



UADY
FACULTAD DE
QUÍMICA

**EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO
RECOMBINANTE QUE CORRESPONDE AL SITIO
CATALÍTICO DE UNA FOSFOLIPASA C DE
CAFETO**

TESIS

PRESENTADA POR

MATILDE MARGARITA ORTIZ GARCIA

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2007

BIBLIOTECA *CICY*

ÍNDICE

Página

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1.- ANTECEDENTES

1.1.- LAS FOSFOLIPASAS

1.1.1.- La Fosfolipasa C (PLC)

1.1.2.- La PLC en mamíferos

1.1.3.- Características estructurales de las fosfolipasas C

1.1.3.1.- Dominios comunes

1.1.3.1.1.- Dominios X y Y

1.1.3.1.2.- Dominios PH

1.1.3.1.3.- Dominios EF-“hand”

1.1.3.1.4.- Dominios C2

1.1.3.2.- Dominios específicos

1.1.3.2.1.- Dominios SH2 y SH3

1.1.3.2.2.- Extensión C-terminal de la PLC- β

1.1.3.2.3.- Dominios RasGEF y RA de la PLC- ϵ

1.2.- MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PLC

1.2.1.- Activación por receptores con actividad de tirosina cinasa

1.2.2.- Activación por receptores acoplados a proteínas G

1.2.3.- Activación de la PLC- $\delta 1$

1.2.4.- Activación de la PLC- γ

1.2.5.- Activación de la PLC- ϵ

1.3.- FUNCIÓN DE LA PLC

1.4.- LA PLC EN PLANTAS

1.5.- IMPORTANCIA DEL CAFÉ

1.5.1.- MODELO DE ESTUDIO: PLC DE CAFETO

2.- OBJETIVO GENERAL	16
2.1.- Objetivos Particulares	16
3.- HIPÓTESIS	17
4.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
5.-MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1.-Cultivo de células en suspensión de café	19
5.2.- Vectores	19
5.3.- Células de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysE	20
5.4.- Preparación de las células competentes por el método del cloruro de rubidio.	21
5.5.- Digestión de los vectores	22
5.6.- Separación de fragmentos	23
5.7.- Purificación de los productos de restricción	23
5.8.- Ligación en el vector de expresión	24
5.9.- Transformación por choque térmico	25
5.10.- Extracción del plásmido	26
5.11.- Expresión del fragmento peptídico de la clona XY-pET	26
5.12.- Preparación de las muestras	27
5.13.- Purificación del péptido recombinante correspondiente al fragmento catalítico de la PLC	27
5.13.1.- Perfil de purificación	28
5.13.2.- Tinción con azul de Coomassie	28
5.14.- Medición de la actividad de la PLC	29
5.15.- Generación de anticuerpos	29
5.16.- Western Blot	30
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1.- Construcción del vector de expresión	31
6.2.- Rendimiento de la purificación de los fragmentos de restricción	33
6.3.- Transformación de las células competentes <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysE	34

6.4.- Purificación del fragmento catalítico	36
6.5.- Determinación de la actividad enzimática de PLC	37
6.6.- Inmunoblot	40
7.- CONCLUSIONES	42
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMEN

La fosfolipasa C (PLC) que hidroliza fosfolípidos de inositol para formar diacilglicerol y fosfatos de inositol se encuentra presente en células de mamíferos así como en plantas y varios microorganismos. Esta familia de isoenzimas se convierte en un elemento importante al iniciar un mecanismo de transducción de señales en respuesta a estímulos específicos. En mamíferos, la PLC se clasifica en las subfamilias β , γ , δ , ϵ , ζ y recientemente encontrada en el tejido nervioso de ratón, la isoforma η esta clasificación esta basada en la organización de sus dominios. En las plantas, los genes de PLC, presentan una homología con la PLC δ de mamíferos, aunque el producto de expresión de estos genes ha sido purificado solo parcialmente en plantas. También se ha clonado el ADN del fragmento catalítico de la PLC de células en suspensión de cafeto (*Coffea arabica L.*), en un vector de expresión pTYB1. El objetivo de este trabajo fue expresar y caracterizar el péptido recombinante que corresponde al sitio catalítico de la PLC de cafeto. Dentro de lo obtenido en este trabajo se logró expresar el péptido recombinante del sitio catalítico de la PLC de cafeto y se generó anticuerpos en el suero de conejo.