y Hata 1993), ENOD40 (Kouchi y Hata 1993; Yang 1993) y MtPRP4 (Wilson, et. al. 1994); los cuales son expresados en todas las células del primordio. Existen otros genes que se expresan sólo en las células que contienen las bacterias, como ENOD5 (Scheres, et al. 1990a).

Los factores de nodulación son capaces de inducir mitosis en las células corticales (Spaik, et al. 1991; Truchet, et al. 1991). Se ha encontrado que genes como ENOD12, ENOD8 y ENOD40 se expresan en estos primordios generados (Vijn, et al. 1993; Dickstein, et al. 1993), inclusive en algunos casos, los factores purificados son capaces de inducir la formación de nódulos (Truchet, et al. 1991; Stokkermans y Peters 1994).

No todas las células corticales son susceptibles a los factores de nodulación. En las leguminosas de climas tropicales como soya y frijol, sólo las células externas de la corteza, son las que responden al estímulo; mientras que en leguminosas de climas templados, son las células de la corteza interna. En ambos casos, los factores de nodulación son probablemente liberados periféricamente en las puntas de los pelos radiculares (la epidermis), sugiriendo que éstos son capaces de activar a distancia a las células que darán origen al primordio y eventualmente al nódulo (Vijn, et al. 1993). Los *Rhizobia* que inducen la mitosis en células corticales internas tales como *R. leguminosarum* *bv viciae* y *R. meliloti*, producen factores de nodulación que contienen un ácido graso altamente insaturado; mientras que los que activan las capas externas de la corteza, como *Bradyrhizobium japonicum*, generalmente contienen un grupo ácido saturado (C18:1) (Van Brussel, et al. 1992).

No se sabe con exactitud como es que *Rhizobium* induce la mitosis en células corticales. Existen datos que sugieren que los factores NOD de alguna manera alteran el balance entre auxinas y citocininas. Tanto las citocininas (Cooper y Long 1994) como los componentes que bloquean el transporte polar de auxinas (Hirsch, et al. 1989) inducen la formación de estructuras parecidas a nódulos, donde algunas de las nodulinas tempranas se expresan.

Ya que los factores de nodulación actúan a bajas concentraciones, y su



especificidad está determinada por las modificaciones (substituciones) que presenta el esqueleto básico, se ha postulado la existencia de un receptor(es) en la planta capaz de reconocerlos específicamente. Sin embargo, éste aún no ha(n) sido encontrado(s). De hecho se desconoce si los factores NOD interaccionan directamente con todos los tejidos que responden a su presencia, o sólo con la epidermis y de ésta, en consecuencia, se derivan otras moléculas que fungen como segundos mensajeros, transportando la señal hasta las células blanco (Mylona, et al. 1995).

Existen datos derivados del estudio de mutantes en la síntesis de factores NOD de *R. melliloti* que sugieren la existencia de dos tipos de receptores (Ardourel, et al. 1994). Uno de ellos reconoce los factores NOD aunque éstos no estén completamente terminados (modificaciones incompletas), pero sólo es capaz de activar algunas de las primeras reacciones en la planta, como la deformación de los pelos radiculares y la activación mitótica de la células de la corteza. El otro tipo de receptor debería ser más específico en su reconocimiento a los factores NOD, éstos parecen necesitar de todas las decoraciones y ser capaces de promover la formación del hilo de infección. Una vez que las bacterias han viajado a lo largo del hilo de infección, éstas se encuentran ahora diferenciadas a bacteroides, y son liberadas dentro de algunas de las células que forman el primordio, en un proceso similar a la endocitosis. Las bacterias nunca tienen un contacto directo con el citoplasma de las células infectadas, sino que son envueltas en una estructura especializada conocida como membrana peribacteroidal (MPB). La MPB forma la interfase entre las bacterias y la célula huésped, ella media el intercambio de señales y metabolitos y probablemente protege a la bacteria de ser reconocida como un agente extraño para la célula vegetal y de su respuesta de defensa (Nap y Bisseling 1990). La MPB es derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, y en su estructura contiene varias proteínas específicas del nódulo (nodulinas), algunas de ellas son glicosiladas antes de ser integradas a la MPB (Verma, et al. 1992).

Después del arribo de las bacterias al interior de las células huésped, el primordio empieza a diferenciarse en lo que será el nódulo fijador de nitrógeno. De acuerdo al patrón de crecimiento del nódulo, se distinguen dos tipos de ellos, los nódulos indeterminados y los determinados. Ambos tipos tienen un tejido vascular periférico que rodea al tejido central que tiene tanto células infectadas como no infectadas (Mylona, et al. 1995).

En los nódulos indeterminados las células se encuentran en diferentes etapas del desarrollo, formando un gradiente que se establece desde el meristemo apical (que persiste) y el extremo distal que está formado por células senescentes. La parte central se encuentra dividida en regiones específicas; en seguida del meristemo se encuentra la zona de fijación, en donde la infección se lleva a cabo. Después se localiza la zona de inducción de la fijación de nitrógeno, junto a la que se encuentra la zona fijadora de nitrógeno (Vasse, et al. 1990). En la región senescente, los bacteroides son degradados por la planta. La forma de éstos nódulos es alargada, debido a su crecimiento polar constante. En los nódulos determinados todas las células se encuentran en un estado de desarrollo similar, debido a que el meristemo dejó de dividirse en los primeros estados de desarrollo, a diferencia del meristemo persistente del nódulo indeterminado, por lo tanto su forma es mas bien redonda.

La fijación biológica del nitrógeno la lleva a cabo la enzima del bacterioide conocida como nitrogenasa, la cual es una enzima muy sensible al oxígeno. La reacción catalizada por la nitrogenasa es:  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16Mg-ATP = 2NH_3 + H_2 + 16Mg-ADP + 16P_i$ . La forma en la cual el nitrógeno es transportado del bacterioide a la planta, varía de acuerdo a la leguminosa en cuestión; en leguminosas de clima templado, las cuales generalmente producen nódulos indeterminados, lo exportan en forma de amidas. Las leguminosas de climas tropicales, que producen nódulos determinados, lo transportan en forma de ureidos. La fuente de carbono que se transporta de la planta al bacterioide, es la sacarosa (Mylona, et al. 1995).

### III.- ANTECEDENTES- Transducción de señales en plantas. Presencia de algunos transductores de animales.

En sistemas vegetales no ha sido fácil descifrar procesos de transducción de señales, debido a limitaciones técnicas en los estudios genéticos y bioquímicos, además que en las plantas, muchas de las respuestas generadas pueden ser mediadas por varios estímulos (Bowler y Chua 1994). Las plantas y los animales son organismos que comparten los mismos elementos básicos empleados en los procesos de transducción de señales, como las proteínas G (Ma, et al. 1990; Terryn, et al. 1993; Ma 1994), Ca<sup>++</sup> (Bush, 1993; Poovaiah y Reddy 1993; Sheen, 1996), cinasas (Walker, 1994; Sheen, 1996), receptores (Walker, 1993; Walker, 1994; Mu, et al. 1994; Becraft, et al. 1996), fosfoinosítidos (Hong y Verma 1994; Yang, et al. 1993) y señales peptídicas (Marx 1996). Muchos de los procesos en los que actúan estos elementos básicos de vías de transducción de señales no se conocen en detalle, inclusive algunos son hipotéticos y como tales deben tomarse. Sin embargo, mediante la selección de mutantes relacionadas con algunos procesos vegetales, como la fotomorfogénesis, crecimiento, germinación, etc., y mediante estudios bioquímicos, se han empezado a dilucidar algunos procesos de transducción de señales en plantas.

Los procesos de transducción de señales en respuesta al etileno, son algunos de los mecanismos vegetales que se han estudiado. El etileno es un gas que tiene un importante papel como regulador del crecimiento, influenciando varios procesos vegetales como la germinación, abscisión de hojas y maduración de frutos, así como respuestas a diferentes tipos de presiones del medio ambiente como daño mecánico, congelamiento y ataques de patógenos (Bowler y Chua 1994). Se han seleccionado mutantes incapaces de responder a los estímulos del etileno, se conocen como *etr1*, *ein2*, *ein3* y *ctr1*. ETR1 ha sido clonado y muestra homología con proteínas bacterianas del sistema de dos componentes (Chang, et al. 1993). CTR1 tiene homología con cinasas, particularmente con proteínas cinasas de serina/treonina pertenecientes a la familia de Raf (Kieber, et al. 1993). El modelo de acción del etileno propuesto involucra entonces la participación de un receptor de etileno (ETR1), el cual controla la respuesta al etileno por medio de una cascada de fosforilaciones que involucra a CTR1 y EIN3. El modelo también involucra la actividad de fosfatasa que se supone regulan el estado fosforilado de CTR1 (Bowler y Chua 1994).

Las respuestas celulares a otras hormonas vegetales como el ABA (ácido abscísico), y citocininas también han sido estudiadas. ABA es una hormona vegetal que participa en muchos procesos vegetales, como la maduración del embrión y el letargo de semillas, inhibición mitótica de meristemos de raíz y cerrado de los estomas durante el estrés hídrico. Se han seleccionado algunas mutantes deficientes en varios procesos mediados por el ABA, denominadas *abi* (abscisic acid insensitive). El análisis de algunas respuestas al ABA involucra la participación de receptores localizados en la membrana plasmática (Anderson, et al. 1994), así como fosfatasa de serina/treonina (Leung, et al. 1994; Meyer, et al. 1994).

Recientemente se publicó la clonación de CKII, que es una proteína homóloga a cinasas de histidina involucrada en la transducción de señales en respuesta a citocininas (Kakimoto, 1996). Las citocininas son hormonas vegetales que regulan varios eventos fisiológicos, como el metabolismo de nutrientes, expansión y senescencia de las hojas y ramas laterales, además de inducir la división celular y el desarrollo de cloroplastos. CKII es una proteína que conserva una región de homología con cinasas de histidina, 2 regiones que parecen ser transmembranales, así como un sitio de autofosforilación y otro de fosforilación conservado entre otras cinasas de histidina. El papel de CKII en la transducción de señales inducidas por citocininas, no está del todo claro, sin embargo los datos experimentales apuntan a que CKII funciona como un receptor específico a citocininas, en homología a la función de receptor ETR1 al etileno.

Por otro lado, los estudios realizados con fitocromos han servido para determinar otros procesos de transducción de señales en plantas. Los fitocromos son proteínas vegetales que funcionan como receptores a la luz (Furuya, 1993). Las apoproteínas que constituyen los fitocromos están codificadas por familias multigénicas (por ejemplo en *Arabidopsis*, existen 5 genes), y se cree que cada fitocromo tiene un papel fisiológicamente diferente. El holofitocromo consiste de un dímero covalentemente unido a un cromóforo que se encarga de la percepción de la luz. Con el empleo de varias estrategias experimentales, se han detectado varios componentes de la vía de transducción de señales mediada por los fitocromos, como la activación de proteínas G (Millar, et al. 1994), Ca<sup>++</sup> y GMPc (Neuhaus, et al. 1993; Bowler, et al. 1994).

### III.1.- El citoesqueleto.

El citoesqueleto es otro elemento celular que participa en los procesos de transducción de señales. Originalmente descrito en sistemas animales, el citoesqueleto está constituido por 3 tipos de estructuras diferentes: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los microfilamentos. Cada una de estas estructuras se encuentran constituidas por proteínas monoméricas que forman polímeros que establecen una intrincada red de filamentos que cruzan la célula o se agrupan en regiones particulares. Además de las proteínas que constituyen a cada filamento, existen otras proteínas del citoesqueleto que se asocian a las primeras, dándole mayor diversidad de funciones (Alberts, et al. 1989).

En plantas, se han encontrado los tres tipos de estructuras que constituyen al citoesqueleto de células animales, al igual que algunas proteínas asociadas, como son: la profilina (Vidali, et al. 1995) y las MAP's (Microtubule Associated Proteins) (Shibaoka y Nagai 1994). En los sistemas vegetales, al igual que en los animales, el citoesqueleto juega un papel muy importante en varios procesos celulares; por ejemplo, participa en el transporte intracelular de macromoléculas, vesículas, organelos y estructuras macromoleculares esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal; en la orientación de microfibrillas de celulosa durante la síntesis de pared celular, así como durante el ciclo celular (Goddard, et al. 1994; Shibaoka y Nagai 1994). Clore et al. (1996) reportó la asociación del citoesqueleto con la formación de los cuerpos proteicos en células del endospermo del maíz. En este proceso participan además de microtúbulos y microfilamentos, la proteína EF-1 $\alpha$ ; estos autores sugieren la participación del citoesqueleto en el transporte de los RNAs mensajeros de las zeinas (proteínas que constituyen a los cuerpos proteicos). Aunque en plantas no se sabe, en levadura se ha relacionado a EF-1 $\alpha$  como una proteína asociada con los sitios de unión a SH3 de la proteína CAP (cyclase-associated protein). La ausencia de esta región rica en prolina provoca la relocalización de CAP y actina F (Yanagihara, et al. 1997).

La relación del citoesqueleto con los procesos de transducción de señales fué primero descrita en células animales y en levaduras, y ahora empieza a serlo en plantas. Esta relación es muy estrecha; de hecho la dinámica misma del citoesqueleto (polimerización y depolimerización) está regulada por elementos que participan en los procesos de transducción de señales, como el Ca<sup>++</sup> (Mc Curdy y Williamson 1991), las proteínas G (Takai,

et al. 1995), los lípidos (Grabski, et al. 1994), y algunas cinasas (Amano, et al. 1997).

### **III.2.- Transducción de señales durante el proceso de organogénesis del nódulo simbiótico de frijol. Similitudes con procesos mediados por SH3.**

Como ya se mencionó, durante el proceso de organogénesis del nódulo simbiótico de frijol, ocurren varios eventos moleculares y bioquímicos que conducen a la formación del nuevo órgano aledaño a la raíz. Estos procesos comprenden la generación de señales moleculares específicas por parte de los dos simbios, el reconocimiento de ellas por su contraparte en la simbiosis, la modificación morfológica en los pelos radiculares, la estimulación a la división celular, la generación de una membrana especializada que engloba a los bacteroides, y la fijación biológica del nitrógeno. Poco se sabe de los procesos de transducción de señales que se generan para llevar a cabo estos eventos; sin embargo, existen reportes que demuestran la participación de algunos elementos transductores. Por ejemplo, uno de los elementos transductores descritos en el proceso de organogénesis del nódulo, es el  $Ca^{++}$ . Ehrhardt et al. en 1996, describió como en los pelos radiculares de alfalfa se presentaron cambios en la concentración intracelular de calcio en respuesta a factores de nodulación. La especificidad de la respuesta en los niveles de calcio intracelular al estímulo (factores de nodulación con estructuras diferentes), sugieren que el  $Ca^{++}$  funciona como un segundo mensajero de respuesta rápida a la señal reconocida, y que esto podría servirle a la planta como señal para empezar los primeros eventos de la nodulación.

Durante el proceso de la organogénesis del nódulo simbiótico de soya, se ha reportado la expresión de la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Hong y Verma 1994). Esta enzima es un importante componente de varios complejos de receptores con actividad de cinasas de tirosina en sistemas animales, y es una enzima clave en los procesos de división celular y localización proteica en levaduras. La enzima cataliza la reacción de fosforilación de la posición D-3 del anillo de inositol, generando el fosfatidilinositol 3-fosfato, PI(3)P, el cual es un segundo mensajero. En sistemas animales, la enzima PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad reguladora (p85) y la subunidad catalítica (p110). La proteína

p85 contiene dos dominios SH2, un dominio SH3 y dos regiones ricas en prolinas con las cuales es capaz de interactuar con los dominios SH3 de las cinasas Abl, Lck, Fyn y hasta con su propio dominio SH3 (Kapeller, et al. 1994). La forma de PI3K clonada del banco de cDNA de soya, es homóloga a la subunidad p110, y no se ha reportado la clonación de la subunidad regulatoria.

La función que puede tener el PI(3)P en las plantas no se conoce, sin embargo, se ha reportado la presencia de otros dos fosfoinosítidos en sistemas vegetales (Irvine, et al. 1989), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI(4)P) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) presentes en hojas de chicharo y zanahoria. En células de zanahoria, se ha demostrado que la actividad de la enzima fosfatidilinositol 4-cinasa (que cataliza la síntesis del PI(4)P) está asociada con el citoesqueleto, específicamente con actina. Esto implica que podría estar interactuando directamente con actina o con alguna(s) de las proteínas asociadas a ella; además la interacción de PI 4-cinasa con actina está relacionada con la activación de enzimas que degradan la pared celular (Tan y Boss 1992), sugiriendo que existe alguna vía de transducción de señales en células de zanahoria que involucra la interacción de PI 4-cinasa con el citoesqueleto (Yang, et al. 1993).

El citoesqueleto de las células de la raíz de frijol que participan en la formación al nódulo simbiótico juega un papel importante en el establecimiento de la relación simbiótica. Por ejemplo, en las células de la corteza que participan en la formación de los hilos de preinfección, el núcleo se mueve hacia el centro de la célula y el citoplasma y los microtúbulos son reorganizados para formar una estructura cónica conocida como puente citoplásmico. Los factores de nodulación purificados son capaces de inducir la formación de los hilos de preinfección, pero no la formación de hilos de infección completos (Van Brussel, et al. 1992).

También se ha involucrado la participación de receptores a los factores de nodulación (hipotéticos) y de fitohormonas (auxinas y citocininas) en los eventos que conducen a la formación del nódulo simbiótico (Geurts y Frassen 1996). Estas observaciones sugieren que los elementos que participan en los procesos de transducción de señales involucradas en la relación simbiótica Rhizobia-Leguminosas, son elementos comúnmente usados en las vías de transducción de otras señales en plantas y animales, lo que sugiere que éstas también están conservadas en plantas (Geurts y Frassen 1996).

Las similitudes que guardan los procesos de transducción de señales

en células animales y vegetales como hemos visto, se refleja no sólo en el uso de estrategias similares para transducir las señales (involucrando a segundos mensajeros, la fosforilación/defosforilación de proteínas, receptores, hormonas, etc.), sino en la participación de moléculas homólogas, tanto en estructura como en función, a los transductores encontrados en sistemas animales.

#### IV.- OBJETIVO

En base a los antecedentes mencionados, en el presente trabajo se plantea investigar si en el proceso de organogénesis del nódulo simbiótico de *Phaseolus vulgaris* se encuentran involucradas proteínas que contengan dominios SH3.

#### V.- HIPOTESIS

Siendo la organogénesis del nódulo simbiótico de *Phaseolus vulgaris* un proceso en el cual los mecanismos de comunicación celular llevan a la formación de un nuevo órgano con la paralela participación del citoesqueleto, el  $Ca^{++}$  y de fosfoinosítidos entre otros, pensamos que es un buen modelo de estudio de procesos de transducción de señales, y que probablemente en las vías de transducción que se activan, podrían participar proteínas con dominios SH3.

#### VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental desarrollada en este trabajo, básicamente trató de la implementación de técnicas para identificar proteínas del nódulo del frijol con dominios SH3 y de proteínas con sitios de unión para dominios SH3. La secuencia de la estrategia se resume en el esquema siguiente:

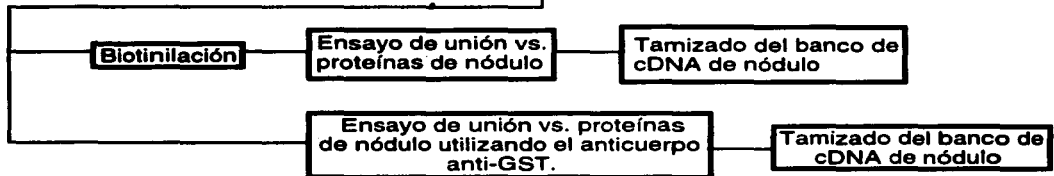


# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

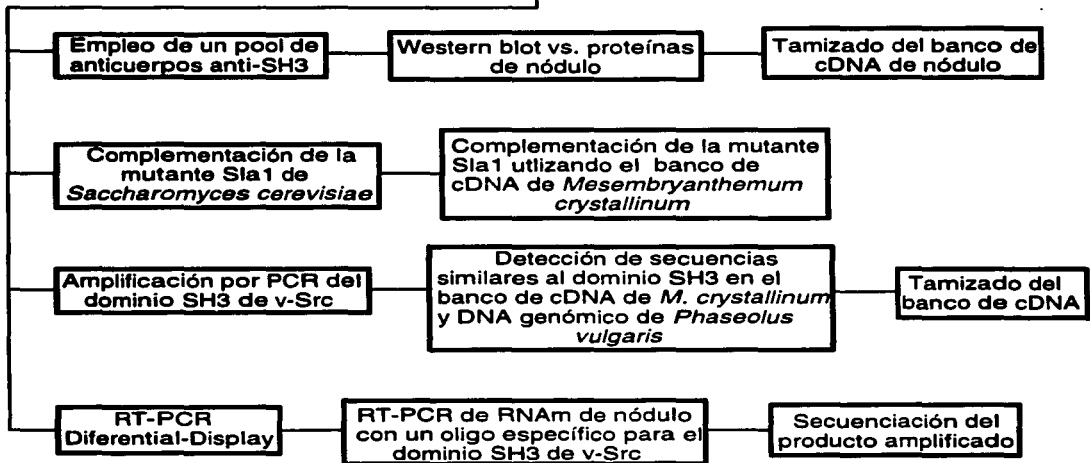
## DETECCION DE SITIOS DE UNION AL DOMINIO SH3 DE v-Src

28

### Expresión y Purificación de Proteínas GST-SH3 y GST



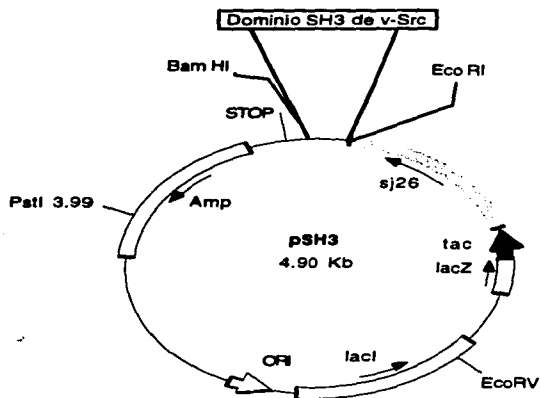
## DETECCION DE DOMINIOS SH3



## VII.- RESULTADOS

### VII.1.- Expresión, purificación y marcaje de las proteínas GST-SH3 y GST.

Para la expresión y purificación de la proteína de fusión GST-SH3, se utilizó un plásmido (pSH3) derivado del pGEX-2T. El pSH3 tiene clonado un inserto de 210 pb, que corresponden a la secuencia nucleotídica del dominio SH3 de la proteína cinasa Src (de la posición 252 a la 462 del gen). La secuencia está insertada entre los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI (Fig. 3). La inducción de la transcripción a partir del promotor lac del pGEX-2T, produce una proteína de fusión de 31 kDa aproximadamente. Este plásmido fue amablemente proporcionado por la Dra. Gladys Cassab.



**FIGURA 3.** PLASMIDO pSH3. El plásmido pSH3 es derivado del plásmido pGEX 2T, con una inserción de 210 pb correspondientes al dominio SH3 de Src del virus del Sarcoma de Rous, entre los sitios de clonación Eco RI y Bam HI. La secuencia corresponde de los nucleótidos 252 al 463 del gen.

Para la producción de la proteína GST de 29 kDa, se indujo su expresión a partir del promotor lac del plásmido pGEX-2T.

Se determinó el tiempo óptimo de la expresión de ambas proteínas (GST-SH3 y GST), por medio de una cinética de expresión. Utilizando cultivos simultáneos (materiales y métodos) se llevó a cabo una inducción con IPTG y se colectaron las bacterias a los 30 min, 1 h, 1.30 h, 2 hrs, 2.30 h y 3 h. Después del análisis de las muestras por SDS-PAGE, se encontró que a las 2 h se alcanzó el máximo de expresión de ambas proteínas, y se determinó éste como el tiempo óptimo de inducción.

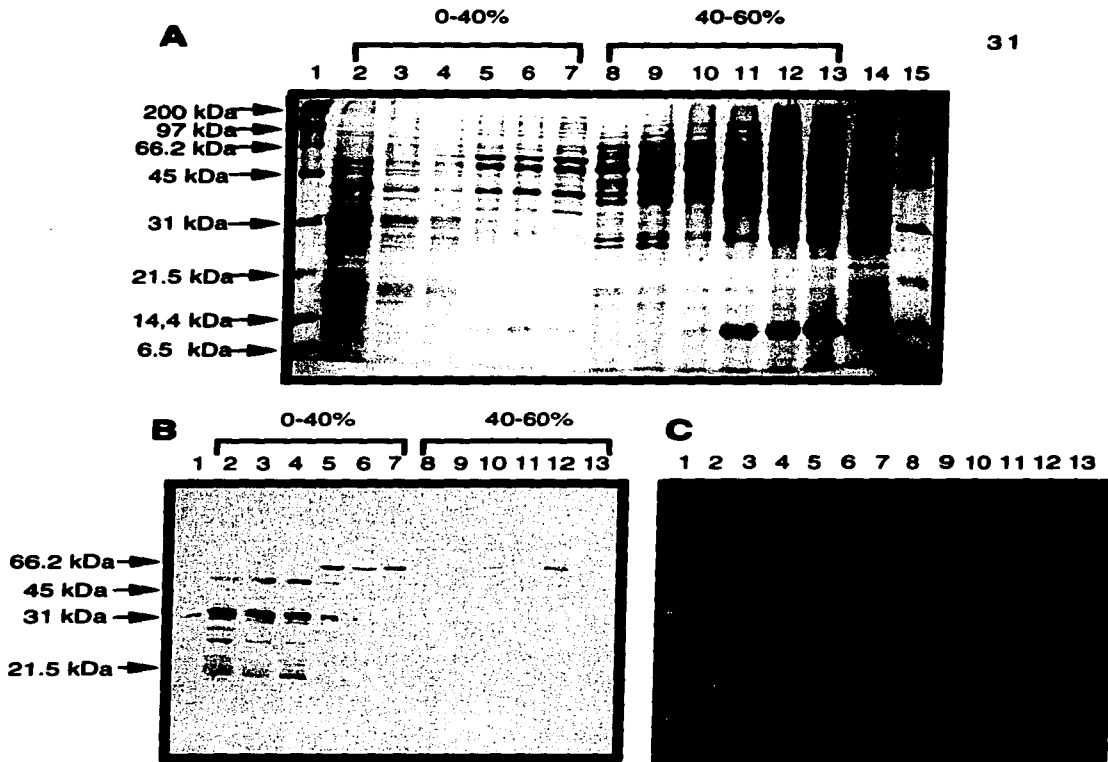
La purificación de las proteínas se realizó de acuerdo al protocolo del distribuidor (materiales y métodos). Se llevó a cabo la digestión con la proteasa trombina de la proteína de fusión GST-SH3, lo cual resultó en la digestión de ésta, sin embargo, por SDS-PAGE sólo fué posible detectar la GST y no el dominio SH3.

El marcaje con biotina se realizó según las recomendaciones del distribuidor y se determinó la cantidad de la proteína biotinada por espectrofotometría (materiales y métodos).

## **VII.2.- Detección de proteínas con sitios de unión para dominios SH3.**

La detección de proteínas del nódulo de frijol con posibles sitios de unión al dominio SH3 de Src se llevó a cabo, primeramente mediante una cinética de nodulación, con colección de nódulos de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días. La extracción de proteínas del nódulo se hizo de acuerdo al protocolo IX.7.a. (materiales y métodos). Se determinó y se cargaron cantidades iguales de proteína por carril en un gel al 15% (por duplicado). Se electrotransfirieron a Immobilon y se realizó con cada uno de los fitos duplicados el ensayo de unión (materiales y métodos) contra GST-SH3-BIOT, y GST-BIOT, respectivamente.

En la Fig. 4 se muestran los ensayos de unión practicados a cada uno de los filtros. Se observa que la proteína de fusión GST-SH3 se une a varias proteínas del nódulo (Fig. 4-B), a diferencia del control (Fig. 4-C).



**FIGURA 4. DETECCIÓN DE PROTEINAS CON SITIOS DE UNIÓN A SH3 EN EXTRACTOS DE NODULO FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) DE DIFERENTES DIAS. A)** Extractos proteicos de nódulos de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días precipitados con acetona, del carril 2 al 7, corte de 0-40% de acetona y del carril 8 al 13 corte de 40-60%. El carril 14 corresponde a una fracción proteica enriquecida de la proteína profilina de frijol. Los carriles 1 y 15 corresponden a los marcadores de peso molecular. **B)** Ensayo de unión entre los extractos del panel A) y la proteína GST-SH3 biotinilada, del carril 2 al 7 corresponden a proteínas de nódulo de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días precipitadas de 0-40% de acetona. Del carril 8 al 13 corresponden al corte de 40-60% de acetona de los extractos de nódulo de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días, respectivamente. **C)** Ensayo de unión entre una réplica de la membrana utilizada en el panel B) y la proteína GST biotinilada (control).

Las proteínas del frijol que unen a GST-SH3 varían de acuerdo con la edad de los nódulos; es decir, no se detectan las mismas proteínas a lo largo de la cinética de nodulación. Este resultado se esperaba ya que la expresión de las proteínas de la planta varía conforme avanza el proceso de la organogénesis. El peso molecular de las proteínas detectadas varía entre 20 y 66 kDa aproximadamente. En los extractos de 3 y 5 días que prácticamente corresponden a las raíces del frijol, pues en ese punto los nódulos son muy pequeños y no es posible separarlos de la raíz, se encuentran la mayoría de las proteínas detectadas. Sin embargo, en los extractos de los días 15, 20 y 25 (que corresponden a los nódulos únicamente), se detecta una proteína de aproximadamente 66 kDa. En el control negativo, la proteína GST-BIOT no se une a ninguna proteína del filtro (Fig. 4-C). Estos datos demuestran que la unión a las proteínas reconocidas por la proteína de fusión GST-SH3-BIOT, fue mediada por el dominio SH3.

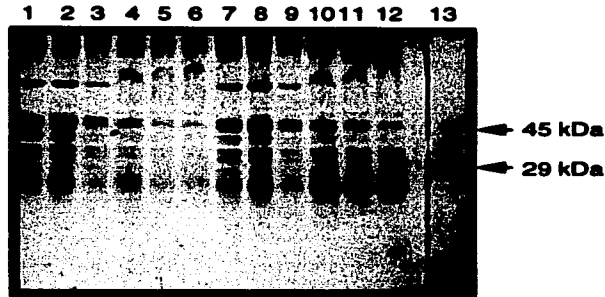
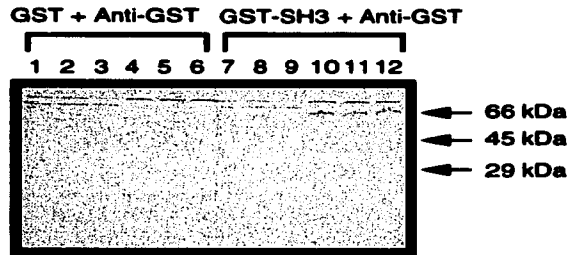
Se obtuvieron datos semejantes cuando se empleó otro sistema de detección de proteínas con sitios de unión a dominios SH3. Para ello se utilizó un sistema es muy similar al método anterior, solo que en éste no utilizamos biotina para marcar a las proteínas GST-SH3 y GST, sino un anticuerpo anti-GST. Con éste sistema detectamos la unión de la proteína de fusión (GST-SH3) con sus proteínas blanco (materiales y métodos), mediante un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa que reconoce al primero, y que genera la señal colorida. Con nuevos extractos proteicos totales de nódulo de diferentes días (obtenidos por el protocolo IX.7.b), detectamos la misma proteína de aproximadamente 66 kDa a partir de los 15 días y hasta de 25 días (Fig. 5-A). El control negativo (Fig. 5-B carriles 1-6) mostró que ni la proteína GST ni el anticuerpo anti-GST, reconocieron específicamente a otras proteínas.

Con los dos sistemas de detección de sitios de unión para el dominio SH3 descritos, se realizaron varios tamizados en el banco de cDNA de *P. vulgaris* (materiales y métodos) en busca de clonas capaces de expresar proteínas de frijol con sitio(s) de unión para SH3; sin embargo, solo se obtuvieron resultados negativos.

Una vez detectadas las proteínas con los sitios de unión a los dominios SH3, decidimos buscar la otra parte del sistema de interacción proteica, proteínas con dominios SH3.

**A**

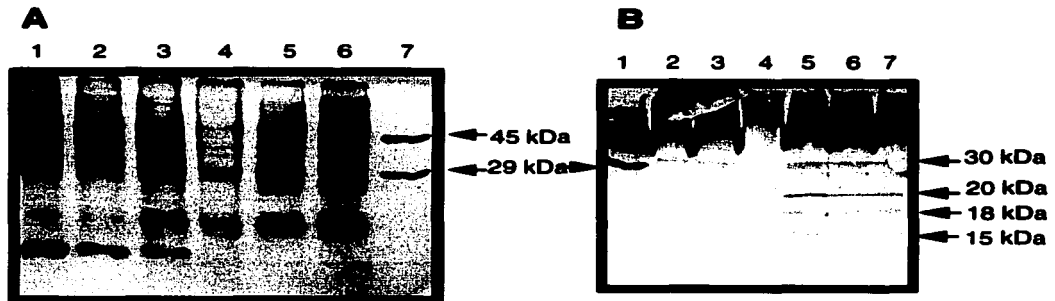
33

**B**

**FIGURA 5. DETECCIÓN DE PROTEINAS CON SITIOS DE UNIÓN AL DOMINIO SH3 EN EXTRACTOS DE NÓDULO DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* DE DIFERENTES EDADES. A)** Extractos de proteínas totales de nódulo de diferentes días ( del carril 1 al 6 y del carril 7 al 12 corresponden a nódulos de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días, respectivamente). El carril 13 corresponde a los marcadores de peso molecular. **B)** Del carril 1 al 6, ensayo de unión entre proteínas de nódulo de 3,5,10,15,20 y 25 días respectivamente y la proteína GST purificada, la interacción se detectó con el anticuerpo anti-GST. Del carril 7 al 12 ensayo de unión entre proteínas de nódulo de 3,5,10,15,20 y 25 días respectivamente y la proteína GST-SH3, la interacción se detectó con el anticuerpo anti-GST. Las flechas indican los marcadores de peso molecular.

### VII.3.- Detección de proteínas con dominios SH3.

Después de haber detectado proteínas de nódulo con sitio(s) de unión al dominio SH3 de Src, supusimos que en el mismo sistema debían de existir proteínas que contuvieran dominios SH3. Para la detección de proteínas del nódulo con dominio(s) SH3, utilizamos una mezcla de 7 anticuerpos policlonales anti-SH3 (anti v-Src, anti c-Src, anti Lck, anti p85, anti Fyn, anti c-Abl y anti v-Abl), para ampliar el rango de reconocimiento a diferentes SH3 (todos los anticuerpos fueron amablemente proporcionados por la Dra. Yvonne Rosenstein). Mediante un ensayo tipo Western blot, utilizando extractos de nódulos de varias edades, se detectaron 4 proteínas reconocidas por los anticuerpos. Una proteína de aproximadamente 20 kDa que está presente en los extractos de nódulos de 15, 20 y 25 días. Las tres proteínas de pesos moleculares de aproximadamente 30 kDa, 18 kDa y 15 kDa producen una señal más débil. La proteína de 30 kDa está presente en todos los extractos, mientras que las de 18 kDa y 15 kDa, al igual que la de 20 kDa, solo aparecen en los extractos de nódulos de 15, 20 y 25 días (Fig. 6).



**FIGURA 6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIO(S) SH3 EN EXTRACTOS DE NÓDULO DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* DE DIFERENTES EDADES. A)** Extractos de proteínas de nódulos de diferentes días ( del carril 1 al 6 nodulos de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días, respectivamente; carril 7, marcadores de peso molecular). **B)** Western blot utilizando anticuerpos contra 7 diferentes dominios SH3 (1, Marcador de peso molecular; del carril 2 al 7 extractos totales de nodulos de 3, 5, 10, 15, 20 y 25 días respectivamente).

Debido a que se detectaron proteínas potencialmente portadoras de dominios SH3, intentamos localizar en el banco de cDNA de *P. vulgaris* clonas que expresaran dichas proteínas. El protocolo se describe en materiales y métodos. Después de 4 tamizados en el banco, no encontramos clonas positivas.

Mediante los experimentos anteriores, demostramos que existen proteínas en el nódulo del frijol que contienen sitios de unión a SH3 (los cuales son reconocidos por el dominio SH3 de Src) y proteínas que contienen dominio(s) SH3 reconocidos por anticuerpos anti-SH3. De acuerdo con estos datos, las dos partes del sistema de interacción proteica mediada por los dominios SH3 se encuentran presentes durante la ontogenia del nódulo.

#### **VII.4.- Complementación de la mutante Sla1 de levadura.**

Otro intento por clonar genes de frijol codificantes para proteínas con dominios SH3 se realizó mediante la complementación de la mutante DDY 494 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (amablemente proporcionada por el Dr. David Drubin). Esta mutante es letal termosensible a 37°C; tiene una disrupción en el gene Sla1, el cual codifica para una proteína de 136 kDa que contiene tres dominios SH3 (Holtzman, et al, 1993). La proteína SLA1 está involucrada en la formación de la yema, dentro del proceso de gemación de la levadura.

Utilizando un banco de expresión de la planta halófila *Mesembryanthemum crystallinum* construido en el vector pSal (amablemente proporcionado por el M. en C. Oscar Mascorro), se transformó la mutante DDY 494 (materiales y métodos). El plásmido pSal es un vector molecular que cuenta con dos orígenes de replicación, uno para bacterias y otro para levaduras, lo que le permite ser replicado en ambos microorganismos. Asimismo, cuenta con un promotor inducible por cobre.

En un primer experimento, de 4 x 10<sup>5</sup> transformantes, se aislaron 50 clonas capaces de crecer a 37°C en el medio de selección (materiales y métodos). Para verificar que estas clonas fueran realmente complementantes y no mutantes supresoras del fenotipo mutante, se purificó el plásmido de 14 de ellas (Tabla 1) para con ellos transformar



células de *Escherichia coli*. Posteriormente los plásmidos se extrajeron de *E. coli* para volver a transformar la mutante de levadura DDY 494.

Estas nuevas transformantes se volvieron a exponer a 37° C en presencia de 100 µM Cu<sup>++</sup>. El resultado de éste experimento y de otro idéntico fué el mismo, no se encontraron complementantes verdaderas del fenotipo letal a 37° C, sino solo mutantes supresoras.

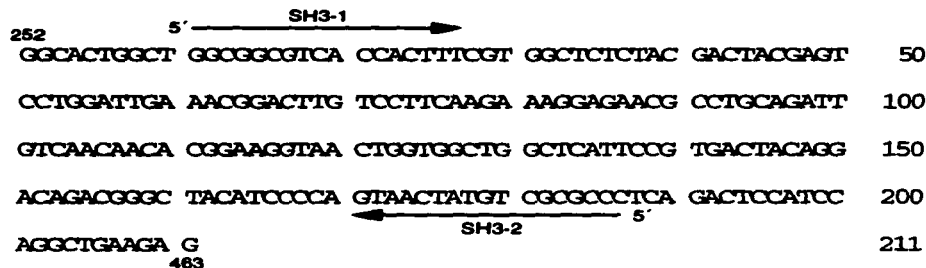
COLONIA	37°C				30°C	
	YPD + Cu	YPD	SD + Cu	SD	YPD	SD
1	+	+	-	+/-	+	-
2	+	+	-	+/-	+	+
3	+/-	+	-	+/-	+	+
4	+	+	-	+/-	+	+
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	+/-	+	+/-
7	-	+/-	-	-	-	-
8	+/-	+/-	-	-	+	+
9	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-
10	+	+	-	+	+	+
11	+/-	+	-	+/-	+	+
12	+	+	-	+/-	+	+
13	+/-	+	-	+/-	+	+
14	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-

**TABLA 1 . ANALISIS DE CRECIMIENTO DE 14 COLONIAS TRANSFORMANTES DE LA CEPA Sla1 DE *S. cerevisiae* CON EL BANCO DE EXPRESION DE *M. crystallinum*.** Las colonias fueron aisladas y sembradas en diferentes medios de cultivo y crecidas en diferentes temperaturas durante 3 días. YPD+Cu = Medio rico (Yeast Peptone Dextrose) + 100 µM Cu. YPD= Medio rico. SD= Medio mínimo (Synthetic Dextrose) + 100 µM Cu. SD= Medio mínimo. (+)= Crecimiento abundante. (+/-)= Crecimiento limitado. (-)= Crecimiento nulo.

Los datos indican que por lo menos en las condiciones empleadas en estos experimentos, en el banco de expresión utilizado no se encontró ninguna clona capaz de suplir funcionalmente a la proteína SLA1 de levadura.

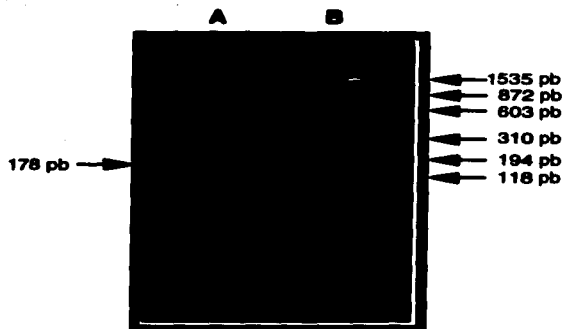
**VII.5.- Detección de secuencias de DNA homólogas a SH3 en *M. crystallinum* y en *P. vulgaris*.**

En un intento adicional por detectar secuencias de DNA homólogas a la secuencia del dominio SH3 generamos una sonda molecular específica. En base a la secuencia del dominio SH3 de Src, diseñamos dos oligonucleótidos que flanquean una región de 178pb del dominio SH3 (Fig. 7).



**FIGURA 7. SECUENCIA DEL DOMINIO SH3 DE Src.** El dominio SH3 de Src del virus del sarcoma de Rous, se extiende desde la posición 252 hasta la 463 del gen. Las flechas indican las regiones complementarias a los oligonucleótidos sintéticos SH3-1 y SH3-2 utilizados en la reacción de PCR

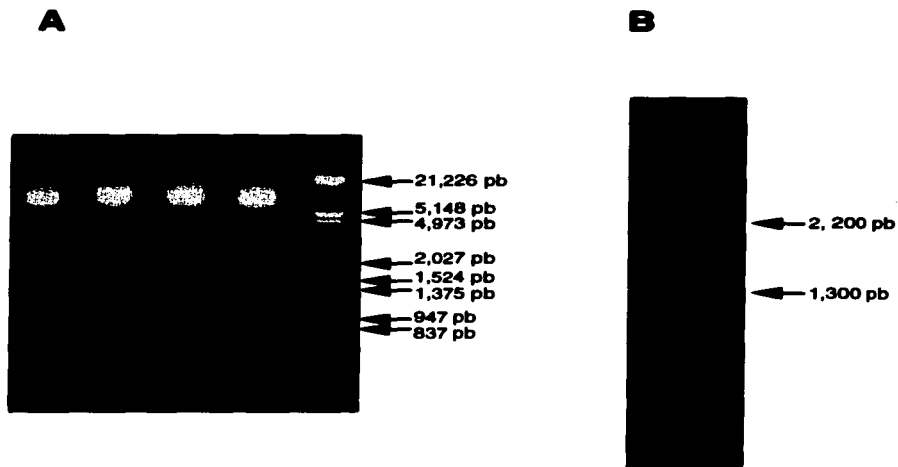
La reacción de PCR se realizó como se especifica en materiales y métodos. El producto de PCR se analizó en gel de agarosa, se purificó por "Freeze-Squeeze" y se marcó radioactivamente de acuerdo al protocolo de random primer (Amersham) (Materiales y Métodos) (Fig. 8).



**FIGURA 8. PRODUCTO DE AMPLIFICACION POR PCR DEL DOMINIO SH3 DE Src. A) Producto de la reacci3n de PCR utilizando el dominio SH3 de Src como templado y los oligonucle3tidos SH3-1 y SH3-2 como iniciadores. B) Marcador de pesos moleculares (fX174 digerido con Hae III).**

Para la detección de secuencias de *M. crystallinum* homólogas a SH3 de Src, utilizamos el banco de cDNA. El banco fué construido en el vector pSal, utilizando los sitios de restricción para las enzimas Eco RI y Not I; por lo tanto, para liberar los fragmentos correspondientes a los cDNAs, empleamos estas mismas enzimas. Después de digerido el banco, éste fué sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, transferido a una membrana de nylon (Hybond N+), e hibridado con el producto de PCR del dominio SH3 marcado radioactivamente (como se describe en materiales y métodos).

Se localizaron dos bandas de hibridación de aproximadamente 2,200pb y 1,300pb (Fig. 9). Se observaron otras 2 regiones del filtro que dan señal de hibridación. La de mayor peso molecular correspondió al plásmido (probablemente parcialmente digerido). La señal de hibridación que se observa por debajo de la banda de 1,300 pb, podría tratarse de otra banda de hibridación; sin embargo, por las características de la señal, pensamos que de igual forma puede tratarse de la degradación de la banda de 2,200 o de la de 1,300 pb.

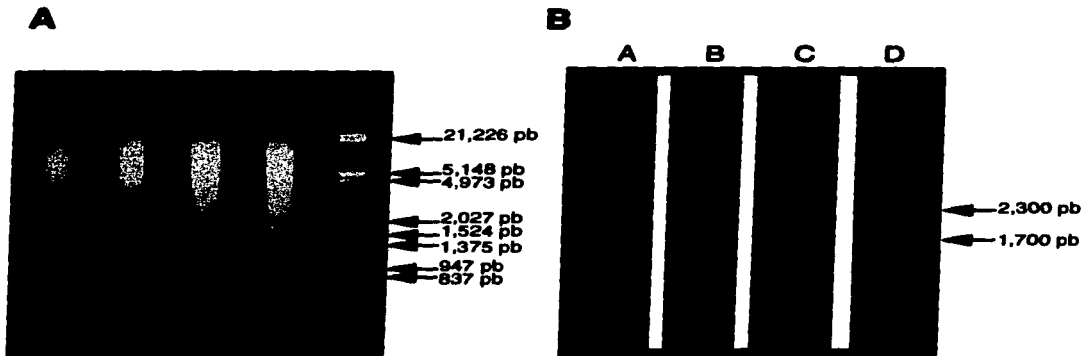


**FIGURA 9. DETECCIÓN DE SECUENCIAS PRESENTES EN EL BANCO DE cDNA DE *M. crystallinum* HOMOLOGAS AL DOMINIO SH3 DE Src. A)** Digestión del banco de expresión de *M. crystallinum* con Not I y Eco RI, los cuatro carriles son réplicas uno del otro. **B)** Hibridación tipo Southern blot entre una de las réplicas del panel A) y la sonda correspondiente a la secuencia del dominio SH3 amplificada por PCR. Las condiciones de hibridación fueron a 45°C en buffer de fosfatos con 40% de formamida. Las condiciones de lavado fueron a 50°C en una solución de SSC 4X y SDS 0.1%.

La detección de secuencias de *P. vulgaris* homólogas a la secuencia del dominio SH3 de Src también se realizó por medio de hibridación tipo "Southern blot". En este caso se hizo la digestión del DNA genómico de *P. vulgaris* con la enzima de restricción Hind III. La digestión se dividió en 4 alícuotas y se corrieron cada una por separado en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, el DNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+) (materiales y métodos) y se cortó el filtro separando cada una de las alícuotas. En un mismo tubo de hibridación se introdujeron los filtros y se hibridaron con el producto de PCR del dominio SH3 marcado radioactivamente. Después de la reacción de hibridación, los filtros fueron separados y lavados por separado en diferentes condiciones de severidad (materiales y métodos).

La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos con los diferentes filtros. En los 4 filtros se observaron claramente 2 bandas de hibridación, una de 2,300pb y otra de 1,700pb aproximadamente. Se detectaron otras bandas de hibridación de un peso molecular menor, de entre 1000pb a 500pb, pero a medida que las condiciones de lavado fueron más severas, estas desaparecieron, sugiriendo que son regiones de menor similitud con la sonda empleada.

Mediante estos experimentos, detectamos que en *M. crystallinum* y *P. vulgaris*, existen secuencias de DNA homólogas a la secuencia del dominio SH3 de Src. Las condiciones de hibridación y lavado empleadas en estos Southernblots, aunque no son las más estrictas, si son lo suficientemente altas para ser confiables. Además, con las diferentes condiciones empleadas con los filtros del DNA genómico de frijol, determinamos las condiciones de hibridación y lavado para realizar tamizados en el banco de cDNA de *P. vulgaris*.



**FIGURA 10. DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) HOMOLOGAS A SH3. A) DNA genómico de frijol digerido con Hind III. B) Hibridaciones tipo Southern blot utilizando como sonda la secuencia del SH3 de Src; A, B, C y D muestran los resultados de las diferentes condiciones de severidad empleadas en los lavados (A: 55<sup>0</sup>C, SSC 4X, SDS 0.1% ; B: 55<sup>0</sup>C, SSC 2X, SDS 0.1%; C: 60<sup>0</sup>C, SSC 4X, SDS 0.1%; D: 60<sup>0</sup>C, SSC 2X, SDS 0.1%).**

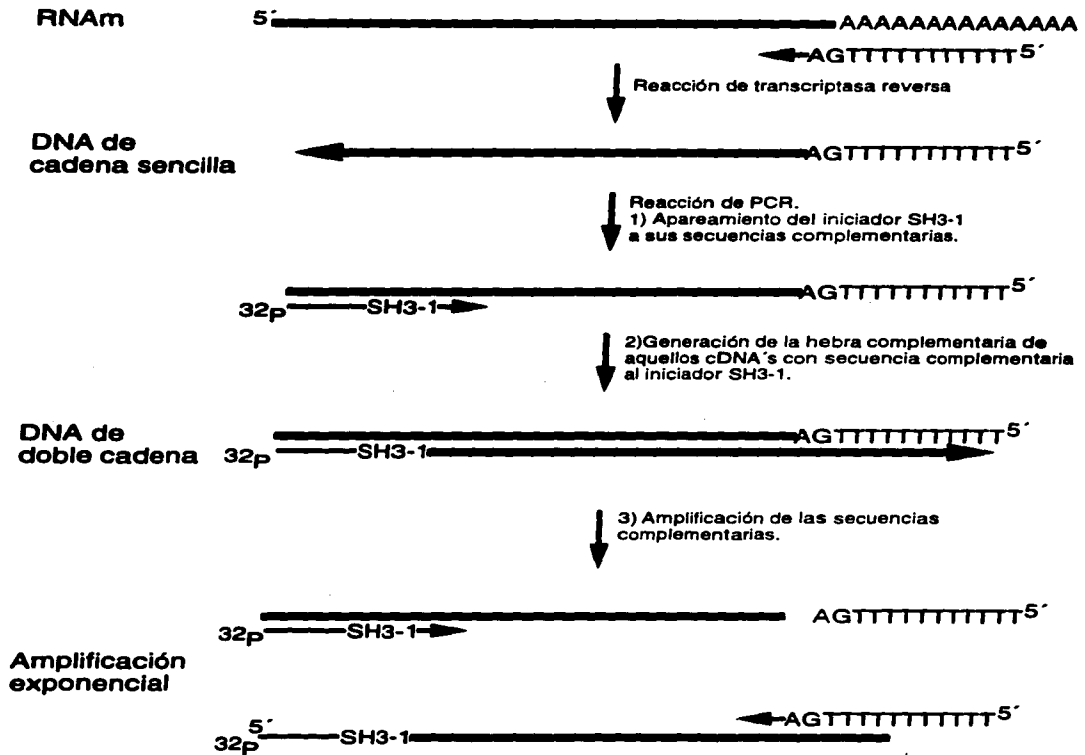
**VII.6.- Tamizados en el banco de cDNA de *P. vulgaris*, utilizando el producto de PCR marcado radioactivamente como sonda molecular.**

Utilizando la misma sonda empleada en los Southern blots anteriores, se realizaron varios intentos por detectar clonas positivas en el banco de cDNA de frijol (4 en total). En cada uno de los intentos se plaquearon aproximadamente  $3 \times 10^5$  placas líticas, y se realizó la detección de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. En el primer tamizado realizado se aislaron 18 clonas positivas; sin embargo en el segundo tamizado demostraron ser positivas falsas. Los hallazgos de clonas positivas falsas, también se repitieron en los tamizados posteriores.

**VII.7.- RT-PCR-"Differential display".**

Debido a los resultados negativos obtenidos en los experimentos previos, decidimos implementar otra metodología para aislar secuencias de *P. vulgaris* homólogas al dominio SH3 de Src. Esta metodología se basa en los principios usados en las técnicas del RT-PCR (transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) y al "differential display" (DD). Primeramente, los RNAs mensajeros de nódulo son utilizados como templado por la enzima transcriptasa reversa para generar una hebra de DNA complementario, el cual posteriormente sirve como templado en la reacción de PCR, en la que se amplifica específicamente la secuencia de interés, determinada por los oligonucleótidos empleados. Uno o ambos iniciadores tienen marca radioactiva incorporada ( $^{32}\text{P}$ ) para que los productos de la amplificación puedan ser posteriormente localizados y purificados a partir de un gel de poliacrilamida (tamaño secuencia) en el cual son separados por electroforesis (Fig. 11). A partir del RNAm de nódulo de *P. vulgaris*, se realizó la reacción de la transcriptasa reversa, utilizando el oligonucleótido oligo (dT)<sub>12-18</sub>. Posteriormente a la reacción, tomamos una alcuota de ésta y realizamos la reacción de amplificación por PCR de la secuencia comprendida entre el oligonucleótido SH3-1 (específico para SH3) y el oligonucleótido oligo (dT)<sub>12-18</sub>. Al oligonucleótido SH3-1 le fué incorporado un fosfato radioactivo en su extremo 5' por medio de una reacción de cinasa (materiales y métodos).

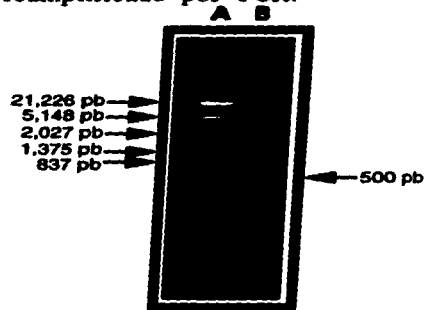




**FIGURA 11. ESTRATEGIA DE AMPLIFICACION POR RT-PCR.**

El experimento fué repetido por triplicado y en ninguna de las repeticiones se detectaron bandas de amplificación. En base a estos datos negativos, decidimos probar con otros oligonucleótidos, para ello empleamos los iniciadores provistos en el kit de "differential display" (Amersham), que cuenta con un juego de oligonucleótidos que tienen 11 timinas (T11) y en su extremo 3' tienen 2 nucleótidos que pueden ser diferentes a timina, como resultado de una combinación de los cuatro nucleótidos que conforman el DNA. De esta manera, los nucleótidos del extremo 3' pueden conferirle mayor especificidad y estabilidad a las hebras de cadena sencilla de DNA complementarios que fueron generados a partir de los RNA mensajeros.

Se probaron al azar 6 de estos iniciadores (T11AT, T11CA, T11CC, T11AG, T11GG y T11AA) y el SH3-1, específico para la secuencia del dominio SH3 de Src. Encontramos que en las reacciones de amplificación donde se emplearon los iniciadores T11AG y T11GG, se generaba una banda de aproximadamente 500 pb. La bandas fueron cortadas del gel de secuencia y reamplificada según el protocolo descrito en material y métodos. La Fig 12 muestra el análisis por electroforesis en agarosa al 1% del producto reamplificado por PCR.



**FIGURA 12. PRODUCTO DE AMPLIFICACION POR RT-PCR. A) Marcador de pesos moleculares (Lambda digerido con Eco RI y Hind III. B) Fragmento amplificado por RT-PCR, utilizando como templado RNA total de nodulos de 20 días y como iniciadores los oligonucleótidos SH3-1 y T11AG.**

La secuencia nucleotídica del producto de PCR generado con los iniciadores SH3-1 y T11AG, muestra un marco de lectura abierto de 306 nucleótidos (Fig. 13).

```

5'
1GGTCATTCTGCCACTATGTGTAAAATGCCCTATGCAAATACAACCTGTGC
  1 G H S A T M C K M P Y A N T T C A

GGTAGAAGGTAGGACTGAGTCCGGCAGATATAAAAGCAACACTTTCTGGC
  V E G R T E S G R Y K S N T F C

GCGATAGTCTCACTGCAGACGCACACCGTCTAATAATGGATGTTGCTACA
  G D S L T A D A H R L I M D V A T

GGGAATGTAAACGTTGAAGTAACACGTATTTACGCTCTGTGCTCTGTAT
  G N V N V E V T R I Y A L V L C I

AACTGACTATTGTATGCTCGCGGTTACGTGACAGCCAATGTTACGATGG
  T D Y C M L A R Y V T A N V T M

CAACTTACACTTGCAGGAGCTTCCGACGAGTCCTAGTATAGCTAGTCGA
  A T Y T C E E L A T S P S I A S R

GAGAGATAGTCGCTACTGCACATGACTGTGCGCTAGATACAGTGTG 3'
  E R 102

```

**FIGURA 13. SECUENCIA NUCLEOTIDICA Y DE AMINOACIDOS DEL PRODUCTO DEL RT-PCR AMPLIFICADO DE FRIJOL.** El análisis de la secuencia muestra un marco de lectura abierto que codifica para 102 aminoácidos.

Al comparar la secuencia de aminoácidos codificados no se encontró similitud con dominios SH3 reportados en la literatura; sin embargo, se encontró similitud con regiones de la proteína LDL-LRP de *Ceanorbhabbitis elegans*. Esta proteína funciona como el principal receptor a los remanentes de Quilomicrones, y como receptor de complejos de inhibidores de proteasas (Yochem y Greenwald 1993). La proteína LDL-LRP comparte tres regiones de similitud con el producto

de PCR (Fig. 14), la primera región corresponde del aa 13 al 31, con 42% de identidad y 68% de similitud. La segunda región es del aa 37 al 57, con 42% de identidad y 66% de similitud. La tercera región va del aa 65 al 97, con 27% de identidad y 51% de similitud.

A

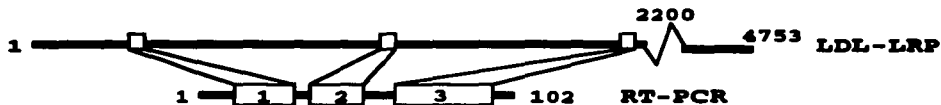
```

1      13 NTCAVEGRTEGSRYSNT 31
      +TT VEG+ ++GR N+
      352 STTIFVEGKDQNGRIVVNS 370

2      37 LTADAHRLIMDVATGNVNVEV 57
      L +D L++DV+ N NV+V
      1274 LNSDQIELLIDVVSQCNSNVQV 1294

3      65 LCITDYCMLARYVTANVTMATYTCHEELATSPSI 97
      +C + CM R AN +T +C++ P++
      2120 ICSSVKCMFGRQAKANNVYNSTGSCDKDRLPPTV 2152
  
```

B



**FIGURA 14.** A) Alineamientos entre la secuencia deducida de aminoácidos del producto del RT-PCR de *P. vulgaris* (arriba) y la proteína LDL-LRP de *C. elegans* (Abajo). Datos obtenidos usando los programas BLASP y BLASTX, el número correspondiente a cada aminoácido se indica a los lados de cada secuencia. 1) Alineamiento con 42% de identidad y 68% de similitud. 2) Alineamiento con 42% de identidad y 66% de similitud. 3) Alineamiento con 27% de identidad y 51% de similitud. En B), esquema que muestra las regiones de similitud entre la secuencia del gen LDL-LRP y el RT-PCR. Los números que se indican dentro de los cuadros, corresponden a los alineamientos mostrados en A.

## VIII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se trató de demostrar la presencia de proteínas con dominios SH3 y de proteínas con sitios de unión a dominios SH3 en sistemas vegetales, utilizando el modelo del nódulo simbiótico del frijol *P. vulgaris*. Se emplearon varias estrategias para localizar a proteínas de frijol con estas características, las cuales se discuten a continuación.

Los ensayos de unión permitieron visualizar varias proteínas del nódulo que fueron capaces de unir específicamente al dominio SH3, como se demuestra en las figuras 4 y 5. En la Fig. 4 se observa que estas proteínas varían conforme a la edad de los nódulos, lo cual es debido a la expresión génica diferencial que se presenta durante la ontogenia del nódulo. Un ejemplo claro de esto es la proteína de aproximadamente 35 kDa, que poco a poco disminuye su detección conforme avanza el desarrollo del nódulo (del día 3 al día 22 en la cinética de nodulación). Cabe mencionar que los extractos de proteínas de los primeros días de la cinética no son exclusivamente de nódulo, ya que éstos a temprana edad son muy pequeños y no pueden ser separados de la raíz; por lo tanto, es probable que las proteínas de unión a SH3 detectadas entre los días 3 al 10 de la cinética pertenezcan a la raíz. Sin embargo, a partir del día 15 al día 26 se detecta otra proteína de aproximadamente 66 kDa que conserva sus niveles de expresión. Los cortes con acetona hechos en estos extractos, muestran que la mayoría de las proteínas detectadas, al menos en los primeros días de nodulación, precipitan entre 0-40% de acetona. La proteína de 66 kDa también es detectada en el corte 40-60% de acetona.

En la figura 5 se muestran extractos proteicos de una cinética de nodulación, obtenidos de acuerdo al protocolo IX.7.b. (materiales y métodos). De acuerdo a este protocolo, se extraen proteínas totales del nódulo. La idea de hacer ensayos de unión con las proteínas GST-SH3 y GST sin biotinar fué para evitar la posible detección de proteínas de unión a biotina, esto a pesar de que el control negativo del experimento anterior demostraba que no existía interacción entre proteínas del nódulo y la GST biotinilada. Otra razón fué el corroborar la detección usando un método alternativo de detección de interacciones SH3-proteínas blanco. Los datos muestran la detección de la proteína de 66

kDa únicamente y la no detección de las proteínas de los primeros días de nodulación. Esto puede ser debido a que cuando se hacen cortes con acetona, se favorece el enriquecimiento de algunas proteínas con respecto a otras, mientras que en un extracto con proteínas totales, este fenómeno no ocurre. Sin embargo, la concordancia de ambos experimentos en la detección de la proteína de 66 kDa sugiere que por lo menos existe una proteína del nódulo que es reconocida por el dominio SH3 de Src. Debido a la especificidad de la interacción entre los diferentes dominios SH3 y sus sitios de reconocimiento, es probable que existan otras proteínas que tengan sitios de unión a dominios SH3 que no sean reconocidos por el SH3 que usamos en estos experimentos.

Una vez que se encontraron proteínas con sitios de unión a dominios SH3, tratamos de detectar proteínas que tuvieran dominio(s) SH3; es decir, la contraparte del sistema de interacción proteína-proteína mediada por estos dominios. Para este experimento empleamos una combinación de 7 anticuerpos anti-SH3 con la idea de ampliar el rango de reconocimiento en los extractos del nódulo. El experimento se realizó utilizando los extractos de la cinética de nodulación, y se detectaron proteínas de aproximadamente 20 kDa, 18 kDa y 15 kDa, presentes en los extractos de nódulos de 15 a 25 días. Una cuarta proteína de 30 kDa parece estar en todos los extractos (Fig. 6). No sabemos cual de los 7 anticuerpos que usamos reconoce a las proteínas, tampoco si son reconocidas por dos o más anticuerpos. Resulta interesante que es precisamente en esos mismos días de la ontogenia del nódulo, en los que se detecta la proteína de 66 kDa con sitio(s) de unión al dominio SH3 de Src (Fig. 4 y 5). Es probable que algunas de estas proteínas puedan interactuar, mediante el dominio SH3 de una y el sitio de unión de la otra, debido a que ambas se expresan en los mismos días de la ontogenia, y se sabe que las interacciones mediadas por los dominios SH3 son muy específicas. Sin embargo, no tenemos mayor evidencia que este dato.

Los intentos de aislar los cDNAs correspondientes a alguna de las proteínas detectadas fueron infructuosos. El banco de expresión utilizado fue construido en Lambda-ZAP y el protocolo empleado en los experimentos fue el recomendado por el fabricante (Stratagene). Se realizaron 3 tamizados con representación total del banco en cada uno y con cada una de las sondas (proteínas biotiniladas, anti-GST y anti-SH3). Se implementó también la detección por medio de

quimioluminiscencia que es un método que amplifica 10 veces la señal, con respecto al uso de las enzimas fosfatasa alcalina y peroxidasa.

Existen varias razones que podrían explicar el porqué no se pudieron detectar clonas positivas en los tamizados. Primeramente, el hecho de que cuando el tamizado se realiza detectando las proteínas que se expresan a partir de los cDNAs del banco, estos cDNAs deben de estar clonados en fase, es decir, que el marco de lectura abierto que va a ser traducido sea realmente el que corresponde. Debido a que existen 3 posibles marcos de lectura, las probabilidades de que un cDNA esté clonado en fase, son 1:3. Si además pensamos que los cDNAs que codifican para las proteínas con dominios SH3 o sitios de unión a SH3 probablemente se encuentran en bajas proporciones, la detección de alguno de ellos se vuelve más complicada.

Otra posibilidad se basa en el hecho de que como el banco de expresión fué construido con cDNAs generados a partir del extremo 3' (la región correspondiente al COOH-terminal de la proteína), se pueden producir cDNAs incompletos (que les falte parte del extremo NH-terminal). Si el sitio de unión a SH3 o el dominio SH3 de la(s) proteínas expresadas en el banco se encuentran hacia el NH-terminal, es probable que no hayan sido traducidas. Un caso similar lo demuestra Sparks et al. 1996b, en donde utilizando una sonda específica para el SH3 de Src, fueron incapaces de detectar clonas correspondientes a Src en la genoteca de expresión utilizada.

Una última explicación sería que el número de fagos así como la diversidad en el tamaño de los cDNAs pueden verse afectados con la edad y reamplificaciones del banco. Datos previos generados en el laboratorio indican una marcada disminución en la detección de placas positivas para un cDNA abundante, cuando se comparan 2 experimentos realizados con 18 meses de diferencia (datos no mostrados). Por otro lado, cuando se amplifica el banco, se favorece la amplificación de las clonas mas pequeñas (que tengan insertos mas pequeños), lo que puede influir en la dilución en el banco de aquellas clonas con insertos de mayor tamaño.

Otra estrategia empleada para tratar de clonar cDNAs codificantes para proteínas con dominios SH3, fué la complementación de la mutante DDY 495 de la levadura *S. cerevisiae*. Se utilizó la cepa DDY 495 debido a que tiene una disrupción en el gene Slal, el cual cuenta en su secuencia con 3 dominios SH3. El fenotipo que le confiere la

disrupción del gene Slal a la levadura, es termosensibilidad a 37°C. Debido a que no contábamos con un banco de cDNA de *P. vulgaris* que fuera replicable en levadura, utilizamos el banco de expresión de *M. crystallinum*, que fué construído y amablemente proporcionada por el M. en C. Oscar Mascorro.

El experimento de complementación se hizo por duplicado y en ambas repeticiones. Después de la primera selección a 37°C. se encontraron clonas capaces de crecer a 37°C. Sin embargo, tras comprobar su capacidad complementante retransformando a las mutantes, éstas demostraron ser positivas falsas, en otras palabras, se seleccionaron clonas capaces de suprimir el fenotipo mutante original de la cepa DDY 495.

El hecho que no se hayan encontrado cDNAs capaces de complementar la disrupción del gene Slal, no asegura que en la planta *M. crystallinum* no exista un gene homólogo a Slal, ya que para que la complementación sea efectiva además de la presencia del gen, tiene que expresarse adecuadamente y la proteína expresada tiene que ser funcional. Pueden presentarse varios inconvenientes en la complementación, desde la expresión del gene (que esté completo y en fase, que los niveles y estabilidad del RNA mensajero sean adecuados, etc.), hasta la funcionalidad de la proteína (que esté adecuadamente plegada, que no forme agregados y precipite, etc.). De tal manera que la complementación génica, aunque poderosa, también tiene sus inconvenientes técnicos.

Posteriormente a estos datos, decidimos explorar otra alternativa metodológica en la búsqueda de cDNAs codificantes para proteínas con dominios SH3. El empleo de sondas de DNA no ha sido una estrategia común en la búsqueda de dominios SH3, debido a su baja homología a nivel de secuencia de nucleótidos; sin embargo, decidimos realizar algunos experimentos con sondas de DNA para ampliar el espectro de detección de secuencias codificantes para dominios SH3.

De esta manera, se detectaron secuencias de *M. crystallinum* y *P. vulgaris* que hibridaron con la secuencia del dominio SH3 de Src (Figs. 9 y 10). Las condiciones de hibridación empleadas si bien no son las más severas que se pueden aplicar a un Southern blot, sí son lo suficientemente altas para ser confiables.

Se realizaron tamizados con el banco de cDNA de *P. vulgaris* y el producto de PCR del dominio SH3 de Src como sonda bajo las mismas



condiciones de hibridación y lavado empleadas en los Southern blots contra el genoma de frijol. Los resultados fueron negativos, no se detectaron clonas capaces de hibridar con la sonda. En tres intentos realizados, en el tamizado primario se encontraron algunas clonas positivas falsas que se detectaron como tales en el tamizado secundario. De acuerdo a estos datos, en el banco de expresión de *P. vulgaris* que empleamos no existen secuencias codificantes para dominios SH3, ya sea porque aquellos cDNAs que originalmente cuentan con dominios SH3 están incompletos en el banco de expresión en el extremo 3' o se perdieron por completo en alguna amplificación del banco.

Debido a estas hipótesis, se decidió emplear un método alterno. Se partió de RNAs mensajeros del nódulo para generar cDNAs y amplificar aquellos que fueran capaces de ser reconocidos por el oligonucleótido SH3-1 (diseñado a partir de la secuencia del dominio SH3 de v-Src, Fig. 7). Se emplearon varios iniciadores poli-T para completar la reacción de PCR, y se encontró que con los iniciadores T11AG y T11GG del kit de "Differential Display" se generaba una banda de aprox. 500 pb. Para estos experimentos, se marcó únicamente el iniciador SH3-1 con el fin de asegurar que la banda detectada llevara la secuencia de este oligonucleótido. La secuencia parcial de este producto de amplificación se determinó utilizando el iniciador SH3-1 fosforilado.

El análisis de la secuencia del producto de amplificación mostró que se trataba muy probablemente de una región codificante, ya que se encontró un marco de lectura abierto (para 102 aminoácidos, Fig. 13) en la fase 1 y varios codones de término en las otras fases de lectura, de acuerdo al método de Shepherd. (1981). Al comparar la secuencia deducida de aminoácidos con secuencias de dominios SH3, no se encontró similitud con ninguno de ellos, sugiriendo que la secuencia amplificada se generó a partir de una secuencia con cierto parecido al iniciador SH3-1 sin tratarse de un dominio SH3 verdadero. Al comparar la secuencia con los bancos de datos disponibles, se encontró que comparte tres regiones de homología con la proteína LDL-LRP de *C. elegans* (Fig. 14). Descrita originalmente en humanos, la proteína LDL-LRP está constituida por 4753 aminoácidos y funciona como un receptor de lípidos de baja densidad. Sin embargo, este dato debe tomarse con precaución, ya que el programa BLASTP señala que la homología a nivel de secuencia de aminoácidos se encuentra en los límites de confiabilidad establecidos en el programa. Búsquedas con

otros programas como el **PROPSEARCH** muestran secuencias homólogas, pero por debajo de los límites de confiabilidad.

Debido a la poca confiabilidad en los alineamientos de la secuencia del producto del RT-PCR contra los bancos de datos, no se puede concluir con certeza si realmente se trata de una proteína homóloga al receptor LDL-LRP de *C. elegans*, o a alguna otra proteína conocida. Se necesita conocer más de la secuencia del cDNA para poder establecer conclusiones al respecto.

Después de realizado el trabajo experimental propuesto en esta tesis, y con los datos presentados en la misma, llegamos a las siguientes conclusiones:

- a).- Existen proteínas en nódulo de frijol con sitios de unión a dominios SH3.
- b).- Existen proteínas de nódulo de frijol con dominios SH3.
- c).- La expresión de las proteínas con sitios de unión a dominios SH3 y proteínas con dominios SH3, varía con la edad de los nódulos de frijol.

## **IX.- MATERIALES Y METODOS**

### **IX.1.- Expresión de las proteínas GST-SH3 y GST.**

Para la expresión y purificación de proteínas de fusión, primeramente se inocularon las cepas de interés (en este caso, pSH3 y pGST) en 3 mL LB con 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina. Se crecieron durante toda la noche a una temperatura de 37°C con una agitación de 250 rpm. De estos cultivos crecidos, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada uno y se reinocularon en 3 mL de LB con las mismas condiciones que el cultivo anterior. Este cultivo se creció aproximadamente de 2 a 3 h. La idea de estos primeros pasos es tener un cultivo fresco en el que la curva de crecimiento bacteriano esté en su fase exponencial.

Para inducir la expresión de las proteínas, se adicionaron 15  $\mu\text{L}$  de 100 mM IPTG (Sigma), para alcanzar una concentración final de 0.5 mM, incubando por 2 horas en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores. Posteriormente, las células se colectaron en tubos eppendorf (un tubo de 1.5 mL para cada 3 mL), se lavó la pastilla con 1 mL de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) frío y se resuspendió al final de los lavados en 300  $\mu\text{L}$  de PBS, conservándose siempre en hielo.

Para romper a las células, cada una de las muestras se sonicó tres veces, a 18 de amplitud durante 20 s, con intervalos de 30 s entre cada pulso de sonicación, siempre teniendo la muestra en hielo.

Posterior a la sonicación, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 14,000 rpm a 40°C, el sobrenadante se transfirió en un tubo nuevo, y se tomó una alícuota para ser analizada por SDS-PAGE al 15%.

### **IX.2.- Purificación de las proteínas GST y GST-SH3.**

Una vez teniendo el lisado celular, se llevó a un volumen de 300  $\mu\text{L}$ , al cual se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión (50% en PBS) de la resina glutatión-agarosa (Sigma), agitando suavemente por inversión durante 2 min a temperatura ambiente. Después se lavó la resina, se adicionó 1 mL de PBS frío, se agitó suavemente por 2 min y se centrifugó a 14,000

rpm por 10 s.

La pastilla se lavó 2 veces más en condiciones idénticas. Para separar a las proteínas de la resina (GST o GST-SH3 dependiendo de la muestra), la pastilla se resuspendió después del último lavado en 200  $\mu$ L de PBS. Se le adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de 5 mM glutatión (Sigma) reducido (que fue disuelto en 50 mM Tris HCl pH 8), se mezcló suavemente durante 2 min, se centrifugó por 10 s y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo. La pastilla fue resuspendida en 200  $\mu$ L de PBS y se repitieron los pasos 4 y 5 dos veces más, colectando las fracciones por separado. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE al 15%.

### **IX.3.- Biotinación de proteínas.**

Para la biotinación de las proteínas GST y GST-SH3, se utilizó D-Biotin-N-hydroxysuccinimide ester (Biotin-NHS), así como el protocolo de biotinación propuesto por el fabricante (Boehringer Mannheim). El reactivo Biotin-NHS se disolvió en DMSO (15 mg/mL), y se adicionó a las proteínas purificadas, en una relación molar de 10 veces más de Biotin-NHS que la proteína a biotinar, en un volumen de 1 mL. La reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, en la obscuridad y con agitación suave. Posteriormente, la reacción se pasó por una columna de Sephadex G-25 (para separar a las proteínas ya biotinadas). Las columnas se lavaron con 10 mL de PBS, y se equilibraron con 25 mL de una solución 0.1% de albúmina sérica bovina en PBS (PBS-BSA), seguida de 20 mL de PBS.

### **IX.4.- "Dot blot" con biotina.**

Para determinar en que fracción se encontraban las proteínas biotinadas, se adicionaron 5  $\mu$ L de cada una de las fracciones sobre nitrocelulosa Hybond C o Immobilon (previamente cuadrículada), colocando una toalla absorbente debajo del filtro para secar las muestras. La membrana se incubó en solución de bloqueo (PBS 1X, 20% Tween 20) a temperatura ambiente durante 5 min con agitación constante y se lavó 2 veces con solución de lavado (PBS 1X, 0.05%

Tween 20) durante 5 min.

Posteriormente se incubó la membrana con estreptavidina diluída en relación 1:3000 en PBS 1X, 0.05% Tween 20 durante 1 h, con agitación constante. Se volvió a lavar la membrana dos veces más con solución de lavado.

El revelado se realizó con una solución de DBA (diaminobenzidina, Sigma) 25 mg, 40  $\mu$ L peróxido de hidrógeno en 50 mL de PBS 1X, incubando aproximadamente de 30 s a 1 min. Una vez que aparecieron las señales, la membrana se lavó con agua y se secó entre dos toallas absorbentes.

#### **IX.5.- Determinación de la concentración de proteínas (blotínadas y no blotínadas).**

Para la determinación de la concentración de proteínas, se empleó el método de Bradford, el cual se basa en la cuantificación de la unión de un colorante (azul brillante de Coomassie) a la proteína en cuestión. Las determinaciones de ésta son comparadas con las realizadas con diferentes cantidades conocidas de una proteína estándar, la BSA. Las muestras del estándar se prepararon a partir de una solución concentrada de 1 mg/mL de BSA, y fueron desde 0  $\mu$ g (blanco) hasta 20  $\mu$ g, aforando a 800  $\mu$ L cada muestra y adicionando 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford a cada una. Se tomaron 10  $\mu$ L de la muestra de interés, y se adicionaron 790  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford. Los tubos con las muestras se dejaron reposar durante 2 min a temperatura ambiente, y utilizando una microcelda de 1 mL se midió la absorbancia a 595 nm, primero con las muestras estándar (para establecer la curva de concentración) y después las de la muestra de interés.

#### **IX.6.- Cinética de nodulación de *P. vulgaris*.**

Para la obtención de nódulos de *P. vulgaris* se crecieron plantas de frijol y se colectaron nódulos a diferentes días de su crecimiento. Se utilizaron semillas de *P. vulgaris* (variedad Negro Jamapa), y un inóculo bacteriano de *Rhizobium tropici* CIAT 899.

### a) Preparación del Inóculo bacteriano.

Primeramente se prepararon 100 mL de medio de cultivo PY (Péptona de caseína 5 g, extracto de levadura 3 g, por cada litro de medio), al cual se le adicionaron 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.7 mM y 100  $\mu\text{L}$  del antibiótico ácido nalidíxico (10 mg/mL). De este medio se tomaron 3 mL y se colocaron en un tubo de ensayo al cual se le inoculó la cepa *R. tropici* CIAT 899. El tubo se incubó durante 20 horas; posteriormente, con este cultivo se inoculó el resto de los 100 mL del medio de cultivo PY y el total se incubó por 2 días.

### b) Germinación de semillas de frijol.

Por otro lado se prepararon las semillas de frijol variedad Negro Jamapa. Se lavó una cantidad de semillas a utilizar (más un 50% extra) en agua corriente. Posteriormente las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 10% (cloralex) durante 10 min. Después se lavaron abundantemente con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se eliminó el exceso de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se prepararon "camas" (charolas esterilizadas con papel humedecido con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril) donde se colocaron las semillas, se taparon las charolas con papel aluminio y se incubaron durante 3 días a 25°C.

Una vez que las semillas germinaron (y el inóculo bacteriano preparado se encontraba en fase exponencial de crecimiento) se colocaron 5 plántulas por cada maceta con vermiculita (previamente esterilizadas), asegurándose que la radícula se orientara hacia abajo. A cada plántula se le adicionaron 1.5 mL del inóculo bacteriano, y se colocaron en el invernadero. En cada fecha indicada en la cinética (a los 3, 5, 10, 15, 22, 26 días) se colectaron los nódulos de las plantas contenidas en 3 macetas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C hasta completar la cinética de desarrollo.

## IX.7.- Extracción de proteínas de nódulo.

Una vez terminada la cinética de nodulación, se procedió a purificar a las proteínas de los nódulos. Se emplearon dos métodos de purificación de proteínas, en el primero se empleó una solución de extracción y se iniciaron cortes con acetona, lo que permite fraccionar y

enriquecer los extractos proteicos. En el segundo método, el extracto proteico no se separó en fracciones.

a) Extracción de proteínas usando solución de extracción y cortes con acetona.

Los nódulos fueron molidos hasta polvo en el mortero sin permitir su descongelamiento (adicionando nitrógeno líquido) y se le adicionó solución de extracción (30% sacarosa, 40 mM Tris pH 7.8, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 1.5% PVPP) en una relación de 3:1 (3mL/g). Se agitó durante 10 min, y se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se analizó por SDS-PAGE.

Los cortes con acetona se realizaron de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Volúmen de Acetona} = \frac{V_x (C_2 - C_1)}{100 - C_2}$$

Donde:  $V_x$  = Volúmen de la muestra.

$C_1$  = Concentración inicial.

$C_2$  = Concentración final.

b) Extracción de proteínas totales de nódulo, hirviendo el tejido molido en solución de Laemmli para muestras.

Los nódulos fueron molidos hasta polvo en el mortero sin permitir su descongelamiento (adicionando continuamente nitrógeno líquido). Una vez en polvo, se le adicionó solución de Laemmli 1X (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% Glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol) en una relación 3:1 (3mL/g). Se hirvió durante 5 min a 95°C y se centrifugó por 20 min a 13000 rpm a 4°C. El sobrenadante se trasladó a otro tubo y se analizó por SDS-PAGE.

### IX.8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

La electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ausubel (1996). Los geles se prepararon de la siguiente manera:

#### A) Gel Resolutivo:

H <sub>2</sub> O	840 $\mu$ L
Acrilamida 30%	1.75 mL
Tris pH 8.8	910 $\mu$ L
SDS 10%	35 $\mu$ L
Persulfato de Amonio al 10%	35 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L
	<hr/>
	3.5 mL

#### B) Gel Concentrador:

H <sub>2</sub> O	1.4 mL
Acrilamida 30%	330 $\mu$ L
Tris pH 6.8	250 $\mu$ L
SDS 10%	20 $\mu$ L
Persulfato de Amonio al 10%	20 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L
	<hr/>
	2.2 mL

La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (150V) en buffer de corrida (25 mM Tris, 250mM glicina, 0.1% SDS). Una vez terminada la corrida, el gel se tiñó con azul de Coomasie (azul brillante de Coomasie R250 0.25 g en 90 mL de metanol: H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) y 10 mL de ácido acético glacial), o se preparó para la electrotransferencia.



### **IX.9.- Electrotransferencia de proteínas.**

Después de separadas las proteínas por SDS-PAGE, el gel se preparó para la electrotransferencia, lavándolo con H<sub>2</sub>O e incubándolo en buffer de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0.037% SDS y 20% metanol) durante 10 min. La membrana (Immobilon, Millipore) se equilibró durante 30 s en metanol, se lavó con H<sub>2</sub>O y se incubó durante 5 min en buffer de transferencia. Utilizando una cámara de electrotransferencia (OWL), y el protocolo propuesto por el fabricante, se electrotransfirió a 400 mA (corriente constante) durante 2 h.

### **IX.10.- Ensayos de unión a dominios SH3-proteínas con sitios de unión a dominios SH3**

Los ensayos de unión son muy parecidos a los "western blot", la diferencia entre ambos es que en los ensayos de unión no se usan inmunoglobulinas como detector primario, sino otra proteína, en este caso GST o GST-SH3 biotinadas. En los ensayos de unión, también pueden ser utilizados otro tipo de detectores primarios, como péptidos sintéticos (Sparks, et al. 1996b).

Una vez transferidas las proteínas de nódulo de frijol a la membrana de nitrocelulosa (Hibond-C Extra, Amersham), se procedió a incubar la membrana en 10 mL de solución de bloqueo, 2% de albúmina (Boehringer Manneheim) en TBST (10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; al 5% Tween 20) durante 1 h a 42°C con agitación constante. Posteriormente se incubó la membrana en TBST con la proteína biotinada (GST ó GST-SH3) a una concentración de 1 µg/mL durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavó la membrana 3 veces con TBST, 10 min cada vez y se incubó con estreptavidina-peroxidasa (Boehringer Mannheim) a una dilución 1:3000 en TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Después se lavó 2 veces con TBST, 10 min cada vez y se reveló durante aproximadamente 2 min con la solución diaminobenzidina-TBST (25 µg/50 mL) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 µL por cada 50 mL de solución), preparada al momento. Finalmente la membrana se secó entre dos toallas absorbentes.

### **IX.11.- Inmunodetección de proteínas con sitios de unión a SH3.**

El protocolo de los ensayos de unión en los cuales no se emplearon proteínas biotinadas, sino un anticuerpo anti-GST para detectar la unión de las proteínas GST o GST-SH3 a proteínas de nódulo de frijol, es similar al protocolo descrito anteriormente, sin embargo tiene algunas diferencias que se mencionan a continuación.

Una vez teniendo las proteínas de nódulo transferidas en nitrocelulosa Hybond-C (Amersham), se bloqueó la membrana con 10 mL de solución de bloqueo, 2% de albúmina en TBST durante 1 h a 42°C con agitación constante. Se adicionó el detector primario (GST o GST-SH3) a una concentración de 1 µg/mL y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavó la membrana 3 veces con TBST, 10 min cada vez y posteriormente se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-GST a una dilución 1:1000 en TBST, después el filtro se lavó 3 veces con TBST, 10 min cada vez. Se adicionó el anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (AP) (Amersham) a una dilución de 1:10000 en TBST, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante, se lavó el filtro 3 veces con 10 mL de TBST. Finalmente se reveló aproximadamente durante 3 min en una solución de 33 µL de NBT y 16.5 µL de BCIP (Boehringer Mannheim) en 10 mL de buffer AP (100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris HCl pH 9.5), según el protocolo del distribuidor.

### **IX.12.- Detección de proteínas de nódulo de *P. vulgaris* con dominio(s) SH3 .**

La detección de proteínas de nódulo de *P. vulgaris* se realizó utilizando una mezcla de 7 anticuerpos anti-SH3 (anti v-Src, anti c-Src, anti Lck, anti p85, anti Fyn, anti c-Abl, anti c-Abl) proporcionados por la Dra. Yvonne Rosenstein. El protocolo descrito a continuación, es básicamente el empleado en una hibridación tipo "western-blot".

Una vez transferidas las proteínas de nódulo del frijol a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, Amersham), se procedió a incubar la membrana en 10 mL de solución de bloqueo, 2% de albúmina en TBST durante 1 h a 42°C con agitación constante. Posteriormente la

membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con la mezcla de anticuerpos anti-SH3. Después el filtro se lavó 3 veces con TBST, 10 min cada vez. Se adicionó el anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (AP) a una dilución de 1:10000 en TBST, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante, se lavó el filtro 3 veces con 10 mL de TBST. Finalmente se reveló aproximadamente durante 3 min en una solución de 33  $\mu$ L de NBT y 16.5  $\mu$ L de BCIP en 10 mL de buffer AP, según el protocolo del distribuidor.

### IX.13.- Titulación del banco de cDNA.

El banco de expresión utilizado para aislar las clonas de cDNA correspondientes a proteínas con sitios de unión a dominios SH3 o dominios SH3 fué construido en el vector lambda ZAP a partir de RNAm de nódulos de *P. vulgaris* de 13 días.

Primeramente determinamos el título del banco, es decir la concentración de upf (unidades formadoras de placas) por mL de medio. El método empleado en la determinación del título, se basa en realizar diluciones progresivas en un orden de magnitud al concentrado original del banco. Posteriormente, con estas diluciones se infectan células de *E.coli* las cuales son plaquedas por duplicado sobre medio de cultivo, se incuban y después se cuenta el número de placas líticas formadas a partir de cada dilución.

En todos los experimentos de titulación, tamizados y amplificación del banco, se utilizó la cepa de *E.coli* MFR'. El concentrado de células se realizó ajustando la concentración a un cultivo fresco de la cepa MFR' a una D.O. de entre 0.5 a 0.6 en medio SM (para 50 ml de medio: 0.58 g NaCl, 0.2g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5 mL de 1M Tris HCl, pH 7.5, 0.01% gelatina). Este concentrado fué conservado a 40C y se utilizó sólo en los 4 días posteriores a su preparación. Por otro lado, se hicieron las diluciones del banco, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>: en medio SM. La infección de las células con los fagos se realizó en tubos eppendorf debidamente marcados, adicionando 200  $\mu$ L del concentrado de las células en cada tubo, y un volúmen estándar (menor de 100  $\mu$ L) de cada dilución del banco a cada tubo. Los tubos se mezclaron suavemente (sin usar vortex) por unos segundos, y se incubaron a 370C durante 30 min sin agitación.

Las células ya infectadas fueron mezcladas con agar suave (0.7%

agarosa) a una temperatura de 42°C, contenidos en Tubos de ensayo. Posteriormente, el agar suave se vertió sobre cajas de Petri con medio de cultivo LB (para 1 litro de medio: 10gr peptona de caseína, 10gr NaCl, 5gr extracto de levadura, 15gr agar,), cuidando de expandir perfectamente el agar sobre toda la superficie del medio de cultivo. Las cajas se secaron y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

En los diferentes experimentos con el banco se emplearon tres tipos de cajas de Petri de diferente tamaño, de tal manera que se estableció una relación entre el volumen de agar suave, y el del concentrado de células con respecto a la superficie de la caja de petri empleada.

Vol. del concentrado de células	Vol. de agar suave	Caja de Petri
200 µL	3 mL	90 mm
650 µL	7 mL	150 mm
800 µL	15 mL	20x20 cm

#### **IX.14.- Tamizados del banco de cDNA de *P. vulgaris* para aislar clonas que expresen proteínas con sitio(s) de unión a SH3.**

La detección de proteínas con sitio(s) de unión al dominio SH3 de Src en los tamizados del banco de cDNA, se realizó mediante dos estrategias diferentes, en la primera de ellas se utilizó la proteína GST-SH3 biotinada como sonda; en la segunda estrategia se usó la misma proteína (sin biotinar) y un anticuerpo anti-GST para detectar las posibles interacciones entre el dominio SH3 de la proteína GST-SH3 y alguna proteína del banco. Los protocolos de ambas estrategias se derivaron de los protocolos de detección de proteínas con sitios de unión a SH3 descritos en IX.10 y IX.11.

Para la realización de ambas estrategias de detección, primeramente se plaquearon  $2 \times 10^5$  ufp del banco de cDNA, se indujo la expresión de las clonas de cDNA's en cada placa y se transfirió por

duplicado a las proteínas expresadas a membranas de nitrocelulosa, de acuerdo al siguiente protocolo.

Con los datos de la titulación del banco, se hicieron diluciones para plaquear 4 cajas de Petri de 150 mm con  $5 \times 10^4$  ufp por cada caja, teniendo en total  $2 \times 10^5$  de fagos plaqueados. La dilución, infección y plaqueo se realizó como se describe en el protocolo de titulación de los fagos. Después de plaqueados los fagos, las cajas se incubaron 3.5 h a 42°C. Por otro lado, se cortaron membranas de Hybond-C (Amersham) del mismo tamaño de la caja de Petri (8 membranas, 2 para cada caja). Poco antes de cumplirse las 3.5 h de incubación de las cajas a 42°C, 4 membranas fueron marcadas con números y como membranas originales y empapadas en una solución de 10mM IPTG (SIGMA), se les secó el exceso de líquido y se colocaron sobre cada una de las cajas de petri. Una vez colocados, utilizando una aguja caliente se señalaron 3 marcas en las membranas y en el medio de cultivo, de tal manera que las membranas quedaron perfectamente orientadas sobre el medio. Estas cajas fueron incubadas durante 4 h a 37°C; posteriormente, las membranas fueron retiradas y lavadas durante 2 min en TBST, y se guardaron húmedas a 4°C envueltos en Saran-Wrap y papel aluminio. Después de retiradas las membranas originales, se colocaron las membranas por duplicado, también tratadas con la solución de 10mM IPTG, y se señalaron las membranas de acuerdo a las marcas del medio de cultivo. Las cajas con los filtros duplicados fueron incubadas durante aproximadamente 10 h, después los filtros se retiraron y se lavaron con TBST.

a) Detección usando GST-SH3 biotinada.

Las membranas (originales y duplicados) fueron lavadas con TBST durante 30 min e incubadas en solución bloqueadora (2% de albúmina en TBST) durante 1 h a 42°C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas 2 h a temperatura ambiente con la proteína biotinada GST-SH3 a una concentración de 1 µg/mL en TBST. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST. 10 min cada vez, y se incubaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Boehringer Mannheim) diluida 1:3000 en TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 2 veces con TBST. El revelado se realizó con la solución diaminobenzidina-TBST (25 µg/50 mL y 40 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 50 mL de

solución) preparada al momento. Finalmente las membranas se secaron entre dos toallas absorbentes.

**b) Detección usando el anticuerpo anti-GST.**

Las membranas (originales y duplicados) fueron lavadas con TBST por 30 min e incubadas en solución bloqueadora (2% de albúmina en TBST) durante 1 h a 42°C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas 2 h a temperatura ambiente con la proteína GST-SH3 a una concentración de 1 µg/mL en TBST. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST, 10 min cada vez; posteriormente, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-GST a una dilución 1:1000 en TBST, después las membranas se lavaron 3 veces con TBST, 10 min cada vez. Se adicionó el anticuerpo anti-conejo acoplado a AP a una dilución de 1:10000 en TBST, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron las membranas 3 veces con 10 mL de TBST. Finalmente se revelaron aproximadamente durante 3 min en una solución de 33 µL de NBT y 16.5 µL de BCIP en 10 mL de buffer AP, según el protocolo del distribuidor.

**IX.15.- Tamizado del banco de cDNA de nódulo de *P. vulgaris* para detectar clonas que expresan proteínas con dominios SH3.**

Para este tamizado empleamos cajas de Petri de 20 x 20 cm de superficie, en las cuales se pueden plaquear hasta  $2 \times 10^5$  ufp. El protocolo básico de dilución del concentrado original del banco, así como la infección de las células MFR y el plaqueo en las cajas de Petri se realizó como se describe en el protocolo de titulación de fagos (IX.13).

Con los datos de la titulación del banco, se hicieron diluciones para plaquear 2 cajas de 20 x 20 cm con  $2 \times 10^5$  ufp por cada caja. Después de plaqueados los fagos, las cajas se incubaron 3.5 h a 42°C. Por otro lado, se cortaron membranas de Hybond-C del mismo tamaño de la caja de Petri (2 membranas para cada caja). Poco antes de cumplirse las 3.5 h de incubación de las cajas a 42°C, 2 membranas fueron marcadas con números y como membranas originales y empapadas en una solución de 10 mM IPTG (SIGMA), se les secó el exceso de líquido y se colocaron

sobre cada una de las cajas de Petri. Una vez colocadas, utilizando una aguja caliente se señalaron 3 marcas en las membranas y en el medio de cultivo, de tal manera que las membranas quedaron perfectamente orientadas sobre el medio. Estas cajas fueron incubadas durante 4 h a 37°C; posteriormente, las membranas fueron retiradas y lavadas durante 2 min en TBST y se guardaron húmedos a 40°C envueltos en Saran-wrap y papel aluminio. Después de retirados las membranas originales, se colocaron las membranas por duplicado, también tratadas con la solución de 10 mM IPTG, y se señalaron las membranas de acuerdo a las marcas del medio de cultivo. Las cajas con los filtros duplicados fueron incubadas durante aproximadamente 10 h, después los filtros se retiraron y se lavaron con TBST.

La detección de proteínas con dominio(s) SH3 expresadas a partir del banco de cDNA de nódulo, se realizó de acuerdo al protocolo anteriormente empleado en la localización de proteínas de nódulo de frijol, descrito en IX.12. Una variante que empleamos en este tamizado, fué el uso del kit de quimioluminiscencia (Amersham) para revelar.

Las membranas (originales y duplicados) fueron lavadas con TBST por 30 min e incubadas en solución bloqueadora (2% de albúmina en TBST) durante 1 h a 42°C. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con la mezcla de anticuerpos anti-SH3. Después las membranas se lavaron 3 veces con TBST, 10 min cada vez. Se adicionó el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:10000 en TBST, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante, seguido del lavado de las membranas 3 veces con 10 mL de TBST. Finalmente se revelaron las membranas siguiendo el protocolo del kit de quimioluminiscencia según las especificaciones del fabricante.

#### **IX.16.- Transformación de la cepa DDY 495 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el banco de expresión de *M. crystallinum*.**

Las cepas de *S. cerevisiae* DDY 494 y DDY 495 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. David Drubin; los genotipos de las cepas son:

DDY 494: MATa leu2-3, 112 ura3-52

DDY 495: MATa leu2-3, 112 ura3-52 sla1- $\Delta$ 1:URA3

Primero se prepararon las levaduras para ser transformadas (células competentes). Partiendo de un cultivo de toda la noche de la cepa DDY 495, se tomaron 50  $\mu$ L de éste y se inocularon en 100 mL de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% péptona de caseína, 2% dextrosa) y se incubó toda la noche a 30°C, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de entre 1 a 2 unidades a 660nm. Las células se concentraron por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min en tubos Falcon de 50 mL. Se lavaron con 30 mL de H<sub>2</sub>O, y después con Li-TE (100 mM acetato de litio, 10 mM Tris HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA), con una resuspensión final en 5 ml de Li-TE (relación 1/20 del cultivo) e incubación de 1 h a 30°C con agitación. Se volvieron a centrifugar las células y se resuspendieron en G-Li-TE (12% glicerol, 100 mM acetato de litio, 10 mM Tris HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) en una relación de 1/100 del cultivo original. Las células se dividieron en alícuotas de 100  $\mu$ L y se guardaron a -70°C.

Una vez preparadas las células competentes, se les determinó la eficiencia de transformación. Para esto, a una de las alícuotas (antes de congelar) se le adicionó 10  $\mu$ L de "acarreador de DNA" (1% DNA de esperma de salmón fragmentado), y 5  $\mu$ L del banco de cDNA de *M. crystallinum* (1  $\mu$ g/ $\mu$ L). Se mezcló bien (sin vortex), se dejó reposar durante 5 min y después se le adicionó 700  $\mu$ L de la solución PEG Li-TE (40% Polietilenglicol 4000 en Li-TE), y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente (sin agitación). Posteriormente, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 10 min, se centrifugó durante 10 s (a máxima velocidad) y se retiró el sobrenadante (650  $\mu$ L). Los 150  $\mu$ L restantes se plaquero en cajas de Petri con medio mínimo SD (0.7% yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO), 2% glucosa, 0.5 M 10X MES, pH 6 100ml/lit, 1.5% agar) realizando diluciones para poder contar las colonias formadas en cada cultivo y poder establecer la eficiencia de transformación.

Una vez determinada la eficiencia de transformación, se procedió a seleccionar complementantes a la mutante DDY 495 mediante transformación con el banco de cDNA de *M. crystallinum* a 10 alícuotas de células competentes para lograr la cantidad de  $4 \times 10^5$  de colonias



transformantes. El protocolo de transformación fué básicamente el mismo descrito anteriormente, pero con algunas modificaciones en el manejo de las transformantes, que se describen a continuación.

Para el plaqueo de las transformantes (tras el choque térmico), se hicieron 16 cajas de Petri de 150 mm con medio mínimo SD, en las cuales se plaquéó la mitad de cada alícuota transformante. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 3 d, el número de colonias que creció fue menor al estimado en las cuentas viables (aproximadamente 10 veces menos), lo que indicaba que el congelamiento-descongelamiento de las células competentes disminuye la eficiencia de transformación.

Para evitar este problema lo que se hizo fué preparar las células competentes frescas y transformarlas antes de congelar. El protocolo que seguimos es el mismo descrito anteriormente en la eficiencia de transformación y en base a los resultados obtenidos, se transformaron 10 alícuotas frescas de células competentes. Después de aplicar el choque térmico se centrifugaron las transformaciones y se descartaron 500 µL del sobrenadante de cada tubo. El resto se adicionó a un matraz de 1000 mL que contenía 400 mL de medio mínimo SD líquido. Inmediatamente se le midió la D.O. y se incubó durante 4 d a 30°C con 250 rpm de agitación constante. Al cuarto día, se concentraron las células (por centrifugación) en 100 mL de SD, las cuales se dividieron en alícuotas de 25 mL contenidas en tubos Falcon de 50 mL. A tres de ellos se les adicionó glicerol (15% final) para ser congelados. Se realizaron cuentas viables a partir de la alícuota sin congelar, y en base a estos resultados se plaquaron cajas de Petri de 150 mm conteniendo medio rico YPD y 100 µM Cu. Las cajas se incubaron a 37°C durante 4 d. Usando palillos de madera estériles, se colectaron 50 colonias (de las muchas que aparecieron) al azar, los palillos fueron colocados en tubos eppendorf que contenían 200 µL de H<sub>2</sub>O (para disolver la colonia en el H<sub>2</sub>O). Posteriormente, se tomaron 3 µL del agua de cada tubo y se inocularon en cajas de Petri con diferentes medios, las cuales fueron incubadas a diferentes temperaturas:

YPD + Cu		YPD	30°C
YPD	37°C	SD	
SD + Cu			
SD			

A aquellas colonias que crecieron en los medios adecuados (Tabla 1), se les extrajo el plásmido, con el siguiente protocolo:

Cada colonia se creció por separado en 2 mL de SD durante toda la noche, al día siguiente se centrifugaron las células y se lavaron con 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril (resuspendiendo con vortex), se volvieron a concentrar las células y se resuspendieron en 1 mL de buffer (50mM Tris, pH 7.5, 10mM EDTA, 0.3% β-mercaptoetanol). Se centrifugó y se descartaron 900 µL del sobrenadante, las células se resuspendieron en el resto (100 µL). Se adicionaron 25 µL de la enzima Zymoliasa (5 mg/mL), y se incubó durante 2 h a 37°C, con agitación suave. Posteriormente, se agregaron 25 µL de 10% SDS, y se mezcló en vortex. Después de dejar reposar 1 min., se adicionaron 100 µL de NH<sub>4</sub>OAC 7.5M, se mezcló suavemente y se incubó durante 15 min a -70°C. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min. El sobrenadante (100 µL aproximadamente) se transfirió a tubos nuevos y se le adicionaron 70 µL de isopropanol, se mezcló y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. La pastilla se lavó con 70% etanol (2 veces), se secó al aire y finalmente se resuspendió en H<sub>2</sub>O para ser analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **IX.17.- Minipreparaciones de DNA plasmídico.**

Se inocularon 5 mL de medio Luria conteniendo el antibiótico adecuado con una colonia bacteriana perfectamente aislada y se incubaron a 37°C toda una noche con agitación vigorosa. Se tomó 1.5 mL del cultivo, se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó por 1 min. El resto del cultivo se guardó a 4°C. Se eliminó el medio por aspiración, dejando la pastilla bacteriana tan seca como fuera posible. Se resuspendió la pastilla en 100 µL de la solución I fría (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8.0). Se dejó el tubo 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µL de la solución II recién preparada de (0.2N NaOH, al 1% SDS) y se dejó en hielo por 5 min. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 150 µL de la solución III fría, preparada de la siguiente manera: a 60 mL de acetato de potasio adicionar 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de H<sub>2</sub>O. La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

Se mezcló suavemente en vortex el contenido en posición invertida durante 10 s, y el tubo se colocó en hielo durante 5 min. Una vez que el tiempo transcurrió, los tubos se centrifugaron 15 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo, y los tubos se mezclaron con la ayuda de un vortex. Se centrifugaron dos minutos a 10,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Fueron adicionados dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se mezcló en un vortex, y se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante dos min. Transcurrido el tiempo se centrifugaron 15 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y los tubos se colocaron en posición invertida sobre un papel absorbente para drenar todo el líquido. Una vez escurridos, se adicionó 1 mL de 70% etanol a cada tubo para quitar el exceso de sales y se volvió a centrifugar. Se eliminaron los sobrenadantes y las pastillas se secaron al vacío.

Las pastillas se resuspendieron en 50 µL de T.E. (10:1) conteniendo RNasa pancreática libre de DNasa (20 mg/ml).

#### IX.18.- Amplificación del dominio SH3 de Src.

En base a la secuencia de nucleótidos del dominio SH3 de v-Src se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios a dos regiones que flanquean una región de 178 pares de bases (pb) del dominio. Los oligonucleótidos SH3-1 con la secuencia: 5'GGC GGC GTC ACC ACT TTC3' con una Tm de 60°C; y el SH3-2 con la secuencia: 5'AGG GCG CGA CAT AGT TAC3' con una Tm de 56°C, fueron seleccionados mediante el programa "OLIGO" como secuencias compatibles para ser usados como iniciadores en una reacción de PCR. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM.

La reacción de amplificado fué hecha bajo las siguientes condiciones experimentales:

H <sub>2</sub> O:	65 µL
Buffer 10x:	10 µL (del Kit de PCR, Perkin-Elmer).
dNTP's:	16 µL (de una solución de 200µM de cada dNTP).

SH3-1: 2.5  $\mu$ L (de una solución 10uM).  
SH3-2: 2.5  $\mu$ L (de una solución 10uM).  
DNA TEMPL: 3  $\mu$ L (aproximadamente 100ng/uL).  
Taq DNA POL: 0.5  $\mu$ L (2.5 unidades/100 uL).  
ACEITE MINERAL: 50  $\mu$ L

Las temperaturas empleadas fueron: 95°C 1min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, durante 30 ciclos. El producto de PCR fué analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

#### **IX.19.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

La electroforesis a través de geles de agarosa o de poliacrilamida es el método estándar usado para separar, identificar, y purificar fragmentos de DNA. La técnica es capaz de resolver fragmentos de DNA que no pueden ser separados adecuadamente por otros procedimientos, tales como la centrifugación por gradiente de densidad. Después del corrimiento se puede determinar la localización del DNA dentro del gel, tñiéndolo con bajas concentraciones de bromuro de etidio, el cual es un colorante intercalante y fluorescente; incluso pueden ser detectadas bandas conteniendo tan poco DNA como 1-10 ng por examinación directa del gel en luz ultravioleta. Pueden ser separados DNAs con longitudes desde 200 pb hasta 50 kb en geles de agarosa de diferentes concentraciones, los cuales son corridos generalmente en una posición horizontal en un campo eléctrico de intensidad y dirección constantes.

Para este trabajo se usaron geles de agarosa disueltos en buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA), a concentraciones que variaron desde 1%, 1.5% y 2%. La concentración usada de bromuro de etidio fue de 0.4 mg/mL. Los geles se corrieron a 110 volts en cámaras de electroforesis horizontales con buffer TAE 1X. De esta manera fueron analizados tanto los ácidos desoxiribonucleicos obtenidos de las extracciones, como también sus digestiones.

### **IX.20.- Purificación de fragmentos de DNA contenidos en geles de agarosa.**

Existen varios métodos para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa inclusive existen los productos comerciales. El método que se empleó en este trabajo se denomina "Freeze-Squeeze", y se basa en el congelamiento de la agarosa que contiene al DNA, y centrifugación de la misma, a través de una malla de fibra de vidrio que atrapa a la agarosa. El protocolo se describe a continuación.

A un tubo eppendorf de 0.5 mL, al cual previamente se le hizo una perforación en el fondo utilizando una aguja insulfnica caliente, se le puso una pequeña cantidad de fibra de vidrio solo para cubrir el orificio. Se recortó el gel de agarosa, procurando exponer el gel a la luz ultravioleta el menor tiempo posible para no dañar al DNA, se colocó dentro del tubo previamente preparado y se sumergió en nitrógeno líquido durante 30 s. Posteriormente, el tubo se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL, al cual se le cortó la tapa. Inmediatamente se centrifugó durante 10 min a 7000 rpm. La solución contenida en el tubo de 1.5 mL (que fué filtrada a través de la fibra de vidrio) se trasladó a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo. Se extrajo una vez con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:2). El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf de 1.5 mL para precipitar el DNA con 3.5 volúmenes de una solución de etanol-acetato de amonio (7.5M, pH7) en una relación de 6:1 (para la recuperación de fragmentos pequeños de DNA se recomienda adicionar 1.5  $\mu$ L de RNAt concentrado a saturación). Se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos durante 20 min. Después se centrifugó por 20 min a 14000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y la pastilla se lavó tres veces cuidadosamente con 70% etanol, y se secó a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en el volumen deseado (10-30  $\mu$ L de agua).

### **IX.21.- Purificación de fragmentos de DNA inmersos en geles de poliacrilamida.**

Una vez detectada en la película de exposición la banda a cortar, la película se colocó sobre el gel (deshidratado y pegado al papel Whatman) guiándose con las marcas de tinta hechas sobre el papel

Whatman antes de exponer el gel. Se cortó la banda utilizando una navaja para bisturí (nueva), se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Después de 10 min, se incubó el tubo durante 15 min a 95°C y se centrifugó 2 min a 14,000 rpm. Se tomó el sobrenadante, y se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 10  $\mu$ L de 3 M acetato de sodio, pH 4.8; 5  $\mu$ L de glucógeno y 450  $\mu$ L de etanol absoluto. Se incubó el tubo 30 min a -70°C, se centrifugó 10 min a 4°C a 14,000 rpm. Se lavó la pastilla con 85% etanol, se secó y se resuspendió en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

#### IX.22.- Marcaje radioactivo de sondas de DNA.

Para el marcaje radioactivo de sondas de DNA se utilizó el kit de marcaje "random primer" (Amersham). Siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, los fragmentos a marcar fueron purificados como se describe en IX.2, y posteriormente se usaron como templado en la reacción de marcaje.

A 25 ng de DNA (templado) se le aforó con H<sub>2</sub>O a 24  $\mu$ L, se hirvió durante 3 min a 95°C, inmediatamente después se colocó en hielo. Estando en hielo, se le adicionó (en ese orden):

Primer	5 $\mu$ L
Buffer	5 $\mu$ L
dATP	4 $\mu$ L
dGTP	4 $\mu$ L
dTTP	4 $\mu$ L

Se sometió a centrifugación durante 10 seg. y se le adiciona:

dCTP- <sup>32</sup> P (10 $\mu$ Ci)	2 $\mu$ L
Enz. Klenow	2 $\mu$ L

La reacción se incubó durante 2 h a 37°C y se purificó por el método de columna de exclusión molecular. Se preparó una emulsión de sefarosa G-50 (10 g/160 mL) en buffer de TE solución TENSA (100 mM NaCl, 0.01 % SDS y 1 mM azida de sodio). Se empaquetó

aproximadamente 900  $\mu\text{L}$  de la emulsión en una jeringa insulfúrica. Se lavó con 300  $\mu\text{L}$  de solución TENSA. Posteriormente se pasó por la columna la sonda marcada (que está en un volumen de 300  $\mu\text{L}$ ), esperando hasta que caiga la última gota. La fracción se colectó en un tubo eppendorf y se verificó la radioactividad; en esta fracción no debe haber detección de radioactividad. El tubo donde originalmente se tenía la marca radioactiva se utilizó para recolectar la sonda marcada; esto se logró eluyendo dos veces con 300  $\mu\text{L}$  de solución TENSA. De esta manera, la sonda la tenemos en un volumen final de 600  $\mu\text{L}$ . Para medir el porcentaje de incorporación se tomaron muestras de 10  $\mu\text{L}$  de la solución de la sonda no purificada (300  $\mu\text{L}$ ) y 10  $\mu\text{L}$  de la solución final de la sonda marcada (600  $\mu\text{L}$ ), para medir las cuentas por minuto (cpm) (Sambrook, et al. 1989).

### IX.23.- Hibridación por Southern blot.

El análisis por hibridación de ácidos nucleicos nos permite localizar regiones que comparten cierta homología en su secuencia de nucleótidos. Normalmente el DNA es digerido con una o más enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados por tamaño por medio de electroforesis a través de un gel de agarosa. Posteriormente, el DNA es desnaturalizado *in situ*, y transferido desde el gel a un soporte sólido (generalmente un filtro de nitrocelulosa o membrana de nylon). Las posiciones de los fragmentos de DNA son conservadas durante su transferencia al filtro. El DNA "anclado" al filtro es hibridado con DNA o RNA marcado radioactivamente. A continuación se usan técnicas de autoradiografía para localizar las posiciones de las bandas complementarias a la sonda. En este trabajo se realizaron diferentes experimentos de hibridación tipo Southern. El protocolo empleado fue básicamente el mismo, variando un poco en las condiciones de lavado. Los detalles de cada hibridación se describen en los pies de figura de cada experimento. El protocolo usado fue el siguiente:

Se corrió un gel de agarosa con las muestras de DNA a analizar, con la misma técnica descrita anteriormente para electroforesis en geles de agarosa (IX.20). Por otro lado, un recipiente o charola de cristal se llenó con buffer SSC 20X (para 1 litro: 175.3 g de NaCl, 88.2 g de citrato

de sodio, ajustar el pH a 7), se construyó una plataforma con un cristal apropiado y se colocaron sobre éste 3 pedazos de papel filtro Whatman 3MM (de un tamaño semejante al del gel) saturados con SSC 20X, sobre los cuales se depositó el gel. Este se cubrió con un pedazo de membrana Hybond-N+ (Amersham) con el tamaño exacto del gel. Sobre la membrana se colocaron otros tres pedazos de papel filtro del mismo tamaño mojados con SSC 20X, y encima de estos se puso una "torre" de papel absorbente (aproximadamente de 5 cm), la cual fué cubierta con un cristal de tamaño adecuado y se colocó sobre éste un objeto con un peso de 0.75-1 Kg. El aparato de transferencia se desmontó después de transcurridas 8 h. Antes de retirar el gel, se marcó la membrana con un lápiz para la posterior ubicación exacta del mismo. La membrana se colocó dentro de una charola con 0.4 M NaOH hasta cubrirla perfectamente y se dejó ahí por 20 min. Se enjuagaron las membranas suavemente con agitación moderada (máximo 1 min) en una solución de SSC 5X. A un tubo de hibridación de un tamaño adecuado, se le añadieron 5 mL de solución de prehibridación de fosfatos con 40% formamida (40% formamida (SIGMA), 7% SDS, 2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2, 10 mM EDTA) y se introdujeron las membranas a hibridar para ser incubadas por 1 h en un baño de agitación a 42°C, después de lo cual fueron añadidas las sondas radioactivas a examinar. Se hibridó al menos durante 12 h a 42°C. Posterior a la hibridación, se lavaron los filtros dos veces en SSC 4X/ 0.1% (p/v) SDS a temperatura ambiente durante 10 min. Se volvieron a lavar las membranas con SSC 4X/ 0.1% (p/v) SDS, se incubaron a 55°C durante 15 min. Dependiendo de cada Southern, los lavados se realizaron a diferentes condiciones astringentes. Después de los lavados la membrana se expuso a película Kodak para la autoradiografía.

#### **IX.24.- RT-PCR -"differential display".**

El RT-PCR se basa en el acoplamiento de las técnicas de transcriptasa reversa y la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La transcriptasa reversa permite que a partir de RNA, se pueda generar específicamente algún cDNA (si se usan oligonucleótidos adecuados) y mediante el PCR, éste puede ser amplificado hasta tener cantidades considerables de la secuencia en cuestión. La técnica del "differential



display" agrupa estos dos principios y además permite el manejo de diferentes oligonucleótidos para definir la presencia de diferentes secuencias en muestras diferentes. La técnica que se empleó en este trabajo, consta de una parte de cada uno de estos tres métodos, ya que a partir de RNAm de nódulo de 21 días se generó el cDNA, para posteriormente utilizarlo como templado, con diferentes oligonucleótidos poli T(NN) del kit de "differential display" y un oligonucleótido específico complementario a la secuencia del dominio SH3 de Src.

La reacción de transcriptasa reversa se realizó con el kit de (GIBCO BRL) de la siguiente manera:

H <sub>2</sub> O	11.4 µL
Buffer 5X	4 µL
dNTP's (250uM)	1.6 µL
RNAm	1 µL
Oligo dT (50 ng/ul)	1 µL
Enzima	1 µL

Antes de adicionar la enzima transcriptasa reversa, la reacción se calentó a 65°C por 3 min, se colocó en hielo por 10 s y después se le adicionó la enzima. Se incubó durante 1 h a 37°C y se inactivó calentándola a 95°C por 5 min. El oligo dT que se empleó en esta reacción es una mezcla de oligonucleótidos poli T de 12 a 18 bases, y genera cDNA's de cualquier RNAm que contenga poli A.

Para la amplificación específica con el iniciador SH3-1, primero se marcó éste con <sup>32</sup>P, mediante una reacción de fosforilación con la enzima "polynucleotide kinase (PNK)", que se describe a continuación:

H <sub>2</sub> O	15.5 µL
Buffer PNK 10X	2 µL
SH3-1	20 pmol
Gamma-ATP (10 µCi)	20 pmol
T4 Kinasa	0.5 µL (10 unidades)

La reacción se incubó a 37°C durante 1 h, y se inactivó a 95°C por 3 min.

Una vez fosforilado el iniciador SH3-1, se procedió a realizar la reacción de amplificado. Para esto, se probaron varios de los iniciadores Poli T del kit de "differential display", en los cuales, sus dos últimas bases (del extremo 3') son diferentes nucleótidos a TT. La reacción se describe a continuación:

H <sub>2</sub> O	12.2 μL
Buffer 10X	2 μL
dNTP's (25 μM)	1.6 μL
SH3-1* (2 μM)	1 μL
Poly T NN (12.5 μM)	1 μL
cDNA (del RT)	2 μL
Taq DNapol.	0.2 μL (1 unidad)

\*Oligo fosforilado.

Las condiciones de amplificado fueron 95°C 30 s, 40°C 1.30 min, 72°C 30 s durante 40 ciclos. Los productos de amplificación fueron analizados en geles de poliacrilamida al 8% (tamaño secuencia).

El gel de secuencia fue preparado como se indica a continuación:

Para 70 ml de gel al 8%:

Urea	29.4 g
TBE* 0.5X	14 mL
Acrilamida-Bis acrilamida (38:2)	14 mL
H <sub>2</sub> O	21 mL
TEMED	56 μL
Persulfato de amonio 25%	196 μL

\*TBE 10X (para 500 mL de buffe: 54 gr Tris base, 27.5 g ácido bórico, 20 mL 0.5 M EDTA, pH 8).

La electroforesis se llevó a cabo a 40W, 25 mA, 1800V utilizando buffer TBE 1X. Una vez hecha la electroforesis, el gel se secó y se expuso para autoradiografía.

### IX.25.- Secuenciación nucleotídica por PCR.

La secuenciación nucleotídica por PCR se basa en el mismo principio del método establecido por Sanger, solo que a diferencia de otros protocolos, la secuenciación por PCR permite realizar la secuencia de un DNA que se encuentre a bajas concentraciones, ya que amplifica la señal de cada banda. En la reacción de secuencia por PCR se usan los mismos iniciadores que son utilizados en los PCR's, solo que tienen que ser marcados radioactivamente (fosforilados). El protocolo de las reacciones de secuencia realizadas en este trabajo, se describe a continuación:

La fosforilación de los iniciadores se hizo de la misma forma descrita en IX.25. Por otro lado, siguiendo el protocolo del kit de secuenciación (Amersham), las reacciones se hicieron en tubos eppendorf de 0.5 mL, con las siguientes concentraciones:

DNA templado	12.5 $\mu$ L
Buffer de reacción	2 $\mu$ L
Iniciador fosforilado	1 $\mu$ L (0.5 pmol)
DNA pol. termo-secuencasa	2 $\mu$ L

Se marcaron 4 tubos eppendorf de 0.5 mL, con las letras G,A,T y C, y se les adicionó 4  $\mu$ L de cada dideoxinucleótido (ddNTP) según correspondiera a la letra. Posteriormente, se adicionaron 4  $\mu$ L de la reacción a los tubos con los ddNTP y 10  $\mu$ L de aceite mineral. Los tubos fueron colocados en el Termociclador (Perkin-Elmer) y se aplicó el programa de amplificado con las siguientes condiciones: 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min, durante 40 ciclos.

Una vez concluidos los 40 ciclos, se adicionaron a cada reacción 4  $\mu$ L de la solución de paro para detener la reacción. El análisis de las muestras se realizó en geles de secuencia al 8%, las muestras fueron calentadas a 70°C, durante 3 min antes de cargar 3.5  $\mu$ L de cada

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

reacción en el gel de secuencia. La electroforesis se llevó a cabo a 40W, 25 mA, 1800 V, utilizando buffer TBE 1X. La manera en que se preparó el gel se describe en IX.25.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## X. BIBLIOGRAFIA.

- Abrams, Ch. S; Zhao, W. (1995). SH3 domains specifically regulate kinase activity of expressed Src family proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270, No. 1. 333-339.
- Adams, A.E.M; Botstein, D; Drubin, D.G. (1989). A Yeast Actin-binding protein is encoded by *SAC6*, a gene found by suppression of an Actin mutation. *Science*. Vol. 243. 231-233.
- Ahn, A.H; Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet*. Vol. 3 No. 4. pp. 238-291.
- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition. 1989. Garland Publishing, Inc. New York.
- Amano, M; Chihara, K; Kimura, K; Fukata, Y; Nakamura, N; Matsuura, Y; Kaibuchi, K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-Kinase. *Science*. Vol. 275. 1308-1311.
- Amrein, K. E; Panholzer, B; Flint, N. A; Bannwarth, W; Burn, P. (1993). The Src homology 2 domain of the protein-tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> mediates both intermolecular and intramolecular interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, pp.10258-10289.
- Ardourel, M; Demont, N; Debelle, F; Maillat, F; de Billy, F; Promé, J-C; Dénarié, J; Truchet, G. (1994). *Rhizobium mellioli* lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *The Plant Cell*. Vol. 6. pp. 1357-1374.
- Ausubel, F, M; Brent, R; Kingston, R.E; Moore, D.E; Seidman, J.G; Smith, J.A; Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 1996.
- Barfod, E. T; Zheng, Y; Kuang, W; Hart, M.J; Evans, T; Cerlone, R.A; Ashkenazi, A. (1993). Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268, No. 35. 26059-26062.
- Barnes, G; Drubin, D.G; Stream, T. The cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell. Biol*. Vol 2. No. 1. pp. 109-115.
- Bar-Sagi, D; Rotin, D; Batzer, A; Mandiyan, V; Schlessinger, J. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell*. Vol. 74. 83-91.
- Becraft, P.W; Stinard, P.S., McCarty, D.R. (1996). CRINKLY4: A TNFR-Like Receptor Kinase Involved in Maize Epidermal Differentiation. *Science*. vol. 273. 1406-1409.
- Bender, L; Lo, H. S; Lee, H; Kokojan, V; Peterson, J; Bender, A. (1996). Associations among PH and SH3 domain-containing proteins and Rho-type GTPases in Yeast. *The Rockefeller University Press*. Vol. 133. No. 4. 879-894.
- Bich-Nga, D. V; Brubin, D.G. (1994). A yeast TCP-1-like protein is required for actin function *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91. pp. 9116-9120.

- Bolwell, G. P.** (1995). Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. Elsevier Science. Vol. 968. No. 4. 492-495.
- Bork, P; Sudol, M.** (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin?. TIBS. 19 December. pp 531-533.
- Bowler, C; Chua, N.** (1994). Emerging Themes of plant signal transduction. The Plant Cell. Vol. 6, pp. 1529-1541.
- Bowler, C; Neuhaus, G; Yamagata, H; Chua, N.** (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. Cell. Vol. 77. pp. 73-81.
- Burkhardt, A. L; Bolen, J. B; Kieff, E; Longnecker, R.** (1992). An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with *src* family Tyrosine Kinases. Journal of Virology. Vol. 66. No. 8. 5161-5167.
- Bush, D.S.** (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. Plant Physiol. Vol. 103. 7-13.
- Caplan, S; Zeligler, Shlomit; Wang, L; Baniyash M.** (1995). Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor  $\xi$  chain is associated with the cytoskeleton. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 92. 4768-4772.
- Carlson, R.W; Price, N. P.J; Stacey, G.** (1994). The biosynthesis of Rhizobial Lipo-Oligosaccharide nodulation signal molecules. MPMI. Vol. 7, No. 6. 684-695.
- Chang, C; Kwok, S.F; Bleecker, A. B; Meyerowitz, E.M.** (1993). *Arabidopsis* Ethylene-Response Gene ETR1: Simitary of Product to Two-Component Regulators. Science. Vol. 262. 539-544.
- Chen, J.K; Lane, W.S; Brauer, A.W; Tanaka, A; Schreiber, S. L.** (1993). Biased combinatorial libraries: Novel ligands for the SH3 Domain of Phosphatidylinositol 3-Kinase. J. Am. Chem. Soc. Vol. 115. 1291-1292.
- Chen, H. I; Sudol, M.** (1995). The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. pp 7819-7823.
- Chenevert, J; Corrado, K; Bender, A; Pringle, J; Herskowitz, I.** (1992). A yeast gene (*BEM1*) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. Nature. Vol. 356. 77-79.
- Chowdhury, S; Smith, K. W, Gustin, M. C.** (1992). Osmotic stress and the Yeast cytoskeleton: Phenotype-specific suppression of an Actin mutation. The Rockefeller University Press. Vol. 118., No. 3. 561-571.
- Cicchetti, P; Mayer, B.J; Thiel, G; Baltimore, D.** (1992). Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. Science. Vol. 257. 803-806.
- Clore, A. M; Dannenhoffer, J. M; Larkins, B.A.** (1996). EF-1 $\alpha$  is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells. The Plant Cell. Vol. 8, pp. 2003-2014.
- Cohen, G. B; Ren, R; Baltimore, D.** (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. Cell. Vol. 80, pp. 237-248.
- Cook, D; Dreyer, D; Bonnet, D; Howell, M; Nony, E VandenBosch, K.** (1995). Transient induction of a Peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. The Plant Cell. Vol. 7. 43-55.
- Cooper, J.B; Long, S.R.** (1994). Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by *trans-*

- Zenin secretion. *The Plant Cell*. Vol. 6. 215-225.
- De Mendez, I; Adams, A. G; Sokolic, R. A; Malech, H. L. Leto T. L. (1996). Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in whole cells. *The EMBO Journal*. Vol. 15, No. 6. 1211-1220.
- Den Hartigh, J.C; Van Bergen en Henegouwen, P.M.P; Verkleij, A. J; Boonstra, J. (1992). The EGF receptor is an Actin-binding Protein. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 119, No. 2. 349-355.
- Dickstein, R; Prusty, R; Peng, T; Ngo, W; Smith, M.E. (1993). ENOD8, a novel early nodule-specific gene, is expressed in empty alfalfa nodules. *Molecular Plant Microbe Interactions*. Vol. 6, No. 6. 715-721.
- Downing, A.K; Driscoll, P.C; Gout, I; Sallm, K; Zvelebil, M.J; Waterfield, M.D. (1994). Three-dimensional solution structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Current Biology*. Vol. 4 No. 10. pp. 884-891.
- Drubin, D.G. (1991). Development of cell polarity in budding Yeast. *Cell*. Vol. 65. 1093-1096.
- Drubin, D.G; Mulholland, J; Zhu, Z; Botstein D. (1990). Homology of a Yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature*. Vol. 343. 288-290.
- Ehrhardt, D.W; Atkinson, M.E; Long, S.R. (1992). Depolarization of Alfalfa Root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* nod factors. *Science*. Vol. 256. 998-1000.
- Ehrhardt, D.W; Wais, R; Long, S.R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*. Vol. 85. 673-681.
- Felder, S; Zhou, M; Hu, P; Urena, J; Ulrich, A; Chaudhuri, M; White, M; Shoelson, SE; Schlessinger, J. (1993). SH2 domains exhibit high-affinity binding to tyrosine-phosphorylated peptides yet also exhibit rapid dissociation and exchange. *Mol. Cell. Biol*. Vol. 13. No. 3 pp. 1449-1455.
- Feng, S; Chen, J.K; Yu, H; Simon, J. A; Schreiber, S. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: Development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. Vol. 266. pp. 1241-1247.
- Ferguson, K.M; Lemmon, M.A; Schlessinger, J; Sigler, P.B. (1994). Crystal structure at 2.2A resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell*. Vol. 79, pp 199-209.
- Finan, P; Shimizu, Y; Gout, I; Hsuan, J; Truong, O; Butcher, Ch; Bennett, P; Waterfield, M.D; Kellie, S. (1994). An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269. No. 19. pp. 13752-13755.
- Fisher, R.F; Long, S.R. (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. Vol. 357. 655-660.
- Foster, D.A; Shibuya, M; Hanafusa, H. (1985). Activation of the transformation potential of the cellular *fps* gene. *Cell*. Vol. 42. 105-115.
- Freeman, N.L; Lila, T; Mintzer, K. A; Chen, Z; Pahnk, A.J; Ren, R; Drubin, D.G; Field, J. (1996). A conserved Proline-Rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 16.

No. 2. 548-556.

- Furuka, M.** (1993). Phytochromes: Their molecular species, gene families, and functions. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* Vol. 44: 617-645.
- Geurts, R; Frassen, H.** (1996). Signal transduction in *Rhizobium*-Induced nodule formation. *Plant. Physiol.* 112: 447-453.
- Goethals, K; Van Montagu, M; Holsters, M.** (1992). Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 89. 1646-1650.
- Goddard, R.H; Wick, S.M; Silflow, C.D; Snustad, P.D.** (1994). Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. *Plant Physiol.* Vol. 104 : 1-6.
- Goodson, H.V; Anderson, B.L; Warrick, H. M; Pon, L.A Spudich, J. A.** (1996). Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): Myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology.* Vol. 133, No. 6. pp. 1277-1291.
- Gout, I; Dhand, R; Hiles, I. D; Fry, M. J; Panayotou, G; Das, P; Truong, O; Totty, N. T; Hsuan, J; Booker, G. W; Campbell, I. D; Waterfield, M. D.** (1993). The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell.* Vol. 75. pp. 25-36.
- Goudreau, N; Cornille, F; Duchesne, M; Parker, F; Tocqué, B; Garbay, C; Roques, B.P.** (1994). NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos. *Structural Biology.* Vol. 1 No. 12. pp. 898-907.
- Grabski, S; Guang, X.X; Holland, J. F; Schindler, M.** (1994). Lipids trigger changes in the elasticity of the cytoskeleton in plant cells: A cell optical displacement assay for live cell measurements. *The Journal of Cell Biology.* Vol. 126, No. 3. 713-726.
- Haffner, C; Jarchau, T; Reinhard, M; Hoppe, J; Lohmann, Z. M; Walter, U.** (1995). Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *The EMBO Journal.* Vol. 14, No. 1. 19-27.
- Harlan, J.E; Hajduk, P.J; Yoon, H. S; Fesik, S.W.** (1994). Pleckstrin homology domains bind to p hosp hatidylinositol-4,5- biphosphate. *Nature.* Vol. 371. pp 168-170.
- Haslam, R.J; Koide, H.B; Hemmings, B.A.** (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature.* Vol. 363. 309-310.
- Heidstra, R; Geurts, R; Frassen, H; Spaik, H. P; Ab van, K; Bisseling, T.** (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* Vol. 105. pp. 787-797.
- Hirai, H; y Varmus, H.E.** (1990). Mutations in *src* homology regions 2 and 3 of activated chicken c-src that results in preferential transformation of mouse or chicken cells. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA.* Vol. 87. pp. 8592-8596.
- Hirayama, T; Ohto, C; Mizoguchi, T; Shinozaki, K.** (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 92. 3903-3907.
- Hirsch, A.M; Bhuvanewari, T.V;**



- Torrey, J.G; Bisseling, T.** (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 86. 1244-1248.
- Hoffmann, K; Philipp, B.** (1995). The *rsp5*-domain is shared by proteins of diverse functions. *FEBS Letters*. Vol. 358. pp. 153-157.
- Holmes, T.C; Fadool, D.A; Ren, R; Levitan, I.B.** (1996). Association of Src Tyrosine Kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science*. Vol. 274. 2089-2091.
- Holtzman, D. A; Yang, S; Drubin, D.G.** (1993). Synthetic-lethal interactions identify Two Novel Genes, *SLA1* and *SLA2*, that Control Membrane Cytoskeleton Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 122. 635-644.
- Hong, Z; Verma, D.P.S.** (1994). A phosphatidylinositol 3-Kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 91, pp. 9617-9621.
- Irvine, R.F; Letcher, A.J; Lander, D.J; Drobak, B.K; Pawson, A.P; Musgrave, A.** (1989). Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate and phosphatidylinositol (4) phosphate in plant tissues. *Plant Physiol*. Vol. 89. pp. 888-892.
- Jackson, P; y Baltimore, D.** (1989). N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of *c-abl*. *The EMBO Journal*. Vol. 8 No. 2. pp. 449-456.
- Kakimoto, T.** (1996). CKII, a histidine kinase homologue implicated in cytokinin signal transduction. *Science*. Vol. 274. pp. 982-985.
- Kapeller, R; Prasad, K.V.S.; Janssen, O; Hou, W; Schaffhausen, B.S.; Rudd, C. E.; Cantley L.C.** (1994). Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269. No. 3 pp. 1927-1933.
- Kavanaugh, M.W; Williams, L.T.** (1994). An alternative to SH2 Domains for binding Tyrosine-Phosphorylated Proteins. *Science*. Vol. 266. 1862-1865.
- Kleber, J.J; Rothenberg, M; Roman, G; Feldmann, K. A; Ecker, J. R.** (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*. Vol. 72. pp. 427-441.
- Kim, S. R; Kim, Y; An, G.** (1993). Molecular cloning and characterization of anther-preferential cDNA encoding a putative actin-depolymerizing factor. *Plant Molecular Biology*. Vol. 21. pp. 36-45.
- Knudsen, B.S; Feller, S.M; Hanafusa, H.** (1994). Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 region of Crk. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269. pp. 32781-32787.
- Koch, A.C; Anderson, D; Moran, M. F; Ellis, C; Pawson, T.** (1991). SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*. Vol. 254. 668-674.
- Kohda, D; Hatanaka, H; Odaka, M; Mandiyan, V; Ulrich, A; Schlessinger, J; Inagaki, F.** (1993). Solution structure of the SH3 domain of phospholipase C- $\gamma$ . *Cell*. Vol. 72. 953-960.
- Kouchi, H; Hata, S.** (1993). Isolation and characterization of novel nodulin

- cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen Genet.* Vol. 238. 106-119.
- Koyama, S; Yu, H; Dalgarno, D. C; Shin, T.B; Zydowsky, L.D; Scheiber, S. L.** (1993). Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell*, Vol. 72. 945-952.
- Leung, J; Bouvier-Durand, M; Morris, PC; Guerrier, D; Chedior, F; Giraudat, J.** (1994). *Arabidopsis* ABA response gene AB11: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*. Vol. 264. pp. 1448-1452.
- Lim, W.A; Richards, F.M.; Fox, R.O.** (1994). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*. Vol. 372. 375-379.
- Liu, X; Marengere, L.E.M; Koch, A; Pawson, T.** (1993). The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Molecular and Cell Biology*. Vol. 13, No. 9. 5225-5232.
- López-Lara, I. M; Van Der Drift, K.M.G.M; Van Brussel, A.A.N; Haverkamp, J; Lugtenberg, B.J.J; Thomas-Oates, J.E; Spaink, H.P.** (1995). Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Molecular Biology*. Vol. 29:465-477.
- Ma, H.** (1994). GTP-binding proteins in plants: new members of an old family. *Plant Molecular Biology*. Vol. 26. 1611-1636.
- Ma, H; Yanofsky, M.F; Meyerowitz, E.M.** (1990). Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein  $\alpha$  subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad.* Vol. 87. 3821-3825.
- Macias, M.J; Musacchio, A; Ponstingl, H; Nilges, M; Saraste, M; Oschkinat, H.** (1994). Structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. *Nature*. Vol. 369. pp. 675-677.
- Marx, J.** (1996). Plants, like animals, may make use of peptide signals. *Science*. Vol. 273. 1338-1339.
- Matsui, Y; Matsui, R; Akada, R; Toh-e, A.** (1996). Yeast *src* Homology Region 3 Domain-binding Proteins Involved in Bud Formation. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 133, No. 4. pp 865-878.
- Mayer, B.J; Jackson, P.K; Baltimore, D** (1991). The noncatalytic *src* homology region 2 segment of *abl* tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88. pp 627-631.
- Mayer, B.J; Baltimore, D.** (1993). Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends in Cell Biology*. Vol. 3. pp. 8-13.
- Mayer, B.J; Ren, R; Clark, K.L; Baltimore, D.** (1993). A putative modular domain preset in diverse signaling proteins. *Cell*. Vol. 73. 629-630.
- Meyer, K; Leube, M.P; Grill, E.** (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. Vol. 264. 1452-1455.
- McCurdy, D.D; Williamson, R.E.** Actin and actin-associated proteins. The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Editor: Lloyd, Clyde W. 1991. Academic Press. San Diego.
- McGlade, J; Brunkhorst, B; Anderson, D; Mbamalu, G; Settleman, J; Dedhar, S; Rozakis-Adcock, M; Chen, L; Pawson, T.**

- (1993). The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *The EMBO Journal*. Vol. 12. No. 8. pp. 3073-3081.
- Millar, A.J; McGrath, R.B; Chua, N.** (1994). Phytochrome phototransduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* Vol. 28: 325-349.
- Moon, A.L; Janney, P.A; Louie, A; Drubin D.G.** (1993). Cofilin is an essential component of the Yeast cortical cytoskeleton. *The Rockefeller University Press*. Vol. 120, No. 2. 421-435.
- Morton, C.J; Campbell I.D.**(1994). Molecular "velcro". *Current Biology*. Vol. 4, No. 7. pp. 615-617.
- Mu, J.H., Lee, H.S; Kao, T.H.**(1994). Characterization of pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell* 6 : 709-721.
- Musacchio, A; Gibson, T; Rice, P; Thompson, J; Saraste, M.**(1993). The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *TIBS*. Vol. 18. 343-348.
- Musacchio, A; Saraste, M; Wilmanns M.** (1994). High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat. Struct. Biol.* Vol. 1 No. 8 pp. 546-551.
- Mylona, P; Pawlowski, K; Bisseling, T.** (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*. Vol. 7. 869-885.
- Nap, J; Bisseling, T.** (1990). Developmental biology of a Plant-Prokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science*. Vol. 250. 948-954.
- Neuhaus, G; Bowler, C; Kern, R; Chua, N.** (1993). Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell*. Vol. 73. pp. 937-952.
- Ng, R; Abelson, J.** (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 77, No.7, pp. 3912-3916.
- Novick, P; Botstein, D.** (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive Yeast actin mutants. *Cell*. Vol. 40. 405-416.
- Oliver, J.P; Raabe, T; Henkemeyer, M; Dickson, B; Mbamalu, G; Margolis, B; Schlessinger, J; Hafen, E; Pawson, T.** (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptador protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange. *Sos. Cell*. Vol. 73. pp 179-191.
- Panayotou, G; Gish, G; End, E; Truong, O; Gout, I. Dhand, R; Fry, M.J; Hiles, I; Pawson, T; Waterfield, M.D.** (1993). Interactions between SH2 domains and tyrosine-phosphorylated platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor sequences: Analysis of kinetic parameters by a novel biosensor-based approach. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 13 No. 6. pp. 3567-3576.
- Pascal, S. M; Singer, A. U; Gish, G; Yamazaki, T; Shoelson, S. E; Pawson, T; Kay, L. E; Forman-Kay, J. D.** (1994). Nuclear magnetic resonance structure of an SH2 domain of phospholipase C- $\gamma$ 1 complexed with a high affinity binding peptide. *Cell*. Vol. 77. pp. 461-472.
- Pawson, T.** (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*. Vol. 373. 573-580.
- Pellicci, G; Lanfrancone, L; Grignani, F; McGlade, J; Cavallo, F;**

- Forni, G; Nicoletti, L; Griganani, F; Pawson, T; Pellici, Pier, G.** (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*. Vol. 70. 93-104.
- Peterson, J; Zheng, Y; Bender, L; Myers, A; Cerlone, R; Bender, A.** (1994). Interactions between the bud emergence proteins Bem1 and Bem2 and Rho-type GTPases in yeast. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 127. No. 5. pp. 1395-1406.
- Pooviah, B.W; Reddy, A.S.N.** (1993). Calcium and signal transduction in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol. 12. No. 3. 185-211.
- Price, N.P.J; Relic, B; Talmont, F; Lewin, A; Promé, D; Pueppke, S.G; Maillet, F; Dénarié, J; Promé, J.-C; Broughton, W.J.** (1992). Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. *Molecular Microbiology*. Vol. 6, No. 23. 3575-3584.
- Ren, R; Mayer, B.J; Cicchetti, P; Baltimore, D.** (1993). Identification of a Ten-Amino Acid Proline-Rich SH3 binding site. *Science*. Vol. 259. 1157-1161.
- Rickles, R.J; Botfield, M.C; Weng, Z; Taylor, J.A; Green, O.M; Brugge, J.S; Zoller M.J.** (1994). Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *The EMBO Journal*. Vol. 13, No. 23. 5598-5604.
- Rotin, D; Bar-Sagi, D; O'Brodivich, H; Merilainen, J; Lehto, V.P; Canessa, C.M; Rossier, B.C; Downey, G.P.** (1994). An SH3 binding region in the epithelial Na<sup>+</sup> channel ( $\alpha$ ENaC) mediates its localization at the apical membrane. *The EMBO Journal*. Vol. 13. No. 19. 4440-4450.
- Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T.** *Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Scheres, B; Van De Wiel, C; Zalensky, A; Horvath, B; Spaink, H; Van Eck, H; Zwartkruis, F; Wolters, A; Gloude-mans, T; Van Kammen, A; Bisseling T.** (1990). The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the Pea-Rhizobium interaction. *Cell*. Vol. 60. 281-294.
- Scheres, B; Van Engelen, F; Van Der Knaap, E; Van De Weil, C; Van Kammen, A; Bisseling, T.** (1990). Sequential induction of Nodulin gene expression in the developing Pea Nodule. *The Plant Cell*. Vol. 2. 687-700.
- Schlessinger, J.** (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Current Opinion in Genetics and Development*. Vol. 4. 25-30.
- Seedorf, K; Kostka, G; Lammers, R; Bashkin, P; Daly, R; Burgess, W.H; Van der Blik, A. M; Schlessinger, J; Ullrich, A.** (1994). Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C and GRB-2. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269, No. 23. 16009-16014.
- Sheen, J.** (1996). Ca<sup>2+</sup>-dependent protein Kinases and stress signal transduction in plants. *Science*. Vol. 274. 1900-1905.
- Shepherd, J.C.W.** (1981). Method to determine the reading frame of a protein from the purine/pyrimidine genome sequence and its possible evolutionary justification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 1596-1600.
- Shi, J; Gonzales, R. A; Bhattacharyya, M. K.** (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *The Plant*

Journal. Vol. 8, No. 3. 381-390.

- Shibaoka, H; Nagai, R.** (1994). The plant cytoskeleton. *Current Opinion In Cell Biology*. 6 :10-15.
- Smit, L; Van Der Horst, G; Borst, J.** (1996). Sos, Vav, and C3G participate in B Cell receptor-induced signaling pathways and differentially associate with Shc-Grb2, Crk, and Crk-L adaptors. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 15. 8564-8569.
- Spaink, H.P; Sheeley, D.M; Van Brussel, A.A.N; Glushka, J; York, W. S; Tak, T; Geiger, O; Kennedy, E.P; Reinhold, V.N; Lugtenberg, B.J.J.** (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*. Vol. 354. 125-130.
- (a) Sparks, A.B; Rider J.E; Hoffman, N.G; Fowlkes, D.M; Quilliam, L.A; Kay, B.K.** (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLC $\gamma$ , Crk, and Grb2. *Proc. Natl. Acad.* Vol. 93. 1540-1544.
- (b) Sparks, A.B; Hoffman, N.G, McConnell, S.J; Fowlkes, D.M, Kay, B.K.** (1996). Cloning of ligand targets: Systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nature Biotechnology*. Vol. 14. pp. 741-744.
- Staub, O; Dho, S; Henry, P; Correa, J; Ishikawa, T; McGlade, J; Rotin, D.** (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *The EMBO Journal*. Vol. 15. No. 10. pp. 2371-2380.
- Stöffler, H; Ruppert, C; Reinhard, J; Bälher, M.** (1995). A novel mammalian myosin I from rat with an SH3 domain localizes to Con A-inducible, F-Actin-rich structures at Cell-Cell contacts. *The Rockefeller University Journal*. Vol. 129, No. 3. 819-830.
- Stokkermans, T.J.W; Peters, K.N.** (1994). *Bradyrhizobium elkanii* lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta*. Vol. 193:413-420.
- Sudol, M.** (1994). Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the YES proto-oncogene product. *Oncogene*. Vol. 9. No. 8. pp. 2145-2152.
- Takai, Y; Sasaki, T; Tanaka, K; Nakasishi, H.** (1995). Rho as regulator of the cytoskeleton. *TIBS* 20 June. 227-231.
- Tan, Z; Boss, W.F.** (1992). Association of phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol monophosphate kinase, and diacylglycerol kinase with the cytoskeleton and F-actin fractions of carrot (*Daucus carota* L) cells grown in suspension culture. *Plant Physiol.* Vol. 100. pp. 2116-2120.
- Teresawa, H; Kohda, D; Hatanaka, H; Tsuchiya, S; Ogura, K; Ishii, S; Mandiyan, V; Ulrich, A; Schlessinger, J; Inagaki, F.** (1994). Structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 complexed with a peptide from the guanine nucleotide releasing factor Sos. *Structural Biology*. Vol 1 No. 12. pp 891-897.
- Terryn, N; Van Montagu, M; Inzé D.** (1993). GTP-binding proteins in plants. *Plant Molecular Biology*. Vol. 22. 143-152.
- Touhara, K; Inglese, J; Pitcher, J. A; Shaw, G; Lefkowitz, R. J.** (1994). Binding of G protein  $\beta$ -subunits to pleckstrin homology domains. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269. No. 14. pp.10217-10220.

- Truchet, G; Roche, P; Lerouge, P; Vasse, J; Camut, S; De Billy, F; Promé, J; Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*. Vol. 351. 670-673.
- Turner, C.E; Miller, J.T. (1994). Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: Identification of a vinculin and pp125Fak binding region. *Journal of Cell Science*. 107: 1583-1591.
- Van Brussel, A.A.N; Bakhuizen, R; Van Spronsen, P.C; Spaik, H.P; Tak, T; Lugtenberg, B.J.J; Kijne, J. W. (1992). Induction of Pre-Infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*. 257: 102
- Vasse, J; De Billy, F; Camut, S; Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of Bacteroids and Nitrogen Fixation in Alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172, No. 8. 4295-4306.
- Verma, D.P.S; Hu, C.A; Zhang, M. (1992). Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiologia Plantarum*. Vol. 85: 253-265.
- Vidali, L; Perez, H.E; Valdez, L, V; Noguez, R; Zamudio, F; Sanchez, F. (1995). Purification, Characterization, and cDNA Cloning of Profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*. Vol. 108. 115-123.
- Vijn, I; Des Neves, L; Van Kammen, A; Franssen, H; Bisseling, T. (1993). Nod factors and nodulation in plants. *Science*. Vol. 260. 1764-1765.
- Walker, J.C. (1993). Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 3 : 451-6.
- Walker, J.C. (1994). Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol*. 26: 1599-1609.
- Weng, Z; Taylor, J. A; Turner, C.E; Brugge, J.S; Seidel-Dugan, C. (1993). Detection of Src homology 3-Binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268, No. 20. pp. 14956-14963.
- Wilson, RC; Long, F; Maruoka, E.M; Cooper, J.B. (1994). A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* in highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell*. Vol. 6 No. 9. pp. 1265-1275.
- Wittekind, M; Mapelli, C; Farmer II, B. T; Suen, K; Goldfarb, V; Tsao, J; Lavole, T; Barbaacid, M; Meyers, C. A; Mueller, L. (1994). Orientation of Peptide fragments from Sos proteins bound to the N-Terminal SH3 domain of Grb2 determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry*. Vol. 33. 13531-13539.
- Yanagihara, C; Shinkai, M; Kariya, K; Yamawaki-Kataoka, Y; Hu, C.D; Masuda, T; Kataoka, T. (1997). Association of elongation factor 1 alpha and ribosomal protein L3 with the proline-rich region of yeast adenyl cyclase-associated protein CAP. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 17, 232(2): 503-507.
- Yang, W; Burkhardt, W; Cavallius, J; Merrick, W. C; Boss, W. F. (1993). Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-Kinase activator in Carrot cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268. No. 1 pp. 392-398.
- Yang, W; de Blank, C; Meskifene, I;

Hirt, H; Bakker, J; Kammen, A;  
Frassen, H; Bisseling, T. (1994).  
*Rhizobium* Nod factors reactivate the cell  
cycle during infection and nodule  
primordium formation, but the cycle is  
only completed in primordium  
formation. The Plant Cell. Vol. 6. pp.  
1415-1426.

-Yoon, H; Hajduk, P.J; Petros, A.M;  
Olejniczak, E.T; Meadows, R.P;  
Fesik, S.W. (1994). Solution of a  
pleckstrin-homology domain. Nature.  
Vol. 369. pp. 672-675.

-Yu, H; Chen, J.K.; Feng, S;  
Dalgarno, D.C.; Brauer, A.W;  
Scheiber, S.L. (1994). Structural basis  
for the binding of proline-rich peptides  
to SH3 domains. Cell. Vol. 76. pp. 933-945.

-Yuko, L; Kawakami T. (1994). The  
pleckstrin homology domain of Bruton  
tyrosine kinase interacts with protein  
kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vo.  
91. pp. 9175-9179.