



06551

10

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización de la estructura y expresión  
del gen que codifica la proteína de matz  
relacionada a la de retinoblastoma**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA  
MARÍA MANUELA NÁJERA MARTÍNEZ**

**MÉXICO, D.F.**



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.

**E**l presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica (Laboratorios 101 y 114 del Edificio E) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Fco. Javier Plasencia de la Parra.

El jurado asignado para el examen de grado fue el siguiente:

- |              |                                  |
|--------------|----------------------------------|
| ■ Presidente | Dr. Rogelio Rodríguez Sotres     |
| ■ Vocal      | Dr. Roberto Coria Ortega         |
| ■ Secretario | Dr. Alejandro Zentella Dehesa    |
| ■ Suplente   | Dra. Ma. Imelda López Villaseñor |
| ■ Suplente   | Dra. Patricia Coello Coutiño     |

Este trabajo se realizó con apoyos de los proyectos:

- CONACyT 3407-PN
- PAIP-6290-08 de la Facultad de Química
- Convenio CSIC-CONACyT:  
"Estudio estructural y funcional de reguladores del ciclo celular: organización del gen de retinoblastoma de maíz y su promotor"
- Durante parte del desarrollo de esta tesis se recibió la beca de CONACyT N° 116153

## **Agradecimientos**

A TI, por todo

A la UNAM, por todo lo que me ha dado

Al Dr. Javier Plasencia, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y en este proyecto, por su confianza y apoyo, por su dirección durante el desarrollo experimental y escritura de la tesis, por las n- revisiones de la misma, por los conocimientos que generosamente me ha transmitido y por toda la paciencia que ha tenido conmigo

A los miembros del Jurado, por el tiempo dedicado a revisar este trabajo y por las sugerencias y observaciones que contribuyeron a enriquecerlo

A los miembros de mi comité tutorial, Dres. Roberto Coria, Javier Plasencia y Jorge Vázquez, por sus valiosas sugerencias durante los exámenes tutoriales

Al Dr. Jorge Vázquez, por todo lo que representa para mí haber podido trabajar en su laboratorio

A MaryPaz, por el privilegio de su amistad, por su constante preocupación por los avances del proyecto y de la escritura de la tesis, por su estímulo permanente, por soportarme y por todas las veces que me permitió sellarle los zapatos con la poliacrilamida de los geles de secuenciación

A Luis Sánchez, por su maravillosa amistad que me dispensa

Felipe Cruz y a Sobelda Sánchez, por ser para mí ejemplo constante de amor a la ciencia, trabajo, entusiasmo y superación

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo a mis padres y hermanas, sin cuyo amor, estímulo, apoyo, preocupación y regaños en los días normales, pero sobre todo en los días de crisis, nada de lo logrado hubiera sido posible.

A Roberto, quien es mi fuente constante de felicidad desde que llegó a mi vida.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios 101 y 114, Sobeida, Chelo, Luis, Gaby, Andrea, Maru, Faby, MaryPaz, Ivonne, Felipe, Juan, Pilo, Edurne, Alma y Alberto, quienes han compartido y comparten conmigo conocimientos, proyectos, alegrías, penas, comidas y una que otra ida al cine, y sobre todo son quienes diariamente han soportado y soportan todos mis berrinches y locuras.

Con aquellos que se dediquen al oficio de aprendiz de científico, como yo, y obviamente, que por alguna razón se topen con este trabajo, quiero compartir el fragmento de un cuento tomado de los Cuentos de Canterbury, de G. Chaucer, que siempre me anima a seguir cuando las cosas no van bien en el laboratorio:

*...Antes de poner la vasija en el fuego con cierta cantidad de metales, mi señor los atempera y nadie más que él (ahora que se ha ido me atrevo a decirlo), porque según dice, sabe manipular con maña. A pesar de que yo sé bien que tiene tal fama, con todo merece reproches muy a menudo. ¿Y sabéis vosotros por qué?. Muchas veces ocurre que la vasija estalla en pedazos, y todo se pierde, los elementos se desparraman por todo el suelo y otros saltan al techo. Cuando nuestro aparato se quiebra, como he dicho, todos los alquimistas riñen y se incomodan. Uno dice que ha sido por la clase de fuego; otro dice que no, sino por el atizado (entonces entraba yo en temor, pues ese era mi oficio). «No -añade un tercero-. Soís unos ignorantes y unos necios; es que el metal no estaba atemperado como era debido». «No - replica el cuarto-. Callad y escuchadme. Como nuestro fuego no estaba alimentado con madera de haya, esa es la causa y ninguna otra. ¡Ea -decía mi señor-, no hay más que hablar! De ahora en adelante yo me guardaré de estos peligros. Estoy segurísimo de que el jarro estaba rajado. Sea lo que fuere no os desalentéis. Que se barra el suelo inmediatamente, como de costumbre; anímense vuestros corazones, y mostraos alegres y contentos. Se barrían los cascajos formando un montón; extendíase un lienzo en el suelo y todos los materiales se echaban en una criba, se cernían y se escogían repetidas veces. ¡Pardiez!- exclamaba uno-. Algo hay aquí todavía de nuestro metal, ya que no lo tengamos todo. Aunque este negocio haya salido mal ahora, otra vez saldrá bien...*



## CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
1.1 El ciclo celular eucariótico	9
1.2 La fase G1, el punto de restricción y la ruta del retinoblastoma	11
1.3 El retinoblastoma y el gen de susceptibilidad a retinoblastoma	13
1.4 Clonación molecular e identificación del gen humano de susceptibilidad a retinoblastoma	14
1.5 Características del gen humano de susceptibilidad a retinoblastoma ( <i>Rb</i> )	14
1.6 Expresión del gen <i>Rb</i> a nivel de transcrito	14
1.7 La proteína de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb)	15
1.8 Caracterización estructural y bioquímica de la proteína	15
1.9 Fosforilación de pRb dependiente del ciclo celular	17
1.10 Unión de E2F a pRb	18
1.11 El papel de pRb en la diferenciación celular	19
1.12 El papel de pRb en la apoptosis	19
ANTECEDENTES	21
2.1 La proteína del retinoblastoma en plantas	21
2.2 Caracterización de las clonas de cDNA como secuencias que codifican una proteína homóloga a pRb de humano	22
2.3 Los cDNAs de <i>Rb</i> de maíz	25
2.4 Una clona genómica tipo <i>Rb</i> de maíz	27
OBJETIVOS PARTICULARES	29
HIPÓTESIS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 Material	31
3.2 Determinación del número de genes de RBR de maíz por Southern blot	31
3.3 Clonación y secuenciación de las subclonas genómicas RB4000K y RB9000S a partir de la clona $\lambda$ Fix II 8.1.4.2	34
3.4 Ensayos de RT-PCR y de Extensión de Cebador	40
3.5 Detección de proteínas RBR en maíz por Western blot	43
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
4.1 Subclonación y secuenciación del gen <i>ZmRBR</i> contenido en la clona genómica $\lambda$ Fix II 8.1.4.2	46
4.2 Determinación de la pertenencia del gen <i>ZmRBR</i> a una familia multigénica	54
4.3 Análisis de la región codificante del gen <i>ZmRBR</i>	57
4.4 Análisis de la región 3'-UTR del gen <i>ZmRBR</i>	63
4.5 Estructura del gen <i>ZmRBR</i>	69
4.6 Análisis de la región 5' del gen <i>ZmRBR</i>	71
4.7 Análisis de la expresión del gen <i>ZmRBR</i> a nivel de RNA mensajero	74
4.8 Análisis de los niveles de proteínas RBR en diferentes tejidos de maíz	76
DISCUSIÓN	
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	87
APÉNDICE A	89
APÉNDICE B	95
	99



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>LTR</b>	Repeticiones Terminales Largas
<b>ARS</b>	Secuencia Autónoma de Replicación	<b>MPF</b>	Factor Promotor de la Mitosis
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina	<b>NLS</b>	Señal de Localización Nuclear
<b>BLAST</b>	Algoritmo para análisis de secuencias (Basic Local Alignment Search Tool)	<b>PBS</b>	Solución Salina Amortiguada con Fosfatos (Phosphate -Buffered Saline)
<b>CAK</b>	Cinasa activadora de CDK	<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>cdc</b>	Ciclo de División Celular	<b>PEG</b>	Poli(etil)énglico
<b>CDK</b>	Cinasa Dependientes de Ciclina	<b>PP1</b>	Fosfatasa 1 (Phosphatase 1)
<b>cDNA</b>	DNA complementario	<b>PREM</b>	Retroelemento de Polen de Malz.
<b>CHX</b>	Cicloheximida	<b>R</b>	Punto de restricción
<b>CIAP</b>	Fosfatasa Alcalina de Intestino de Ternera (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	<b>RACE</b>	Amplificación Rápida de los Extremos de un cDNA
<b>CKI</b>	Inhibidor de Cinasas Dependientes de Ciclina	<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>cyc1At</b>	Ciclina 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>RBF</b>	Gen de la proteína <i>RB</i> de la mosca de la fruta (fruit fly)
<b>CycMs</b>	Ciclina de <i>Medicago sativa</i>	<b>RBR</b>	Proteínas Relacionas con RB (Retinoblastoma-Related)
<b>ddNTPs</b>	Didesoxinucleósido Trifosfato	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DEPC</b>	Diethylpirocarbonato	<b>RRB</b>	Proteínas Relacionas con RB (Related to RB)
<b>DHFR</b>	Dihidrofolato Reductasa	<b>RTS</b>	Estable a Temperatura ambiente (Room Temperature Stable)
<b>DMFA</b>	Dimetilformamida	<b>S/T</b>	Serina/Treonina
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoxido	<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil Sulfato de Sodio- Electroforesis en Gel de Poli(acrilamida)
<b>dNTP</b>	Desoxinucleósido Trifosfato	<b>SV40</b>	Virus 40 de Simio
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetrametil etiléndiamina
<b>E1A</b>	Proteína E1 de Adenovirus	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor $\beta$ Transformante del Crecimiento (Transforming Growth Factor)
<b>EDTA</b>	Ácido Etiléndiamin Tetraacético	<b>TK</b>	Timidina Cinasa
<b>EST</b>	Secuencia Expresada Marcada (Expressed Sequence Tagged)	<b>3'-UTR</b>	Región 3' no Traducida (Untranslated Region)
<b>GST</b>	Glutión S-Transferasa	<b>5'-UTR</b>	Región 5' no Traducida (Untranslated Region)
<b>HPV16</b>	Proteína 16 de Papilomavirus de Humano	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>INK</b>	Inhibidor de cinasas	<b>WDV</b>	Virus del Enanismo del Trigo (Wheat Dwarf Virus)
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido	<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-Indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>Kip</b>	Proteína Inhibidora de Cinasas		
<b>LB</b>	Luria Bertani		
<b>Le</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i>		
<b>MSI 1</b>	Proteína multicopia supresora de una mutación en el gen <i>IRA 1</i> (Multicopy Suppressor of a mutation in the <i>IRA 1</i> gene)		



## RESUMEN

Una de las líneas de investigación que se siguen en nuestro laboratorio centra su interés en el estudio de la expresión de genes involucrados en las fases G1 y S del ciclo celular de células vegetales. La especie que se estudia es maíz (*Zea mays* L.) y una de las estrategias que se ha seguido es el aislamiento y clonación de los genes y el estudio de su expresión durante la germinación.

En la regulación del ciclo celular de mamíferos la llamada proteína de susceptibilidad a retinoblastoma, (pRb), juega un papel muy importante en la fase G1 del ciclo celular, cuando la célula decide si sigue hacia la fase S, es decir si prolifera o no. pRb es una fosfoproteína que es activa en su estado hipofosforilado, en el que une al factor transcripcional E2F, cuyas secuencias de reconocimiento se encuentran en los promotores de genes esenciales para el inicio y continuación de la fase S. En la fase G1 temprana pRB está unida a E2F, al cual libera cuando en respuesta a un estímulo mitogénico, se activan complejos de ciclinas / cinasas dependientes de ciclinas (ciclina D/cdk4,6), las que fosforilan a pRb, dejándola en un estado inactivo como inhibidor del ciclo celular hacia la mitad de la fase G1.

pRb pertenece a una familia de proteínas denominado proteínas "bolsillo", debido a que tienen dos dominios muy conservados llamados juntos el "bolsillo A/B". En plantas se ha demostrado la existencia de una proteína homóloga a pRb, pues en *Zea mays*, *Nicotiana tabacum* y *Chenopodium rubrum* se han aislado cDNAs que codifican proteínas que tienen una identidad del 50% con el "bolsillo" A/B de pRb y características estructurales y bioquímicas similares a ésta, por lo que se han llamado proteínas RBR (por sus siglas en inglés de "retinoblastoma-related"). Los cDNAs RBR de maíz se han denominado *RRB1*, *RRB2* y *ZmRBR1*.

En el laboratorio, utilizando como sonda un fragmento de *ZmRb1*, se buscó y se aisló en una biblioteca genómica una clona que contiene un gen con alta identidad (entre 87% y 97%, en sus secuencias exónicas traducibles y no traducibles, con los cDNAs RBR de maíz.

En este trabajo se presenta la secuencia del gen al que se ha denominado *ZmRBR*. La secuencia de aproximadamente 9.5 kpb se ha estructurado en 16 exones y 16 intrones, una región promotora y dos regiones no traducidas 5'-UTR y 3'-UTR; asimismo como parte de la caracterización del gen se mapeó el sitio de inicio de la transcripción en el hexanucleótido TAATAT situado a 289 pb arriba del ATG, además las secuencias flanqueantes del gen se identificaron como pertenecientes a un retroelemento.

Los experimentos de Southern blot aportan evidencias que sugieren que en el genoma de maíz existe más de un gen que codifica proteínas RBR.

Los estudios de la expresión del gen muestran una expresión diferencial a nivel de RNA mensajero, ya que se detectó el transcrito en hoja y en tallo de plántulas de maíz pero no en la raíz de las mismas, ni en eje embrionario o embrión de semilla seca. Los niveles de proteínas RBR se inmunodetectaron en los mismos tejidos en los que se observó la presencia de RNA mensajero, aunque no en la raíz de semillas germinadas por tres días ni en la semilla seca.



# INTRODUCCIÓN

## 1.1 El ciclo celular eucariótico

El propósito fundamental del ciclo celular es asegurar que el DNA sea totalmente duplicado durante la fase S, o de síntesis de DNA, para que copias idénticas de los cromosomas sean distribuidos de igual manera en dos células hijas durante la mitosis, o fase M (Sherr, 1996).

Para facilitar su estudio el ciclo se ha dividido tradicionalmente en cuatro fases (Figura 1):

- 1) Replicación del DNA, que ocurre durante la fase S
- 2) Segregación de cromosomas y división celular que sucede durante la fase M.

En las células somáticas, las fases S y M están separadas por fases llamadas G1 y G2:

- 3) fase G1, antes de la replicación del DNA, y
- 4) fase G2, antes de la mitosis.

Las señales externas controlan la entrada en el ciclo de un estado quiescente (G<sub>0</sub>) y la salida de los eventos del ciclo hacia la diferenciación terminal. Además, se tienen diversos puntos de control que aseguran que los eventos del ciclo celular ocurran en el orden correcto, deteniendo el progreso del ciclo en respuesta a irregularidades tales como daño al DNA o ensamblaje defectuoso del huso mitótico. En el ciclo celular los eventos transicionales de replicación del DNA y mitosis son promovidos vía la actividad de complejos de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, CDKs (Cyclin-Dependent Kinases\*) (Nigg, 1995).

Cuando una célula hija sale de la mitosis y avanza en el ciclo a través de la fase inicial de crecimiento G1, estimulada por factores mitogénicos, llega a lo que se llama en mamíferos el punto de restricción, o de "START" en levaduras. Esto permite a la célula replicar su genoma una vez en un período del ciclo conocido como fase S. Después de que el genoma se ha replicado, la célula pasa a través de otra fase de crecimiento mucho más corta que G1, llamada G2, la cual tiene mecanismos reguladores que aseguran que el genoma haya sido replicado solamente una vez. Posteriormente entra nuevamente en mitosis, en donde el genoma replicado se reparte equitativamente en dos nuevas células, llamadas células hijas (MacLachlan et al., 1995).

La proteína de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb) ejerce su acción en la fase G1 del ciclo celular de eucariotes superiores, específicamente en el punto de restricción, sin embargo, en levaduras no se ha identificado una proteína homóloga a pRb. En células de mamíferos está bien caracterizada la función de pRb en el ciclo celular, por lo que nos referiremos, específicamente, a los eventos que ocurren durante la fase G1 del ciclo celular en este tipo de células.

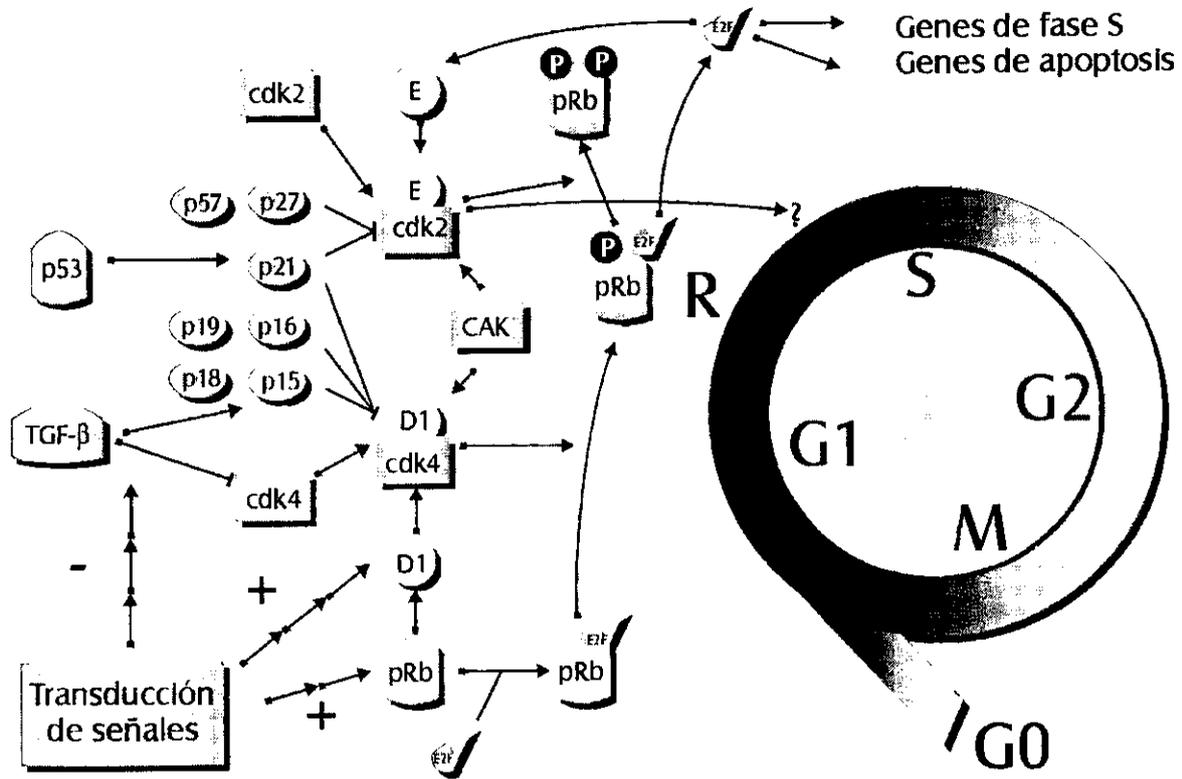


Figura 1. Regulación de la fase G1 del ciclo celular de mamíferos

pRb es el regulador principal del punto de restricción (R), o una proteína clave en la ruta del retinoblastoma. En respuesta a un estímulo mitogénico se lleva a cabo la fosforilación de pRb por los complejos ciclina D/CDK4 o 6, permitiendo la liberación de E2F y la transcripción de genes de la fase S. Posteriormente, se requiere la fosforilación de pRb por el complejo ciclina E/CDK2 para el inicio de la fase S. Un paso crítico en la activación de los complejos ciclina/CDK es su fosforilación por CAK (cinasa activadora de CDKs). Las señales inhibitorias se transmiten por la acción de proteínas inhibitorias de CDKs, de la familia INK 4 (p15, p16, p18 y p19) y de la familia de p21, las cuales se unen a los complejos ciclina/CDK y bloquean su actividad. Figura tomada y modificada de Herwing and Strauss, 1997.



## 1.2 La fase G1, el punto de restricción y la ruta del retinoblastoma

### a) La fase G1

La fase G1 del ciclo celular es un período funcional durante el cual las células se preparan para la síntesis de DNA. La fase G1 fue definida originalmente como un intervalo de tiempo entre la mitosis y la síntesis de DNA, que comprende muchas horas en la mayoría de las células. (Pardee, 1989). Durante la fase G1 la célula decide su destino entre avanzar en el ciclo, detenerlo temporalmente para permanecer en un estado de quiescencia, diferenciarse o morir (Bartek et al., 1997).

En esta fase se puede identificar un punto muy importante de regulación, el llamado punto R o de restricción en mamíferos y de "START" en levaduras, el cual se ubica en la mitad de la fase G1 tardía y la divide en dos fases: la G1 media tardía y la G1 tardía (Planas-Silva et al., 1997).

### b) El punto de restricción

El punto de restricción fue definido originalmente como un punto discreto en el tiempo en la mitad de la fase G1 tardía.

El concepto de punto R surgió inicialmente del trabajo de Pardee (1989), quien determinó los tiempos en la vida de una célula normal en los que su crecimiento depende de la presencia de mitógenos en el medio de cultivo. Esta dependencia sólo opera durante una ventana discreta de tiempo, que comienza con la fase G1 y termina varias horas después, antes de la transición G1/S, a partir de la cual la célula se compromete a completar lo que aún le queda de su ciclo de vida, en ausencia de mitógenos o suero. La transición entre un estado dependiente de mitógenos a uno independiente fue a lo que se designó como punto R o punto de restricción.

El punto de restricción puede verse también como un mecanismo regulador crítico que permite a la célula inspeccionar su ambiente y su propio tamaño, ya que es cuando la célula toma decisiones acerca de su destino (Bartek et al., 1996).

En este punto de transición la célula evalúa su exposición acumulada a señales específicas recibidas sobre un período de tiempo apreciable; si las señales, en su mayoría de origen extracelular, son propicias para su crecimiento, la célula decide proceder y pasar a través del punto R; alternativamente, la célula puede detener su avance a través de G1 y eventualmente salir del ciclo, ya sea hacia la fase G<sub>0</sub> o hacia un estado posmitótico, posiblemente más diferenciado (Planas-Silva and Weinberg, 1997).

Pardee (1989) también postuló, aunque no probó, la existencia de una proteína a la que denominó la proteína R, la cual debía acumularse hasta alcanzar una cantidad crítica de tal manera que provocara que la célula pasara el punto R. Propuso a esta proteína como un elemento regulador clave para la proliferación.

Tal función podía corresponder a la proteína de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb), ya que se tienen evidencias contundentes de su papel como un regulador bastante estable de la fase G1. pRb es una fosfoproteína de 110 kDa, codificada por un solo gen, con dos dominios bien conservados conocidos como el "bolsillo" A/B (Riley et al., 1994); las características estructurales y bioquímicas de la proteína se describirán con detalle más adelante. También existe un cúmulo de evidencias que sugieren que pRb juega un papel clave en un punto de control de la fase G1 tardía, evitando la entrada inapropiada a la fase S, este punto de control evoca el concepto original del punto R (Bartek et al., 1996).

pRb sufre una modificación rápidamente discernible en un tiempo cercano y tal vez contemporáneo con el punto R de transición. Durante las horas que preceden a G1, pRb se encuentra en una forma hipofosforilada, en contraste a la forma hiperfosforilada en la que se encuentra durante las



últimas horas de G1. Varias líneas de evidencia indican que la fosforilación provoca la inactivación de la función de pRb como supresor del crecimiento (Cobrinick et al., 1993).

La proteína de susceptibilidad a retinoblastoma ha sido el eje de dos modelos acerca de la regulación del punto de restricción: el primero propone a la proteína como un regulador maestro que controla la puerta de entrada al punto R: una célula que ya ha recorrido la mayor parte de la fase G1 encuentra la entrada al punto R cerrada por su guardián, pRb. Bajo condiciones propicias para avanzar el resto del ciclo celular, pRb sufrirá fosforilación y por consiguiente inactivación, provocando que la puerta se abra y por lo tanto que la célula proceda a través de G1 tardía. Las células que carezcan de una pRb funcional por diversos motivos, proceden a través de la fase G1 sin sufrir el control normal impuesto por esta proteína. Por extensión, las células salen del control de las influencias impuestas "corriente arriba" de pRb, como la de los factores promotores del crecimiento o la de los factores inhibitorios de éste, como el  $TGF\beta$  o la inhibición por contacto, respectivamente (Weinberg, 1995).

Un segundo modelo es el denominado «la ruta del retinoblastoma», que representa una vía bioquímica de diversos componentes y no de un solo regulador maestro, como el mecanismo molecular que sostiene y explica el punto de control de la fase G1 tardía.

### c) La ruta del retinoblastoma

En esta ruta, la fosforilación inactivante de pRb puede ser el evento clave, resultado de haber completado un número de eventos previos al punto de restricción (pre-R), y a partir del cual se disparan eventos llamados post-R, que conducen a la célula a comprometerse a entrar a la fase S y completar la ronda de división celular.

pRB sufre una fosforilación exhaustiva en el momento en que la célula pasa a través del punto R, tiempo en el que la célula adquiere su independencia a mitógenos (Planas-Silva and Weinberg, 1997).

La acumulación suficiente de la actividad de cinasa para fosforilar y neutralizar los efectos de pRb restrictivos del crecimiento se logra por una combinación de varios eventos, llamados eventos pre-R, como son: la acumulación de ciclinas D inducidas por mitógeno, su asociación productiva con y su activación por cinasas dependientes de ciclina (CDKs), el secuestro de p27 (inhibidor de CDKs) por ciclina D-CDK4/6, y la regulación negativa de otros inhibidores de CDKs (CKIs) inducida por mitógenos (Bartek et al., 1996).

El elemento central de esta ruta es la proteína del retinoblastoma, aunque se puede asignar también un papel prominente a los complejos ciclina D-CDKs, ya que ellos tienen un doble papel, uno catalítico en la fosforilación de pRb y otro de reconocimiento al unir y secuestrar varios CKIs (Bartek et al., 1997).

Ahora, en una célula que pasa de la quiescencia a G1 ¿cuáles son los elementos de esta ruta y cómo actúan bajo la influencia de señales que estimulan el crecimiento?

El balance entre las ciclinas D, CDK4/6, los inhibidores de CDK (CKIs), tanto de la familia INK4 (p15, p16, p18 y p19) como de la familia Kip (p21, p27, p57) y su relación con pRb como su sustrato principal, representan juntos el núcleo de la ruta del retinoblastoma (Figura 1; Bartek et al., 1997).

Se ha sugerido que la relación de todas estas moléculas entre sí se inicia en un punto de convergencia para, posiblemente, casi todas las cascadas de señalización mitogénica disparadas por factores de crecimiento, citocinas u hormonas e iniciadas vía cualquiera de las tres principales clases de receptores: los membranales de cinasa de tirosina, los nucleares de esteroides y los acoplados a proteínas G (Lukas et al., 1996). Todas dependen estrictamente de la actividad de CDKs dependientes de ciclina D para inducir la síntesis de DNA y el avance a través del ciclo celular. Las cascadas de señalización individuales parecen operar estimulando una o más ciclinas



D, su ensamblaje con las CDKs y/o su regulación negativa por los CKIs. p21, p27 y p57 pueden inhibir a los complejos ciclina D/CDK 4-6 y ciclina E/CDK 2, mientras que p15, p16 y p18 inhiben específicamente la activación de CDK4 y CDK6 por ciclinas D (Sherr and Roberts, 1995).

Las ciclinas D, CDK4/6, el factor de transcripción E2F1 y el Inhibidor p21 se inducen como parte de una respuesta retrasada a mitógenos en células que entran al ciclo provenientes de la quiescencia; pRb se encuentra inicialmente en una forma hipofosforilada formando complejos con E2F1 y su proteína asociada DP1. La ciclina D unida a CDK4 se fosforila por CAK (cinasa activadora de CDKs, CDK-Activating Kinase) y se activa. La fosforilación de la forma hipofosforilada de pRb que se lleva a cabo por los complejos ciclina D/ CDK4-6 solo prepara a pRb para el punto de transición R, pero no es suficiente para lograr la transición. De aquí que la actividad de los complejos ciclina D/CDKs 4-6 sea un requisito para la transición, pero no determina su tiempo o dispara su paso a través del punto R. Esto último parece depender de la aparición de la actividad del complejo ciclina E-CDK 2, debido a que se activa también por CAK alrededor del tiempo en que la célula pasa a través del punto R (Bartek et al., 1996).

La fosforilación de pRb y la liberación del factor transcripcional E2F pueden marcar el punto de compromiso de la célula a completar el ciclo, prendiendo un programa autónomo que conduce a la transición G1/S y a eventos post-R que incluyen la activación de los factores de transcripción de la fase S, la acumulación suficiente de ciclinas A y E, la activación de CDK2 y el mantenimiento de niveles subumbrales de CKIs (Sherr et al., 1994; figura 1).

Ya que pRb es el elemento central en ambos modelos, revisaremos las evidencias que condujeron a asignarle un papel clave, así como las principales características bioquímicas de la proteína.

### **1.3 El retinoblastoma y el gen de susceptibilidad a retinoblastoma**

El retinoblastoma (Rb) es un cáncer maligno de la retina en desarrollo, que se manifiesta como un tumor intraocular en la infancia temprana. Se han identificado dos tipos de retinoblastoma, el esporádico y el hereditario. Knudson, quien llevó a cabo estudios estadísticos de la enfermedad, propuso que deben ocurrir al menos dos eventos mutacionales en ambos alelos del gen de susceptibilidad a retinoblastoma, para dar como resultado la tumorigénesis (Herwing et al., 1997).

Estudios citogenéticos de las células tumorales y normales de pacientes con retinoblastoma detectaron la pérdida de material genético en o cerca del locus de susceptibilidad a retinoblastoma, específicamente ablaciones en el brazo largo del cromosoma 13, por lo que se sugirió que los alelos de susceptibilidad a retinoblastoma eran mutaciones nulas y, entonces, los alelos de tipo silvestre codificarían un represor de la formación de tumores (Goodrich and Lee, 1993).

Con la hipótesis de que el retinoblastoma fuera provocado por la inactivación de un solo gen supresor de tumores, la clonación molecular de éste gen cobró gran importancia. El gen a clonar debería satisfacer varios requerimientos antes de que se aceptara como el responsable de la susceptibilidad a retinoblastoma. Debería residir cerca de la región del cromosoma 13q14 en donde se habían ubicado a los marcadores unidos a la susceptibilidad a retinoblastoma, como la esterasa D, pues la actividad de la misma se veía disminuida en los retinoblastomas. Ambos alelos del gen tendrían que estar mutados en las células de retinoblastoma, mientras que un alelo de tipo silvestre debería permanecer en las células normales de los pacientes. Tanto el retinoblastoma de origen hereditario como el esporádico deberían ser provocados por mutaciones del gen, las proteínas codificadas por él no deberían ser funcionales y, finalmente, el producto del gen silvestre debería tener una función consistente con su papel como supresor tumoral (Riley et al., 1994).



#### **1.4 Clonación molecular e identificación del gen humano de susceptibilidad a retinoblastoma**

La clonación del gen no fue trivial, ya que no se disponía de información acerca de su función. La estrategia general utilizada por varios grupos para clonarlo fue aislar sondas de DNA localizadas en la región 13q14 ( banda q14 del cromosoma 13), caminar a través del cromosoma ("chromosome walk") utilizando las sondas de cDNA para escrutar bibliotecas genómicas de DNA y, a intervalos regulares, escudriñar bibliotecas de cDNA con el propósito de detectar la presencia de genes expresados. El gen *Rb1* se identificó aislando un fragmento de una sola copia del cromosoma 13 y, por ensayos de Northern blot, se observó que se hibridaba con un transcrito de 4.7 kb de las células de retina y que no estaba presente en células de retinoblastoma o de osteosarcoma (Riley et al., 1994).

Otra clona de cDNA, la *Rb-1*, fue identificada como un gen que se expresaba en tejido normal y en tumores distintos a retinoblastoma, pero que no se expresaba, o lo hacía en forma alterada, en todos los retinoblastomas que se examinaron (Lee et al., 1987a).

*Rb1* cumplía, entonces, con los requisitos que se previeron para un gen considerado como el de la susceptibilidad a retinoblastoma.

Otras evidencias que fortalecieron la idea de que *Rb1* corresponde al de susceptibilidad a retinoblastoma fue el hecho de que se encontraron ablaciones y mutaciones puntuales del gen en un gran número de casos de retinoblastomas. Además, se detectó un alelo mutado y uno de tipo silvestre en células normales, mientras que las células tumorales sólo contenían alelos mutados. Las células normales de pacientes con retinoblastoma esporádico tenían alelos de tipo silvestre, a diferencia de las células tumorales, las cuales sólo contenían alelos mutados (Bookstein et al., 1988).

Se obtuvo un cDNA completo del gen putativo a *Rb*, cuya longitud era de 4757 pb y que se presentaba con un marco de lectura abierto que codificaba una proteína con un masa molecular de 110 kDa. El cDNA se utilizó para aislar clonas genómicas de DNA y mapear la estructura del gen.

#### **1.5 Características del gen humano de susceptibilidad a retinoblastoma (*Rb*)**

El tamaño del gen *Rb* es de ~200 kpb y por comparación de las clonas genómica y de cDNA se identificaron 27 exones, cuyos tamaños oscilan entre 31 nucleótidos del exón 24 y 1889 bases del exón 27, el cual contiene también el codón de paro y las señales de poliadenilación. Los tamaños de los intrones van desde los 80 nucleótidos del intrón 15 hasta las 70 kpb del intrón 17. El exón 1 contiene el codón de inicio y las secuencias 5' no traducidas. El sitio de inicio de la transcripción se encuentra embebido en una región rica en CGs, típica de promotores de genes de mantenimiento. No se encuentra en esta región una secuencia que pudiera corresponder a una caja TATA (Hong et al., 1989).

#### **1.6 Expresión del gen *Rb* a nivel de transcrito**

La expresión del gen *Rb* a nivel de transcrito se alteró o estuvo ausente en tres de seis muestras de retinoblastomas, siendo de 4.0 kb el mensaje que se detectó. En tejidos normales como la retina fetal y la placenta, así como en tres neuroblastomas y dos meludoblastomas se detectó un mensaje de 4.6 kpb. En tejidos fetales de rata y de rata adulta (hígado, cerebro, riñón, ovario y médula) se identificó un transcrito de 4.6 kpb. También se detectó un transcrito



de tamaño menor, de aproximadamente 2.3 kb, en el cerebro fetal de rata, tal mensaje podría representar el procesamiento diferencial del gen *Rb*, o bien, el transcrito de un gen distinto aunque muy relacionado a *Rb* (Lee et al., 1987).

### **1.7 La proteína de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb)**

El producto del gen *Rb* se identificó mediante anticuerpos policlonales que se habían obtenido contra tres péptidos sintéticos cuya secuencia se dedujo a partir de la del cDNA *Rb1*, o contra una proteína de fusión que se expresó en *E. coli*. Los anticuerpos policlonales que se obtuvieron inmunoprecipitaron a partir de extractos de células normales una proteína de alrededor de 110 kDa, a la que se identificó como el producto del gen de susceptibilidad a retinoblastoma, con las siguientes características: se localiza en el núcleo, se une de manera no específica a través de otras proteínas a DNA de doble cadena, su presencia no se detectó en retinoblastomas (Lee et al., 1987), y se fosforila en residuos de serina y de treonina (Ludlow et al., 1989). La vida media de la proteína es de 6-12 h, mientras que el período durante el cual está fosforilada es mucho más corto (Chen et al., 1989).

### **1.8 Caracterización estructural y bioquímica de la proteína**

Se han utilizado y caracterizado diferentes mutantes con ablaciones, naturales y artificiales, como herramientas para definir en pRb dominios estructurales relevantes en sus interacciones con otras proteínas y para su funcionamiento, entendiendo por éste la capacidad de la proteína de detener a las células en la fase G1 del ciclo celular y suprimir la formación de tumores.

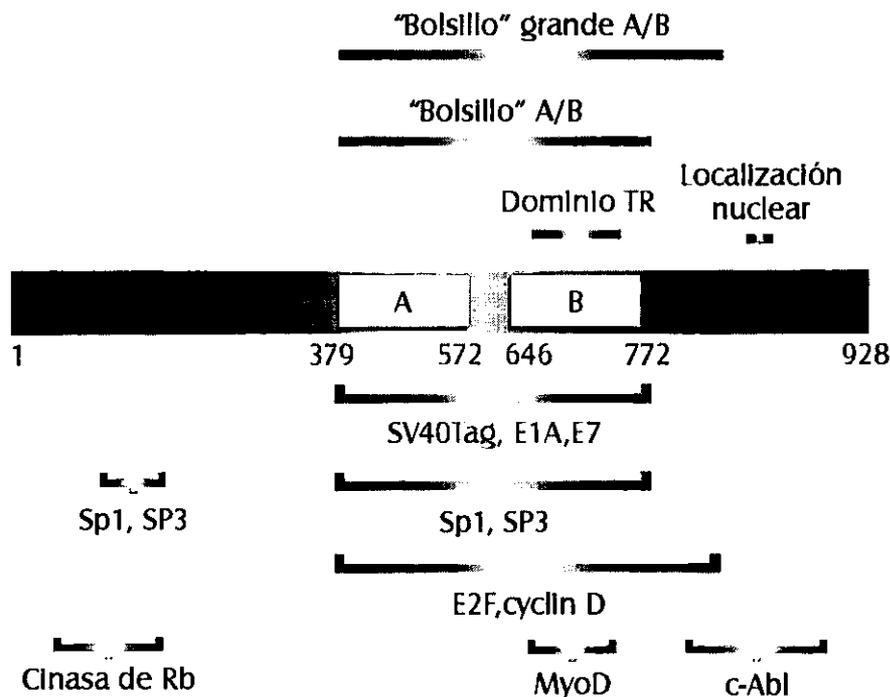
La función de pRb como supresor de tumores y como regulador del ciclo celular normal se originó de investigaciones que trataban de dilucidar el mecanismo mediante el cual algunas oncoproteínas virales desregulan el control del ciclo celular. En experimentos de mutagénesis por ablación se encontraron dos regiones de pRb necesarias para las interacciones con proteínas transformantes de diferentes clases de virus de DNA, tales como la proteína E1 de adenovirus (E1A), el antígeno T del virus SV40 y la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16) (Dyson et al., 1989; DeCaprio et al., 1988), todas ellas a través del motivo LXCXE, lo que condujo a la identificación de dos bloques de aminoácidos no contiguos, el dominio A (aa 379-572) y el dominio B (aa 647-772), llamados juntos el "bolsillo" A/B. Se observó, asimismo, que éstas regiones son críticas para la fosforilación de la proteína durante la fase G1 del ciclo celular (Buchkovich et al., 1989), para su unión a factores transcripcionales como E2F (Chellapan et al., 1991) y para su anclaje a estructuras nucleares (Mittnacht and Weinberg, 1991), requiriéndose secuencias adicionales del extremo carboxilo terminal ("bolsillo" grande) para suprimir la proliferación celular a través de su interacción con E2F (Hiebert et al., 1992) (Figura 2).

Se ha visto que en el dominio "bolsillo" A/B se encuentran la mayoría de las mutaciones detectadas en tumores humanos. A la región entre los dominios "bolsillo" se le denominó región espaciadora, y aunque no se le ha asignado una función de interacción con otras proteínas, se ha observado que es necesaria para una separación apropiada entre los dominios A y B (Hu et al., 1990).

Se ha localizado un dominio carboxilo terminal independiente, que no se sobrelapa con el "bolsillo" A/B, entre los aminoácidos 768-928, caracterizado por su interacción con la cinasa de tirosina c-Abl (Welch et al., 1995). La actividad de unión a DNA es intrínseca de la región carboxilo terminal, la cual comprende alrededor de 300 aa (Wang et al., 1995) y contiene una señal de localización nuclear bipartita (Zackenhaus et al., 1993; Figura 2).



Se han identificado en pRb distintos dominios importantes para su actividad biológica. La digestión proteolítica parcial de la proteína recombinante de humano reveló la existencia de cuatro dominios resistentes a proteasas. Consistente con estos resultados, el análisis por simulación de la secuencia proteica de pRb predice que su estructura terciaria debería contener diversos dominios globulares y una región hidrofílica. Dos de los dominios globulares son los dominios A y B antes mencionados.



**Figura 2. Estructura esquemática de la proteína Rb**

Se muestran los dominios estructurales de pRb involucrados en su unión a otras proteínas, tanto de origen celular como viral, conocidos como el "bolsillo" A/B, el cual se compone de dos bloques no contiguos de aminoácidos, el dominio A (aa 379-572) y el dominio B (aa 642-772). Aparte de las proteínas que se unen en el "bolsillo" A/B, existen otras que lo hacen en las regiones amino y carboxilo terminales, como la cinasa de pRb y la cinasa de tirosina c-Abl. Figura tomada y modificada de Herwing and Strauss, 1997.

A pesar de que a los dos dominios globulares en el extremo amino terminal no se les conoce actividad biológica hasta la fecha, se sugiere que pueden ser necesarios para la oligomerización de la proteína (Hensey et al., 1994).

La estructura cristalina del dominio "bolsillo" A/B ha revelado la presencia de dos agrupamientos de residuos de superficie. Uno es el sitio de unión al motivo LXCXE, localizado dentro del dominio B y que consiste de un surco hidrofóbico bordeado por una serie de aminoácidos cargados positivamente. El otro está localizado en la interfase, entre los dominios A y B (Lee, J.-O. et al., 1998). pRb tiene la capacidad de formar estructuras complejas, de unirse a proteínas de la matriz nuclear (Mancini et al., 1994) y a proteínas nucleares como c-myc y N-myc (Rustgi et al., 1991).



### 1.9 Fosforilación de pRb dependiente del ciclo celular

Se sabía que pRb es una fosfoproteína nuclear (Lee et al., 1987b) y que anticuerpos monoclonales contra ratón Inmuprecipitaban específicamente una proteína de 110-114 Kda. En un SDS-PAGE se observó que en esta serie de bandas (110-114 kDa), las que migraban más lentamente podían convertirse a las que lo hacían más rápidamente por digestión con fosfatasa ácida (Ludlow et al., 1989) y, que la unión de pRb con el antígeno T, una proteína transformante de SV40, se daba exclusivamente con la forma menos fosforilada de pRb. Posteriormente, en estudios cuyo propósito era dilucidar la función biológica de la proteína, se hizo un intento de correlacionar los cambios en el estado de fosforilación de pRb con el crecimiento celular y la diferenciación. Lo que se observó fue que células en reposo o detenidas en su crecimiento, tenían a pRb en una forma hipofosforilada, contrario a lo que sucedía al estado de pRb en células en proliferación, en donde la proteína se encontraba hiperfosforilada. Cuando linfocitos primarios de humano se inducían a proliferar pRb se desfosforilaba completamente, lo que sugería inhibición de la fosforilación de la proteína (Chen et al., 1989).

También se observó que el estado de fosforilación de pRb oscila regularmente durante el ciclo celular, presentando formas hipofosforiladas en G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub>, mientras que las formas hiperfosforiladas se detectaron en S, G<sub>2</sub> y M. Además, cuando las células se inducían a proliferar, pRb se desfosforilaba completamente (DeCaprio et al., 1992).

El análisis de fosfopéptidos reveló que pRb se fosforila en residuos de serina y treonina en al menos tres etapas distintas: a la mitad de G<sub>1</sub>, en S y cerca de la transición G<sub>2</sub>/M (DeCaprio et al., 1992). Se supuso entonces que la función biológica primaria de la forma hipofosforilada de pRb era la de mediar la inhibición del crecimiento en G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> y que la fosforilación de pRb a la mitad de G<sub>1</sub> detendría su función como supresor del crecimiento. La fosforilación de pRb permitiría, entonces, el progreso a través de la fase G<sub>1</sub> y el compromiso de la célula a sintetizar DNA.

El análisis bioquímico de los sitios de fosforilación de pRb generó los primeros indicios acerca de los agentes responsables de su fosforilación, modificación crítica para las funciones de la proteína. Por análisis de fosfopéptidos se demostró que muchos de los sitios de pRb que eran fosforilados en la célula viviente podían también ser modificados *in vitro* por incubación de la proteína con ciclinas y cdc2 o p34<sup>cdc2</sup>; cdc2 es una cinasa de treonina/serina indispensable para la inducción de la síntesis de DNA y para la entrada de la célula a mitosis y que en células de mamífero forma el componente activo del factor promotor de la fase M, MPF, en asociación con una subunidad reguladora llamada la ciclina B (Maclachlan et al., 1995). Los sitios que fueron fosforilados por p34 tenían una secuencia que es típica para los complejos ciclina B-cdc2 (DeCaprio et al., 1992).

En experimentos de cotransfección de genes de ciclinas y de pRb en células de osteosarcoma, SAOS-2, las cuales carecen de pRb funcional se mostró que la expresión ectópica de ciclinas A y E podían superar la detención de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular llevada a cabo por pRb. Estos experimentos demostraron que pRb se hiperfosforilaba en células que expresaban ciclinas A y E. Los complejos de cinasas con ciclinas A y E eran capaces de hiperfosforilar a pRb e inactivarlo (Hinds et al., 1992).

Por otro lado, en experimentos de coexpresión de ciclinas en células SAOS-2 y en fibroblastos de pulmón humano, se demostró que las ciclinas D1 y D3 formaban complejos con pRb que se parecían a los que ésta proteína formaba con varias oncoproteínas virales y eran disociados por la oncoproteína E1A de adenovirus y péptidos derivados de la misma. Estas ciclinas contenían una secuencia corta de aminoácidos similar a la que se encontraba en las oncoproteínas virales para su interacción con pRb, el motivo LXCXE, cuya alteración evitaba la formación del complejo ciclina D-pRb. De estos experimentos se podía concluir que las ciclinas D1 y D3 interactuaban con pRb de una



manera distinta a como lo hacían las ciclinas A y E, y que la actividad de la ciclina D podía estar regulada por su asociación con pRb (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993).

Ahora se sabe que las enzimas responsables de la fosforilación de pRb pertenecen a la familia de las CDKs (Lees et al., 1991). Se han encontrado 15 sitios consenso de fosforilación (S/T) en la secuencia primaria de pRb que se encuentran conservados en otras especies de mamíferos, sin embargo, la identidad de la cinasa responsable de la fosforilación de pRb ha sido materia de debate por muchos años; se ha visto que diferentes tipos de complejos ciclina/CDK (p.e. ciclina D/CDK4-CDK6 o ciclina E/CDK 2) se activan cuando pRb se fosforila. Investigaciones recientes indican que, *in vitro*, los complejos ciclina D, ciclina E / CDKs fosforilan a pRb en diferentes sitios (Kitagawa et al., 1996; Zarkowska et al., 1997), pero ninguno de ellos es capaz de fosforilar la totalidad de los sitios susceptibles de fosforilación.

La regulación por fosforilación de la actividad de pRb se completa por la desfosforilación. Varias líneas de evidencia sugieren la participación de las enzimas de la familia de fosfatasas de proteínas de tipo 1 (PP1) como los responsables de la desfosforilación de pRb: la subunidad catalítica de PP1 se aisló en virtud de su capacidad para interactuar con pRb en un ensayo de doble híbrido y posteriormente se demostró su asociación con pRb en células humanas (Mitnatch, 1998). Además, en células pRb (+) y pRb (-) sincronizadas en G1, en donde se electroporó la proteína PP1, se encontró que los niveles de la misma se incrementaron de 6 a 16 veces y permanecieron estables por al menos 48 h. En célula pRb (+), la proteína mutante PP1 T320A provocó la detención del ciclo celular en la fase G1 tardía, lo cual se asoció con la hipofosforilación de pRb. En células pRb (-) la fosfatasa no provocó un cambio en el avance del ciclo celular, lo que sugiere la necesidad de pRb funcional para inducir la detención del crecimiento (Berndt et al., 1997).

### 1.10 Unión de E2F a pRb

Otro de los avances importantes en tratar de dilucidar la función de pRb como supresor de tumores, supresor del crecimiento o inhibidor del ciclo celular, fue la observación de que el factor transcripcional E2F forma complejos con la forma hipofosforilada de pRb. Algunas de las evidencias que sugirieron que la interacción de pRb con E2F era funcionalmente significativa respecto a la acción de pRb como supresor de tumores fueron: i) no se encontraron complejos E2F-pRb en células que producían pRb no funcional, pero sí se encontró E2F libre; ii) el complejo E2F-pRb se disoció en presencia de oncoproteínas virales como el antígeno T de SV40, y E1A y E7 de adenovirus, iii) la inactivación de la función de pRb en células de carcinoma cervical humano por la proteína E7 de HPV coincidió con la pérdida de interacción E2F-pRb, iv) la capacidad de pRb para reconstituir el complejo E2F-pRb, en un ensayo *in vitro*, dependía de las secuencias de pRb que se requerían para que suprimiera el crecimiento celular (Nevins, 1992). Por lo tanto, la inactivación de la función de pRb se asociaba con una pérdida de la interacción con E2F, lo cual sugirió fuertemente que E2F era una proteína blanco relevante para la función de pRb.

La identificación de E2F como una proteína blanco de pRb fue un paso importante en la elucidación del mecanismo de acción de pRb como regulador del crecimiento celular.

Por otro lado, se sabía que el factor transcripcional E2F está involucrado en la transcripción de genes en los cuales reconoce el elemento TTTCCGCGC en sus promotores, como son los genes *DHFR* (dihidrofolato reductasa), *TK* (timidina cinasa), el que codifica la DNA polimerasa  $\alpha$ , *c-myb*, *c-myc*, *cdc2*, *N-myc* y el de la proteína E2 de adenovirus. Muchos de estos genes se activan en la fase G1 tardía y codifican proteínas que se requieren para la síntesis de DNA, por ejemplo, la DHFR, la timidina cinasa, la timidilato sintetasa y la DNA polimerasa  $\alpha$  (Nevins, 1992).



Hasta aquí se ha detallado el papel de pRb en el progreso del ciclo celular, pero esta proteína también juega un papel importante en la diferenciación celular y en la apoptosis.

### **1.11 El papel de pRb en la diferenciación celular**

La diferenciación terminal está caracterizada por la salida permanente del ciclo celular y va acompañada a nivel molecular por la modulación de diferentes genes relevantes para la expresión de un fenotipo diferenciado. La primera evidencia para un papel de pRb en diferenciación provino de experimentos hechos con ratones "knockout" (*Rb*<sup>-/-</sup>), los cuales murieron *in utero* debido a anomalías en eritropoyesis y en el desarrollo neural (Lee et al., 1992). La estrecha correlación en el tiempo entre la muerte de un ratón "knockout" (*Rb*<sup>-/-</sup>) y el nivel de pRb tejido específico en el ratón normal apuntaron hacia un papel esencial de pRb en el desarrollo de ciertos tejidos. El papel activo de pRb en la diferenciación ha sido elucidado en varias líneas celulares, en particular de origen mielóide y neuronal que son inducibles hacia la diferenciación. En todo sistema examinado un evento temprano en la diferenciación es la desfosforilación de pRb, la cual correlaciona con la detención del ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. La actividad de pRb es también regulada a nivel transcripcional, incrementándose durante la diferenciación. En células embrionarias de carcinoma se detectaron niveles bajos de mRNA, sin embargo, cuando estas células se diferenciaron en neuroectodermo mediante el tratamiento con ácido retinoico, hubo un incremento de 15 veces en la expresión del gen a nivel de transcrito (Slacks et al., 1993).

Asimismo, durante la diferenciación terminal de una línea celular de músculo esquelético de ratón, se incrementaron de manera dramática la expresión del gen *Rb* a nivel de mRNA y de proteína (Endo and Goto, 1992). En el mismo sentido, Coppola et al. (1990) mostraron que las cantidades del mRNA de *Rb* se elevaron durante la diferenciación de una línea celular de eritroleucemia en el ratón, así como en los mioblastos que son inducidos a diferenciarse en miotubos por privación de mitógenos.

Además, durante la diferenciación de células musculares, pRb se acumula en el núcleo y forma complejos con factores de transcripción miogénicos tales como Myo D y miogenina. Esta interacción evita la refosforilación de pRb y mantiene a la célula en un estado diferenciado, mientras que la inactivación de pRb revierte el fenotipo diferenciado y permite que la célula vuelva a entrar en el ciclo (Herwing and Strauss, 1997).

### **1.12 El papel de pRb en la apoptosis**

La homeostasis en el número de células se logra por el balance de células en estado proliferativo y de muerte. La regulación apropiada de una célula requiere una coordinación precisa entre los dos procesos. Además, la desregulación del progreso del ciclo celular es esencial para el inicio de la apoptosis (muerte celular genéticamente programada de una célula). Estudios recientes sugieren que pRb juega un papel regulatorio en el proceso apoptótico. Durante el inicio de la apoptosis, la forma hiperfosforilada de pRb (p120), se convierte a la forma hipofosforilada, lo cual se lleva a cabo por medio de la actividad de una fosfatasa específica de serina/treonina. Acompañada por la fragmentación internucleosomal de DNA, la forma hipofosforilada es hidrolizada por una proteasa que tiene las propiedades de la familia de las caspasas (proteasas específicas del proceso apoptótico). Durante la apoptosis inducida por tratamiento con el factor de necrosis tumoral y cicloheximida (TNF/CHX), el extremo carboxilo terminal de pRb (aminoácidos 883 a 887) se hidroliza por la actividad de una enzima parecida a la caspasa 3 que reconoce la



secuencia DEADG (Janicke et. al., 1996). En contraste, la forma hiperfosforilada permanece intacta durante la apoptosis. Estudios posteriores sugirieron que la forma hipofosforilada de pRb funciona como un inhibidor de la apoptosis. Por lo tanto, la regulación de las actividades proteolíticas sobre pRb y los niveles consecuentes de la proteína son importantes para la determinación del destino celular (Ping Dou and Bing, 1998).



## ANTECEDENTES

La regulación del ciclo celular en células vegetales por una ruta análoga a la del retinoblastoma había sido materia de especulación hasta hace algunos años, pues no se había identificado a ninguno de sus componentes. Los avances en el estudio de los reguladores de plantas de G1/S indican que una ruta similar a la de pRb de animales podría estar funcionando en regular el crecimiento de las plantas (Gutierrez, 1998).

### 2.1 La proteína del retinoblastoma en plantas

La primera evidencia que sugería la existencia de un homólogo en plantas a pRb de animales y por lo tanto una ruta análoga a la de pRb, surgió de la identificación en las ciclinas tipo D de *Arabidopsis* (Soni et al., 1995) y de alfalfa (Dahl et al., 1995) del motivo LXCXE. Esta secuencia corta está presente en las ciclinas D de humano, en oncoproteínas virales y se ha identificado como el elemento responsable de la unión con pRb (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993). Este hallazgo sugirió que la transición G1/S de plantas pudiera estar regulada por un mecanismo molecular similar al que interviene en las células animales.

Además, así como en virus animales se han identificado proteínas capaces de unir a pRb mediante el motivo LXCXE, en la proteína Rep A del virus del enanismo del trigo (WDV), un geminivirus, se identificó el motivo LICHE, capaz de unir a pRb humano (Xie et al., 1995).

Una propiedad crucial para la capacidad transformante de las proteínas oncogénicas codificadas por virus de DNA que infectan células animales, es que forman complejos estables con pRb y con los otros miembros de la familia "bolsillo" (p107 y p130). Los geminivirus son virus de plantas de DNA de cadena sencilla cuya replicación depende de las proteínas de la célula hospedera, a excepción de las proteínas Rep. El análisis de la proteína Rep A del virus del enanismo del trigo, WDV (de Wheat Dwarf Virus), reveló la presencia de un motivo LXCXE, específicamente de la secuencia LICHE, hacia la mitad del extremo carboxilo terminal de la proteína. Además, el residuo ácido E precede al motivo LICHE, característica común de las proteínas celulares y virales que interactúan con pRb. La proteína Rep A de WDV es capaz de formar complejos con p130, una proteína "bolsillo" a través del motivo LICHE, ya que mutaciones puntuales (C / G y E/ K) en este motivo eliminan dicha interacción (Xie et al., 1995).

Las evidencias moleculares de la existencia de proteínas tipo Rb en plantas la obtuvieron tres grupos de investigación, al aislar clonas de cDNA de maíz que codificaban una proteína con homología a pRb de humanos. A las clonas les asignaron los nombres de *ZmRB*, *ZmRb1*, *RRB1*, *RRB2a* y *RRB2b*, *Zm* por *Zea mays* y RRB por "related to RB" (Grafi et al., 1996; Xie et al., 1996; Ach et al., 1997a).



*ZmRB* se obtuvo a partir del sondeo de una biblioteca de cDNA de endospermo de maíz (Grafi et al., 1996) con la clona de cDNA 6CO2CO2, una secuencia tipo EST (Expressed Sequence Tagged) que previamente se había aislado en un sondeo de bibliotecas de cDNA de maíz. Esta secuencia se identificó parcialmente, por su similitud del 32%, como un homólogo a pRb de humano (Shen et al., 1994).

*ZmRb1* se aisló a partir del escrutinio de una biblioteca de cDNA de maíz con un oligonucleótido cuya secuencia se obtuvo del banco de datos de ESTs de maíz (Xie et al., 1996).

*RRB1*, *RRB2a* y *RRB2b* se obtuvieron por el sondeo de dos bibliotecas de cDNA de maíz, una de meristemos vegetativos y otra de espigas inmaduras, utilizando también la sonda 6CO2CO2 (Ach et al., 1997a).

## 2.2 Caracterización de las clonas de cDNA como secuencias que codifican una proteína homóloga a pRb de humano

Los resultados de los experimentos que permitieron caracterizar a las clonas de cDNA mencionadas anteriormente, como pertenecientes a una proteína con las propiedades estructurales y bioquímicas de la proteína de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb) de humano, son:

### 1) Propiedades estructurales

*ZmRb1* comparte una identidad de ~28-30% (~50% de similitud) con pRb de humano. Contiene segmentos homólogos a los subdominios A y B, que forman el "bolsillo" A/B, de pRb de humano. La homología varía entre 50 y 64%. Los subdominios están separados por una región espaciadora no conservada. Asimismo, contiene dominios amino y carboxilo terminales conservados.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *ZmRb1*, con pRb, p107, p130 (miembros de la familia de proteínas "bolsillo", a la que pertenece pRb) y con los homólogos a pRb de ratón, pollo y rana, mostraron que la homología está confinada, en primer término, a los dominios A y B, que forman el "bolsillo" A/B (Xie et al., 1996). *ZmRb1* incluye en su estructura un dominio rico en prolina en el extremo carboxilo terminal que comprende los residuos 561-577, una región que puede ser equivalente al dominio rico en prolina de pRb (Lee et al., 1987a).

Las secuencias de aminoácidos de *RRB1* y *RRB2* tienen una identidad de ~35% con pRb de humano en el dominio A y de ~25 % en el dominio B. *RRB1* presenta un dominio rico en leucina en el extremo amino terminal de la proteína, que se encuentra conservado en p107 y en p130 de humano y en el homólogo a pRb de *Drosophila*, RBF. A pesar de que la función de este dominio se desconoce, su similitud entre plantas y animales sugiere fuertemente que puede ser funcionalmente significativo (Ach et al., 1997a).

*ZmRb1* contiene 16 sitios consenso de fosforilación (S/TP) para cinasas dependientes de ciclina, destacando los que se encuentran agrupados en el extremo amino del subdominio A y en el extremo carboxilo terminal, ya que se ha visto que estos sitios se fosforilan de una manera dependiente del ciclo celular en células humanas (Buchkovich et al., 1989). De la misma manera se pueden reconocer en la secuencia de las proteínas *RRB1* y *RRB2* varios sitios de fosforilación (S/TP), abundantes hacia el extremo carboxilo terminal y ubicados en una posición equivalente a la que se encuentran en las proteínas pRb, p107 y p130 (Ach et al., 1997a).

*ZmRb1* y las *RRBs* (1,2a y 2b) contienen un residuo de cisteína en una posición equivalente a la Cys706 de humano, residuo crítico, pues cuando se muta da como resultado la pérdida de función de la proteína en células de humano (Kaye et al., 1990).

En la región espaciadora de las proteínas *ZmRb1* y *RRBs* (1,2a y 2b) se encuentra una señal bipartita potencial para la localización nuclear (NLS; Nuclear Localization Signal) similar a la



que se encuentra en pRb de células de humano (Xie et al., 1996; Ach et al., 1997a; Zacksenhaus et al., 1993).

## 2) Localización subcelular y tamaño

RRB1 es una proteína que se localiza exclusivamente en el núcleo, a semejanza de pRb. La localización de RRB1 se la confiere posiblemente la señal bipartita de localización nuclear antes mencionada.

Por ensayos de Western Blot en los que se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido contra la proteína de fusión GST-ZmRB, se detectaron bandas de proteínas de 130, 110 y un doblete entre 90 y 100 kDa en extracto proteico del endospermo en desarrollo de maíz. Se observó que la banda de 110 kDa interactuaba con Rep A y E7, pero no con la banda de 130 kDa ni con el doblete, por lo que al parecer, es la banda de 110 kDa la que corresponde al producto génico de *ZmRB* (Grafi et al., 1996).

A su vez, un anticuerpo policlonal dirigido contra la región carboxilo (aa 440-683) de ZmRb1 reconoció en extractos proteicos de hoja y en cultivos celulares, ambos de maíz, una banda de 110 kDa, de la cual se concluyó representa ZmRb1 con un dominio "bolsillo" activo, por su interacción con la proteína de fusión GST-E7 (Huntley et al., 1998).

## 3) Propiedades bioquímicas

### a) Interacción con oncoproteínas de virus de DNA

Una característica conspicua de pRb es su capacidad para interactuar con oncoproteínas virales, vía un motivo corto conservado, el motivo LXCXE.

A semejanza de lo que ocurre con pRb de humano, se observó la interacción específica de ZmRB con la oncoproteína E7 de papilomavirus, que depende del motivo LXCXE de unión a pRb, pues cuando se utilizó en los ensayos una mutante de E7 que carecía de este motivo, la interacción no fue evidente (Grafi et al., 1996).

De la misma manera, en ensayos de doble híbrido en levadura, RRB1 se unió al antígeno T del virus SV40, así como a un péptido de 10 aminoácidos derivado de la secuencia del antígeno T y que contenía el motivo LXCXE, lo cual indicaba que las secuencias necesarias para interactuar con este motivo se han conservado entre las proteínas de maíz y de humano (Ach et al., 1997a).

### b) Interacción con ciclinas de plantas tipo D y con E2F

Mediante ensayos de interacción de proteínas denominados de "arrastre", que consisten en incubar una proteína de fusión con GST, con extractos proteicos totales o con proteínas traducidas *in vitro*, pasándolas después a través de una columna de glutatión-agarosa y eluyendo posteriormente con un amortiguador a las proteínas unidas a la resina y, en consecuencia, a las que hubieran interactuado con éstas, se observó una interacción fuerte entre las ciclinas tipo D de *A. thaliana* (CycD1, CycD2 y CycD3) y GST-ZmRb1. La interacción depende en gran medida, tanto de un motivo LXCXE en las ciclinas, como de un dominio "bolsillo" en pRb, intactos (Huntley et al., 1998).

Por ensayos de doble híbrido se observó una interacción fuerte entre RRB1 y la mitad amino terminal de CycD3, la cual contiene el motivo LXCXE. En el mismo ensayo se encontró que la ciclina *cyc1At* de *Arabidopsis*, la cual se expresa predominantemente en la fase G2 del ciclo celular pero que carece del motivo LXCXE, interactuó muy débilmente con RRB1. Estos resultados en conjunto, indicaron que la formación de complejos ciclina tipo D-proteínas tipo pRb están conservadas en plantas y animales (Huntley et al., 1998).

Los resultados que se han obtenido con relación a la interacción del homólogo a pRb de maíz con E2F son contradictorios de acuerdo al autor, pues mientras que con RRB1 no se observó la



formación de complejos con E2F por experimentos de doble híbrido, con ZmRb1 mediante el mismo tipo de ensayos sí se observó y se demostró que depende de un dominio "bolsillo" intacto en ZmRb1. Además, ZmRb1 es capaz de inhibir la capacidad como activador transcripcional de E2F (Huntley et al., 1998). Los resultados anteriores son reforzados por la clonación molecular de un cDNA de trigo, homólogo a E2F humano (Ramírez-Parra et al., 1999).

#### c) Interacción con otras proteínas

El estado de acetilación de histonas se ha propuesto como un mecanismo regulador de la compactación de la cromatina; mientras que la acetilación de histonas debilita su interacción con el DNA produciendo una estructura de cromatina más dinámica, la desacetilación conduce a una conformación reprimida de la cromatina y por lo tanto, a un acceso restringido de los factores transcripcionales a sus sitios de unión en el DNA. Las desacetilasas de histonas de animales están presentes en un complejo de múltiples subunidades, dos de las cuales, RbAp48 y RbAp46, han sido identificadas como factores celulares de unión a pRb. Por lo tanto, la represión transcripcional por pRb podría involucrar desacetilación de histonas (Brehm et al., 1999).

En plantas, específicamente en tomate y *Arabidopsis* se identificaron proteínas homólogas a RbAp46 y a RbAp48. A las proteínas se les denominó LeMSI1, pues también tienen homología con las proteínas MSI1 de levadura, homólogas a RbAp46 y RbAp48.

Se encontró además, que LeMSI 1 se une a pRb y a la proteína RRB1 de maíz *in vitro*, indicando por lo tanto, que la capacidad de interacción entre estas proteínas se ha conservado en las plantas y en los animales (Ach et al., 1997b).

#### d) Fosforilación

Utilizando un anticuerpo monoclonal obtenido contra la proteína de fusión GST-ZmRB en ensayos de inmunoprecipitación y Western Blot, se examinó el estado de fosforilación de ZmRB durante el desarrollo del endospermo de maíz y se detectaron cambios en su estado y nivel de fosforilación. Además, se observó la fosforilación *in vitro* de ZmRB por una cinasa de fase S de células de endospermo en endoduplicación (Grafi et al., 1996).

Por otro lado, en ensayos de actividad de cinasa se observó que la proteína expresada ZmRb1 se fosforila por los complejos *cycD/CDK4*, *cycE/CDK2* y *cycA/CDK2* de humano, que también fosforilan a pRb de mamíferos (Huntley et al., 1998).

#### e) Papel de la proteína en el crecimiento vegetativo normal y en el desarrollo de las plantas

A la vez que se caracterizan los cDNAs y las proteínas de retinoblastoma en plantas, se han llevado a cabo experimentos que tratan de contestar las preguntas sobre la función de estas proteínas durante el crecimiento y desarrollo en células vegetales. El primer trabajo que abordó esta pregunta se centró en el desarrollo de la hoja de maíz, en el que se da un proceso de diferenciación celular de tal manera que en la base de la hoja la división celular es alta, mientras que ocurre una diferenciación parcial progresiva a medida que se avanza a lo largo de la hoja, hasta la punta (Huntley et al., 1998).

Mediante ensayos por Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra la región carboxilo de ZmRb1 (aa 440-683), se observó que una banda de 110 kDa estuvo ausente o presente de manera muy débil en el tejido basal en proliferación, mientras que en tejido más diferenciado, cerca de la punta de la hoja, mostró niveles altos (Huntley et al., 1998). Estos resultados sugieren que, niveles altos de la forma de 110 kDa de ZmRb1 se asocian con la salida de la división celular y el inicio de la diferenciación en la hoja de maíz.



La endoduplicación es un proceso que da como resultado una duplicación endonuclear del genoma, que conduce a la producción de cromosomas con 2<sup>n</sup> cromátidas y se caracteriza por la inhibición de la mitosis y la inducción constitutiva de la síntesis de DNA que parece ser esencial en el desarrollo del endospermo de semillas. En el endospermo de maíz la endoduplicación inicia de 10 a 12 días después de la polinización e involucra un incremento sustancial en el nivel y actividad de cinasas dependientes de ciclina, de fase S (Grafi et al., 1995). Como se indicó anteriormente, en células de endospermo de maíz en endoduplicación se observó la fosforilación *in vitro* de ZmRB por una cinasa de fase S.

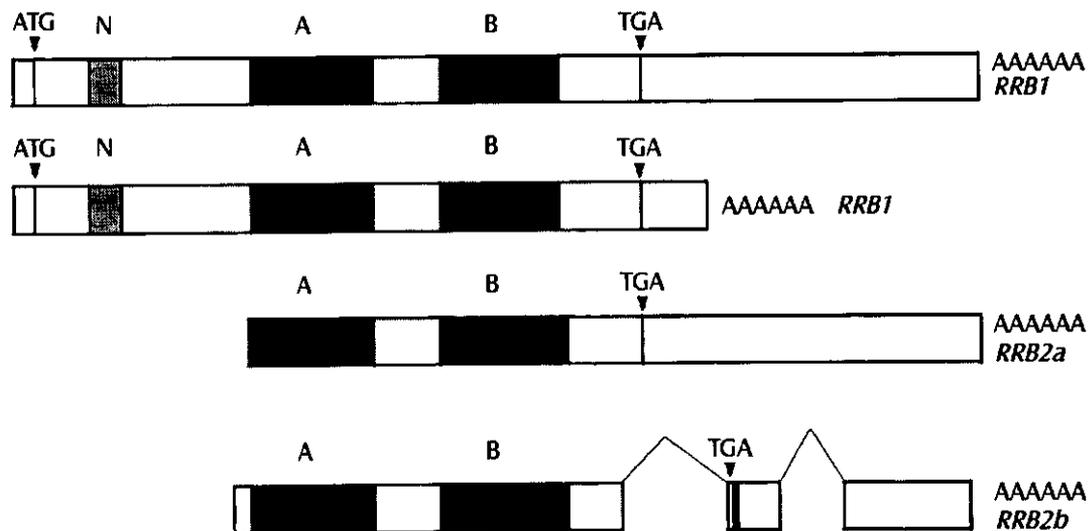
### 2.3 Los cDNAs tipo *Rb* de maíz

Los cDNAs tipo *Rb* de maíz que han sido clonados por los diferentes grupos de investigación tienen tamaños diferentes como se indica en la Tabla 1 y en la Figura 3. El cDNA *ZmRB* es de 1.8 kpb (Grafi et al., 1996), *ZmRb1* mide 3.747 kpb (Xie et al., 1996) y Ach et al. (1997a) encontraron dos cDNAs a los que llamaron *RRB1*, uno de 4.367 kpb y el otro de 2.977 kpb, este último es más pequeño que el primero debido al uso de sitios alternos de poliadenilación; asimismo, aislaron dos clones de cDNA parciales a las que denominaron *RRB2a* y *RRB2b*, de 2.945 kpb y 2.538 kpb respectivamente. *RRB2b* se origina por un evento de corte de intrones y empalme de exones alternativo en dos regiones del transcrito de *RRB2a*; uno de los eventos ocurre dentro de la región codificante, lo que da como resultado dos proteínas con diferentes extremos carboxilo terminales. *RRB2a* y *RRB2b* parecen ser clones parciales porque carecen del dominio amino terminal presente en *RRB1*. Asimismo, el cDNA *ZmRb1* no presenta parte de la región amino terminal que sí se encuentra en los cDNAs *RRB1* (Xie et al., 1996; Ach et al., 1997a).



cDNA	Kpb	Referencia
<i>ZmRB</i>	1.8	Grafi et al., 1996.
<i>ZmRb1</i>	3.747	Xie et al., 1996.
<i>RRB1</i>	4.367, 2.977	Ach et al., 1997a.
<i>RRB2a</i>	2.945	Ach et al., 1997a.
<i>RRB2b</i>	2.538	Ach et al., 1997a.

Tabla 1. Tamaño de los diferentes cDNAs de maíz

Fig. 3 Esquema de las estructuras de los cDNAs *RRB*

Esquema de los dos cDNAs *RRB1* y de los dos cDNAs parciales, *RRB2a* y *RRB2b*. Se indican los "bolsillo" A y B, el extremo amino terminal en los *RRB1*, así como los codones de inicio y de terminación. Figura tomada de Ach et al., 1997a.



Los cDNAs *RRB1* contienen un marco de lectura abierto capaz de codificar una proteína de 866 aa, con un tamaño de 96 kDa.

El cDNA *ZmRb1* contiene un solo marco abierto de lectura, suficiente para codificar una proteína, ZmRb1, de 683 aa, con un tamaño de 75.247 kDa.

El cDNA *ZmRb1* parece contener la región codificante completa debido a que la secuencia alrededor del primer codón de metionina mostró un buen consenso como sitio de inicio de la traducción. Además, para confirmar esta predicción se amplificó el extremo 5' del mRNA por RACE-PCR (Xie et al., 1996) usando un oligonucleótido derivado de una región cercana al codón de inicio ATG putativo, lo cual produjo un fragmento de DNA de ~150 pb.

Con base en los datos anteriores se ha propuesto la existencia de más de un gen tipo *Rb* en el genoma de maíz: el que daría origen al transcrito, y consecuentemente, a la proteína ZmRb1, el que codificaría la proteína RRB1, y aquél a partir del cual se derivarían los transcritos y las proteínas RRB2s.

En este sentido, se tienen datos discrepantes en cuanto al número de genes tipo *Rb* de maíz, ya que mientras algunos investigadores sugieren la existencia de un solo un gen (Grafi et al., 1996), otros, por análisis de Southern blot de DNA genómico de maíz con una sonda que hibridaba tanto a *RRB1* como a *RRB2*, bajo condiciones astringentes, y en el que detectaron de una a tres bandas de hibridación en varias digestiones, proponen que *RRB1* y *RRB2* pertenecen a una familia multigénica (Ach et al., 1997a). En ningún caso se muestran los resultados del Southern blot de DNA genómico.

Además, debido a que entre las proteínas RRB1 y RRB2 existe una identidad de 92% a lo largo de una región de 611 aminoácidos, secuencia que se conoce de RRB2, y que entre RRB1 y ZmRb1 la identidad es del 99%, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, se refuerza la posibilidad de que las clonas de cDNAs pertenezcan a genes tipo *Rb* diferentes, aunque muy relacionados. Otra posibilidad es de que pertenezcan a un solo gen, pero que entre ellos no tengan un 100% de identidad debido al alto nivel de polimorfismo que ocurre en el maíz (Henry and Damerval, 1997; Pedersen, K. et. al., 1982; Bhatramakki and Kriz, 1996), o bien, a artefactos producto de los procesos de clonación y secuenciación.

Para reforzar la suposición de la existencia de más de un gen tipo *Rb* de maíz, se tienen los resultados del análisis de la expresión del gen a nivel de mRNA.

En análisis por Northern blot, utilizando mRNA de meristemas de maíz y de hoja madura, y como sonda una secuencia derivada del cDNA *ZmRb1*, se detectó la presencia de dos mensajes, uno de ~2.7 y otro de ~3.7 kb. El mensaje de menor tamaño tiene la capacidad de codificar el marco de lectura abierto completo de la proteína ZmRb1 (Xie et al., 1996). La existencia del otro mensaje no fue clara. Una explicación a la presencia de este mensaje sería la posibilidad de que perteneciera a otro gen tipo *Rb* de maíz.

Queda por esclarecer la existencia de uno o más genes tipo *Rb* de maíz.

## 2.4 Una clona genómica tipo *Rb* de maíz

Una aproximación para esclarecer preguntas pendientes acerca del número de genes tipo *Rb*, posibles procesamientos de los mismos, así como su tamaño, es el aislamiento y donación de éstos. En un proyecto lateral en el laboratorio encaminado a caracterizar la región promotora de los genes tipo *Rb* de maíz, se aislaron dos clonas mediante el sondeo de un banco de DNA genómico de plántulas etioladas de la línea de maíz Missouri 17, con un fragmento de DNA cuya secuencia se ubica hacia el extremo 5' del cDNA *ZmRb1*\*. Una de las clonas, a la que se denominó

\* La sonda fue proporcionada por el Dr. Crisanto Gutiérrez del Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa», de la Universidad Autónoma de Madrid.



$\lambda$ FixII8.1.4.2, se secuenció parcialmente y se encontró una alta homología de una parte de su secuencia, correspondiente a un exón, con la de los cDNAs *RRB1* y *ZmRb1*, por lo que se pudo afirmar que correspondía a una clona genómica que contiene un gen que codifica una proteína de maíz tipo Rb, o RBR, como se les denominó posteriormente.

Por otro lado, con el propósito de profundizar en el conocimiento del papel que el gen tipo *Rb* contenido en la clona  $\lambda$ FixII8.1.4.2, pudiera tener en diferentes estados de desarrollo de la planta, se propuso estudiar su expresión en distintos tejidos de maíz: en hoja, tallo y raíz de plántulas y en el eje embrionario y embrión de la semilla seca.

Se podía contar con un anticuerpo obtenido contra el dominio "bolsillo" A/B de la proteína *ZmRb1*, por lo que se propuso estudiar el nivel de proteínas RBR en los mismos tejidos en los que se proponía estudiar la expresión del gen a nivel de RNA mensajero.



## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1)** Caracterizar la estructura del gen contenido en la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2.
- 2)** Mapéar el sitio de inicio de la transcripción en el gen contenido en la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 como parte de la caracterización del mismo.
- 3)** Determinar si el gen contenido en la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 pertenece a una familia multigénica.
- 4)** Estudiar la expresión del gen a nivel de RNA mensajero y la presencia de proteínas tipo Rb, o RBR, en diferentes tejidos de maíz, tales como la hoja, el tallo y la raíz de plántulas de dos semanas de edad, así como en el eje embrionario y en el embrión de la semilla seca.



## HIPÓTESIS

**D**ado que hasta la fecha se han aislado varios cDNAs de maíz correspondientes a proteínas RBR, pero no los genes que las codifican, el análisis de clonas que contengan genes *RBR* de maíz permitirán un estudio más detallado de la estructura de los mismos, la localización de regiones reguladoras, regiones no traducidas así como de su expresión.

De igual manera, el conocimiento de su secuencia permitirá determinar con mayor exactitud de lo que hasta la fecha se ha hecho, si en el genoma de maíz existe más de un gen que codifique proteínas RBR.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Material

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) variedad Chalqueño para la extracción de ejes embrionarios y para la obtención de plántulas.

Para la extracción de DNA genómico se utilizaron los ejes embrionarios disectados manualmente de la semilla seca.

Las extracciones de RNA total se hicieron del eje embrionario y el embrión de la semilla seca; del tallo, la raíz y la hoja de "plántulas de 2 semanas de edad".

Las extracciones de proteína se hicieron a partir del eje embrionario de la semilla seca; del tallo, la raíz y la hoja tres de "plántulas de 2 semanas de edad".

Las plántulas se obtuvieron de la siguiente manera:

Se desinfectaron 25 semillas con una solución de hipoclorito de sodio, diluida con agua en una proporción de 1:37, durante 2 minutos, y se lavaron exhaustivamente con agua estéril hasta eliminar completamente el olor a hipoclorito; se colocaron en una caja Petri de 14 cm de diámetro sobre papel filtro estéril y se pusieron a germinar con 12 ml de agua, a 29°C.

Al tercer día las semillas germinadas se colocaron en macetas que contenían tierra y agrolita en una proporción de 1:1.

Las plántulas se utilizaron, para las extracciones de proteínas y de RNA total, 15 días después de que las semillas germinadas se colocaran en las macetas.

A estas plántulas se les denominó "plántulas de dos semanas de edad".

### 3.2 Determinación del número de genes RBR de maíz por Southern blot

#### 3.2.1 Extracción de DNA genómico

El protocolo que se utilizó, con algunas modificaciones, para la extracción de DNA genómico es el que se describe en (De la Porta, 1983).

La extracción se hizo a partir de ejes embrionarios de semilla seca de maíz.

- 1) Los ejes (0.15 g) se desinfectaron lavándolos durante 2 minutos con una solución de 1 volumen de NaClO por 36 volúmenes de agua, y se enjuagaron con agua desionizada estéril hasta eliminar completamente el olor a hipoclorito.
- 2) Los ejes se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se molieron en un mortero hasta obtener un polvo muy fino, el cual se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 1.0 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 50mM pH 8.0, NaCl 0.5 M), 1.5 µl de β-



mercaptoetanol y 60  $\mu$ l de SDS al 20%. El tubo se agitó hasta tener el polvo bien suspendido en el amortiguador.

- 3) La suspensión se incubó por 10 min a 65°C, se le agregaron 400  $\mu$ l de acetato de potasio 3M (pH 5.0) y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se centrifugó durante 20 min a 14,000g en un rotor de ángulo fijo (centrifuga MR1812, rotor 100.4, Jouan).
- 4) El sobrenadante se decantó en un tubo Eppendorf y se le agregó un volumen igual de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a -20°C por lo menos 30 min.
- 5) El precipitado blanco que se formó se colectó con la punta de una pipeta Pasteur doblada en forma de gancho y se lavó varias veces con etanol al 70 %.
- 6) El precipitado se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 500  $\mu$ l de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 1.0 mM, pH 8.0).

### 3.2.2 Cuantificación del DNA

Para evaluar la calidad y cantidad del DNA genómico se corrió una alícuota en un gel de agarosa al 0.7% en TAE 1X ( Trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2.0 mM, pH 8.0), al que se incorporaron 12.5  $\mu$ g de RNAasa libre de DNAasa (Boehringer) y bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml. La cuantificación se hizo por comparación de la Intensidad de la fluorescencia de la alícuota de DNA genómico, al colocar el gel teñido con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV ( UV Transilluminator UVTM-10, Hoefer), con la fluorescencia generada por los marcadores de masa ( Low DNA Mass™ ladder, GIBCO).

### 3.2.3 Digestión del DNA con enzimas de restricción

A un tubo Eppendorf de 1.5 ml se agregaron 40  $\mu$ g de DNA genómico, 75 U de enzima de restricción (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III o *Sst*I, GIBCO), 7.5  $\mu$ l de amortiguador 3 (10X) (GIBCO) en el caso de las dos primeras enzimas ó 7.5  $\mu$ l de amortiguador 2 (1X) (GIBCO) para las dos últimas, y H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 75  $\mu$ l, y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Se tomó una alícuota (~5  $\mu$ g) de cada una de las reacciones de digestión y se corrió en un gel de agarosa al 0.7 % , teñido con bromuro de etidio.

### 3.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa y el montaje de la transferencia del DNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo indicado en (Ausubel et al.,1992).

A los 75  $\mu$ l de cada una de las reacciones de digestión se les agregaron 10  $\mu$ l de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25 %, glicerol al 50%, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2.0 mM, pH 8.0), y se cargaron 35  $\mu$ l, por duplicado, en un gel de agarosa al 0.8 %, en TAE 1X, al que se incorporaron, antes de que solidificara, 65  $\mu$ g de RNAasa libre de DNAasa (Boehringer) y bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml. Como amortiguador de corrida se utilizó TAE 1X. El gel se corrió a 24 V durante toda la noche, a temperatura ambiente y se sometió al siguiente tratamiento:

- 1) incubación en HCl 0.2 N por 10 min,
- 2) tres lavados con agua desionizada por 5 min cada vez,
- 3) incubación en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) por 30 min,
- 4) un lavado con agua desionizada durante 10 min,
- 5) incubación en solución de neutralización (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, pH 8.0) durante 30 min.

El DNA se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond™ -N+, Amersham) como se muestra en la Figura 4.

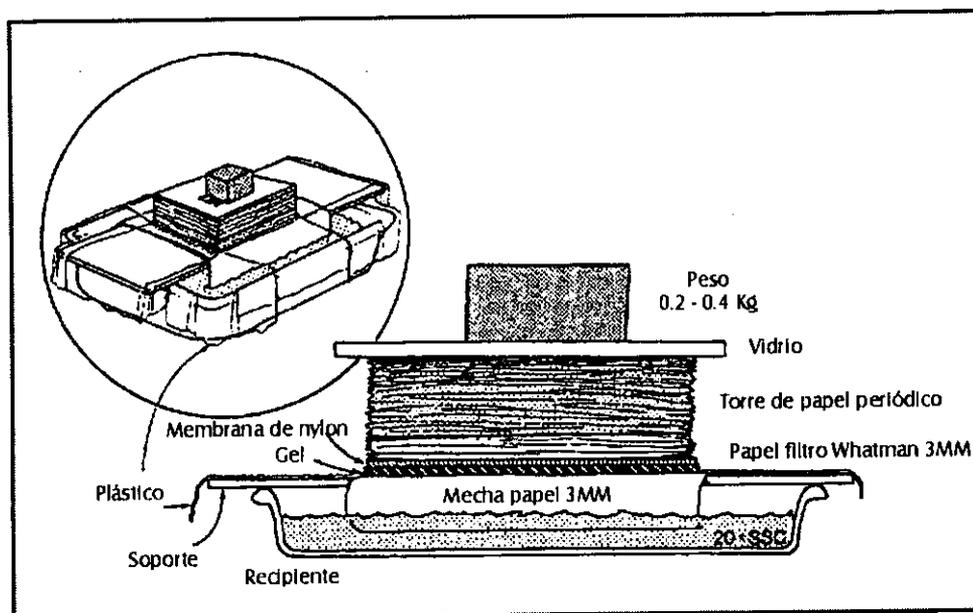


Figura 4. Esquema del montaje de la transferencia de DNA  
Esquema tomado y modificado de Ausubel et al., 1992.

La transferencia duró 24 h, después de las cuales se desmontó y la membrana se lavó con [SSC 2X (NaCl 0.3M, Na citrato.2H<sub>2</sub>O 0.03 M)] durante 5 min, con el propósito de eliminar los restos de agarosa, y se secó a temperatura ambiente. El DNA se entrecruzó covalentemente a la membrana con luz UV de 254 nm, a 0.12 J/cm<sup>2</sup> (XL-1000 UV Crosslinker SPECTROLINKER™, Spectronics Corp.), durante 90 s.

### 3.2.5 Obtención y marcaje de la sonda

Se preparó una membrana y se hibridó con un fragmento *Eco*RI-*Hind*III de 1534 pb, obtenido por la digestión con *Eco*RI de una subclona de la clona genómica  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 (RB1500). El producto de la digestión con *Eco*RI se corrió en un gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X; el fragmento de interés se separó del gel, se extrajo de él con un equipo de reactivos para purificación de DNA a partir de geles de agarosa (GENECLEAN II, BIO 101) y se marcó radioactivamente utilizando el protocolo indicado por el fabricante para el sistema de marcaje de DNA con oligonucleótidos aleatorios como cebadores (Random Primers DNA Labeling System, GIBCO):

- 1) En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se colocaron 25 ng de DNA, se calentaron a 100°C por 5 min e inmediatamente se colocaron en hielo.
- 2) Al DNA desnaturalizado se le agregaron 6  $\mu$ l de una mezcla de dNTPs (dATP, dGTP y dTTP 0.5 mM c/u), 15  $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 48  $\mu$ l y 2  $\mu$ l del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (3U/ $\mu$ l).
- 3) La mezcla de reacción se incubó durante 3 h a 25°C.
- 4) Para detener la reacción se agregaron 5  $\mu$ l de solución de terminación (EDTA 0.5 M, pH 8.0) y 145  $\mu$ l de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 1 mM, pH 8.0).



- 5) La sonda marcada se filtró a través de una columna de Sephadex G-50 para eliminar el [ $\alpha$ - $P^{32}$ ] dCTP no incorporado.
- 6) La actividad específica de la sonda fue de  $5 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g de DNA.

### 3.2.6 Prehibridación e hibridación del DNA en la membrana

La prehibridación e hibridación de la membrana se llevó a cabo, con algunas modificaciones, de acuerdo al protocolo indicado en Ausubel et al., 1992.

La membrana se prehibridó con solución de hibridación [SSC 4X (NaCl 0.6 M,  $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.06M), solución de Denhardt 5X (Ficoll 400, polivinilpirrolidona y la fracción V de la albúmina sérica bovina, todos al 0.1 %), SDS al 0.5 % (p/v) y DNA de esperma de salmón 0.1mg/ml] por 2 h a 68°C, después de ese tiempo se le agregó la sonda marcada, la que previamente se desnaturizó por calentamiento a 100 °C por 5 min y se enfrió inmediatamente en hielo. La hibridación se llevó a cabo a 68°C por 18 h.

### 3.2.7 Lavado y exposición de las membrana

La membrana se lavó, para eliminar las hibridaciones inespecíficas, con 50 ml de SSC 1X/SDS al 0.1%, una vez durante 20 min, a 60°C, y con SSC 0.5 X/SDS al 0.1 %, una vez por 30 min, a 65°C.

Para la detección de señales la membrana se expuso a una película para rayos X (Kodak), con pantallas amplificadoras, durante 1 semana, a temperatura ambiente.

## 3.3 Clonación y secuenciación de las subclonas genómicas RB4000K y RB9000S a partir de la clona $\lambda$ Fix II 8.1.4.2

### 3.3.1 La clona genómica $\lambda$ Fix II 8.1.4.2

La clona 8.1.4.2 se aisló en el sondeo de un banco de DNA genómico de la línea de maíz Missouri 17, preparado a partir de plántulas etioladas, digerido con *Sau* 3AI, y clonado en el sitio *Xho* I del vector  $\lambda$ FixII.

El DNA que se utilizó como sonda fue el fragmento contenido en PBS-RB (subclona del cDNA *ZmRb1*), que comprende los nucleótidos 1-384 de *ZmRb1*.

El inserto de la clona genómica se liberó con *Not*I, y su tamaño aproximado es de 14 kpb (Figura 6A, carril 1).

### 3.3.2 Extracción del DNA de la clona genómica $\lambda$ Fix II 8.1.4.2

A partir de 10 ml de un lisado de la clona genómica 8.1.4.2 (clonada en el sitio *Xho* I del vector  $\lambda$ Fix II), con un título de  $10^{10}$  pfu/ml, se hizo la extracción de DNA con un equipo de reactivos para extracción de DNA del fago lambda (QIAGEN Lambda), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La extracción se basa en un paso de precipitación optimizado con PEG (polietilenglicol), seguido por una cromatografía de intercambio iónico en una columna QIAGEN.

### 3.3.3 Digestión del DNA de la clona $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 con *Sst*I y *Kpn*I

Se digirieron 4  $\mu$ g del DNA obtenido en 3.3.2 con 10 U de *Sst* I o de *Kpn* I (GIBCO, BRL) y se corrieron en un gel de agarosa al 0.7 % en TAE 1X (Trizma-base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.0 mM, pH 8.0) teñido con bromuro de etidio. En cada caso se purificó el inserto de interés, de ~9000 pb en la digestión con *Sst* I y de ~4000 pb en la de *Kpn* I.

El DNA del fragmento a clonar se obtuvo utilizando un equipo de reactivos para purificación de DNA a partir de geles de agarosa (GENECLEAN III KIT, BIO 101) siguiendo el protocolo indicado por



el fabricante. Posteriormente se utilizó en una reacción de ligación con el vector pBluescript II KS (+/-), el cual se digirió previamente con las mismas enzimas (*Kpn* I o *Sst* I) y se desfosforiló de la siguiente manera:

### 3.3.4 Digestión y desfosforilación del vector pBluescript II KS (+/-)(2961 pb)

Se digirieron, por separado, 5  $\mu$ g del vector pBluescript II KS (+/-) con 10 U de *Sst* I y *Kpn* I (GIBCO, BRL), a 37 °C por 2 h.

Una alícuota de cada uno de los productos de las digestiones se corrió en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, en TAE 1X, con el propósito de verificar la linearización del vector.

Enseguida se desfosforiló al vector linearizado, directamente en la mezcla de reacción de la digestión, agregando para ello 33.4 U de CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, GIBCO), diluida 1: 10 con el amortiguador de dilución CIAP (trietanolamina 30 mM pH 7.6, NaCl 3.0 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0.1 mM), y el amortiguador de desfosforilación CIAP 10X (Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM) a una concentración final de 1X. La reacción de desfosforilación se incubó a 37 °C durante toda la noche. La CIAP se inactivó agregando a la mezcla de reacción 5  $\mu$ l de EDTA 0.5 M, pH 8.0, y calentándola a 70°C durante 10 min.

El DNA plasmídico linearizado y desfosforilado se purificó de los componentes de la mezcla de reacción por extracción con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24: 1, y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2.

El vector desfosforilado se corrió en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio, el fragmento de 2961 pb se separó del gel y se purificó de la manera indicada anteriormente (GENECLEAN III KIT, BIO 101).

Con los DNAs purificados, tanto del vector como del inserto a clonar, se llevó a cabo una reacción de ligación siguiendo el protocolo indicado en (Sambrook et al., 1989).

### 3.3.5 Reacción de ligación

Los componentes de la reacción fueron: 0.4  $\mu$ g de DNA del vector, 2.2  $\mu$ g del fragmento a clonar, 2.5 U de la DNA Ligasa de T4 (Boehringer) y amortiguador de ligación 10X (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, ditioeritritol 5 mM, KCl 60 mM, glicerol al 50%, pH 7.5) a una concentración final de 1X. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25  $\mu$ l. La reacción se incubó toda la noche a 14 °C. Al día siguiente se utilizó para transformar células competentes.

### 3.3.6 Preparación de células competentes

Se utilizaron células *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  para hacerlas competentes por el método de Inoue et al., 1990:

1. Se inocularon 100  $\mu$ l de células en 25ml de medio LB [peptona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0.5 % (p/v) y NaCl 170 mM] y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C, con agitación.
2. De este cultivo se tomaron 200  $\mu$ l y se inocularon en 25 ml de medio SOB [ peptona al 2 % (p/v), extracto de levadura al 0.5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6.7-7.0] a 16° C hasta que alcanzaron una densidad óptica, medida a 600 nm, de 0.6.
3. Las células se incubaron en hielo por 10 min.
4. Se centrifugaron a 2500 g durante 10 min, a 4°C.
5. Se resuspendieron suavemente en 8.0 ml de medio TB frío [Pipes (ácido piperazino-dietanosulfónico) 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, pH 6.7]
6. Se les agregó DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración final de 7%.
7. Se colocaron en hielo por 10 min.
8. Las células competentes se guardaron a -70°C en alícuotas de 100  $\mu$ l.



### 3.3.7 Transformación de células competentes

La transformación de las células competentes con los productos de la reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo (Stratagene):

1. Se descongeló en hielo un tubo de células competentes DH5 $\alpha$  (100  $\mu$ l).
2. Se agregaron a las células 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5 M y se mezcló suavemente con la punta de la pipeta.
3. Se agregó a las células competentes toda la reacción de ligación (25  $\mu$ l) y se mezcló muy suavemente con la punta de la pipeta.
4. Las células con el DNA transformante se incubaron en hielo por 30 min.
5. Se les dió un choque térmico a 42°C durante 2 min.
6. Se mantuvieron en hielo por 3 min.
7. Se les agregaron 400  $\mu$ l de medio SOC [peptona al 1.6 % (p/v), extracto de levadura al 0.4 % (p/v), NaCl 136 mM, glucosa 20 mM].
8. Se incubaron a 37°C durante 1 h, con agitación a 225 rpm.
9. Se dispersaron diferentes volúmenes de células transformadas (50, 100, 150 y 200  $\mu$ l) en cajas Petri con 30 ml de agar LB solidificado [peptona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0.5 % (p/v), NaCl 170 mM y agar al 1.5 % (p/v)] en el que se incorporó previamente ampicilina a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ l de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) 1 M y 25  $\mu$ l del sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) 50 mg/ml disuelto en DMFA (dimetilformamida).
10. Una vez que el líquido se hubo absorbido en el agar, las cajas se invirtieron y se dejaron incubando a 37°C durante ~18 h, para permitir el crecimiento de colonias.
11. Después de ese tiempo se colocaron a 4° C durante todo el día para permitir el desarrollo de color azul en las colonias de clones no recombinantes.

Las colonias que se mantuvieron blancas durante todo el día (clonas recombinantes putativas) se inocularon en medio LB con ampicilina (50 mg/ml) y se incubaron con agitación a 37°C durante toda la noche. Los cultivos bacterianos se utilizaron para hacer extracciones de DNA plasmídico.

### 3.3.8 Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo, con algunas modificaciones, utilizando el protocolo indicado en (Sambrook et al., 1989):

1. Se centrifugaron 1.5 ml de un cultivo bacteriano crecido la noche anterior en medio LB con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) en una microcentrífuga (Microfuge E™, Beckman) durante un minuto, a velocidad máxima (12, 000 rpm). El sobrenadante se eliminó por aspiración.
2. El botón bacteriano se resuspendió en 200  $\mu$ l de amortiguador GTE (glucosa 50mM, Tris 25 mM pH 8.0, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 10 mM pH 8.0) pipeteando de arriba a abajo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
3. Se agregaron a la suspensión 300  $\mu$ l de una solución de lisis alcalina (NaOH 0.2 N, SDS al 1%) recién preparada y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente. Se incubó en hielo por 5 min.
4. Se agregaron 300  $\mu$ l de acetato de potasio 3 M, pH 4.8. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min.
5. Se centrifugó a 14,000 g por 10 min, a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.
6. Al sobrenadante se le hizo una extracción con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezclaron las fases sin utilizar el vórtex, para separarlas se centrifugó el tubo a 14, 000 g durante 3 min. La fase acuosa se separó en un tubo limpio.



7. Se hizo una extracción a la fase acuosa con un volúmen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitó manualmente durante 1 min. Se centrifugó por 3 min a 14, 000 g para separar las fases y se pasó a un tubo limpio la fase acuosa.
8. El DNA se precipitó agregando un volumen igual de isopropanol, mezclando por Inversión, incubando a -20 °C por lo menos durante 20 min y centrifugando a 14, 000 g por 15 min, a 4 °C.
9. El sobrenadante se eliminó y el botón de DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 14, 000 g por 5 min, a 4°C.
10. El sobrenadante se decantó y el disolvente residual se eliminó por evaporación.
11. El botón de DNA seco se disolvió en 15  $\mu$ l de agua estéril o de amortiguador TE 1: 10 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 1 mM pH 8.0).

El DNA que se obtuvo de cada una de las colonias putativas recombinantes se digirió con *Kpn* I o *Sst* I, y para verificar la presencia de cada uno de los fragmentos que se deseaban clonar se corrieron los productos de las digestiones en un gel de agarosa al 0.8 %, al que previamente se incorporaron 12.5  $\mu$ g de RNAasa libre de DNAasa (Boehringer) y bromuro de etidio a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml.

Una vez que se tuvo la certeza de tener clonados los fragmentos de Interés se procedió a secuenciar los extremos de una de las clonas recombinantes, la denominada RB4000K, con el fin de conocer su orientación y saber cuantas pares de bases se extendía hacia el extremo 3' del gen.

Una vez que se conoció su orientación se procedió a secuenciarla completamente.

Se preparó DNA de la clona RB4000K, de calidad adecuada para secuenciación, utilizando un equipo de reactivos para extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Wizard™ Minipreps DNA Purification System, PROMEGA).

### 3.3.9 Secuenciación parcial de la clona RB4000K

La clona RB4000K se secuenció en el laboratorio utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido	Secuencia
"-40 M13 F "	5'- GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-ACG-TTG-TA-3'
"-50 Rev "	5'- TTG-TGA-GCG-GAT-AAC-AAT-TTC-3'
RBG 1600	5'- TGA-AAC-ATT-GGC-ATC-TCC-3'
RBG 1900	5'- CCA-AGT-CTT-CTG-CTG-ATC-3'
RBG 2400	5'- CCT-GCT-GTT-CTT-GAG-AGT-3'

La posición de los oligonucleótidos en la clona RB4000K se muestra en la Figura 5.

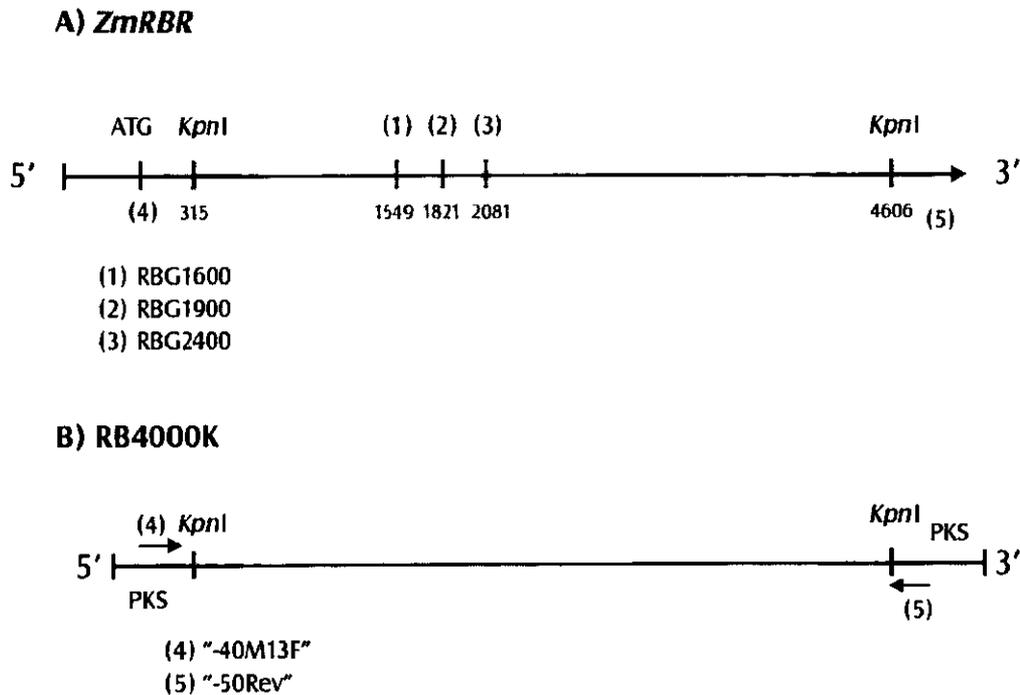


Figura 5. Esquema de la localización en el gen *ZmRBR* y en la clona RB4000K de algunos de los oligonucleótidos que se utilizaron en su secuenciación

A) Localización en el gen *ZmRBR* de algunos de los oligos que se utilizaron en la secuenciación de la clona RB4000K, la cual inicia en el nucleótido 315 "corriente abajo" del ATG de inicio del gen y termina en el nucleótido 4606. Los oligonucleótidos RBG1600, RBG1900 y RBG2400 inician en los nucleótidos 1549, 1821 y 2081, respectivamente, a partir del ATG de inicio del gen.

B) La clona RB4000K también se secuenció por los extremos utilizando los oligonucleótidos "-40M13F" y "-50Rev" cuyas secuencias están basadas en la del vector pBluescript II KS (+/-) (PKS).



La clona RB9000S se secuenció también por los extremos utilizando los oligonucleótidos “-40 M13 F” y “-50 R” y posteriormente se secuenció completamente haciendo uso de diferentes oligonucleótidos.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando un equipo de reactivos para secuenciación (Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit, Amersham), en el que los ddNTPs (didesoxinucleósidos trifosfato) están marcados con  $P^{33}$ .

#### a) Reacción de secuenciación

1. Mezcla de reacción. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 2  $\mu$ l de amortiguador de reacción (Tris-HCl 260 mM pH 9.5,  $MgCl_2$  65 mM), 0.5  $\mu$ g de DNA (RB4000K), 4 pmoles de oligonucleótidos y 2  $\mu$ l de la enzima Thermo Sequenase DNA polimerasa de 4U/ $\mu$ l, en un volumen final de 20  $\mu$ l.
2. Mezclas de Terminación. Aparte, en tubos para PCR de 500  $\mu$ l, marcados con las letras ‘A’, ‘C’, ‘G’ y ‘T’, se agregaron 2  $\mu$ l de “mezcla maestra de terminación dGTP” (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, cada uno 7.5 mM) en cada tubo y 0.5  $\mu$ l del [ $\alpha$ - $^{33}P$ ] ddNTP ([ $\alpha$ - $^{33}P$ ] ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP cada uno 0.3  $\mu$ M) que le correspondiera de acuerdo con la letra ([ $\alpha$ - $^{33}P$ ] ddATP para la ‘A’, [ $\alpha$ - $^{33}P$ ] ddCTP para la ‘C’, etc., etc.).
3. Se transfirieron 4.5  $\mu$ l de la mezcla de reacción en cada tubo en donde se preparó la mezcla de terminación (‘A’, ‘C’, ‘G’ y ‘T’), se mezclaron y se sometieron a 30 ciclos de amplificación en un termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer); los parámetros de temperatura y tiempo de cada ciclo fueron: 30 s a 95 °C, 30 s a 60°C y 2 min a 72 °C.
4. Una vez que concluyeron los ciclos de amplificación, a cada reacción de terminación se le agregaron 4  $\mu$ l de solución de detención de la reacción [(formamida al 95 % (v/v), EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05 % (p/v) y xilén cianol al 0.05 % (v/v)].

La preparación del gel de secuenciación, el corrimiento de las reacciones de secuenciación, y el secado y exposición del gel, se llevaron a cabo siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

#### b) Preparación del gel de secuenciación

Todas las reacciones de secuenciación se corrieron en geles de poliacrilamida al 6 % con la siguiente composición: acrilamida al 5.7 % (p/v), N,N’-metilénbisacrilamida al 0.3 % (p/v), urea al 50 % (p/v), amortiguador tolerante a glicerol GTE 20 X (Taurina 0.570 M,  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  10 mM, Tris-base 1.78 M) a una concentración final de 0.8 X, persulfato de amonio al 0.075 % (p/v) y TEMED (N,N,N’,N’-tetrametil etiléndiamina) al 0.03 % (v/v).

#### c) Corrimiento de las reacciones de secuenciación

El gel se montó en un aparato de electroforesis para geles de secuenciación (Sequencing Gel System Model SA, GIBCO BRL); las reacciones de secuenciación se calentaron a 70°C, por 10 min, antes de cargarlas en el gel y se corrieron en amortiguador GTE 0.8 X, a 3000 V, durante 4 y 8 h.

#### d) Secado y exposición del gel

Cuando concluyó el tiempo de corrimiento, el gel se separó de los cristales que lo contenían, se humedeció con una solución fijadora [metanol al 10% (v/v), ácido acético glacial al 10% (v/v)], se transfirió a un pliego de papel filtro Whatmann 3 MM del mismo tamaño que él, y se secó durante 1 h, a 80 °C, en un aparato secador de geles (Slab Gel Dryer GD 40/50™, GIBCO BRL).

Para la detección de señales el gel seco se expuso a una película para autorradiografía de alta sensibilidad (Hyperfilm™ MP, Amersham), por 48 h a temperatura ambiente.



### 3.4 Ensayos de RT-PCR y de Extensión de Cebador

#### 3.4.1 Extracción de RNA total

El RNA total que se utilizó en los experimentos de RT-PCR (Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de Extensión de cebador se obtuvo por el método de extracción de RNA total con TRIZOL (TRIZOL™ Reagent, GIBCO); el reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina.

El protocolo que se siguió es una modificación del descrito por el fabricante y se ha adaptado en el laboratorio para tejido vegetal:

1. Los tejidos se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se trituraron en un mortero con 1 ml de TRIZOL™ por cada 100 mg de tejido.
2. Las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la disolución completa de los complejos de nucleoproteína.
3. Se centrifugaron a 14, 000 g por 10 min, a 4 °C, con el propósito de eliminar material insoluble.
4. El sobrenadante se separó en un tubo limpio y se le agregaron 100 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1.
5. Las fases se mezclaron por agitación en el vórtex, durante 30 s, y se dejaron incubando por 3 min a temperatura ambiente.
6. Las fases se separaron por centrifugación a 14, 000 g durante 5 min, a 4° C.
7. La fase acuosa se separó cuidadosamente en un tubo Eppendorf limpio y se le agregaron 500 µl de TRIZOL™ y 50 µl de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1; las fases se mezclaron por agitación en el vórtex durante 30 s y se separaron por centrifugación a 14, 000 g durante 5 min, a 4° C.
8. La fase acuosa se pasó a un tubo limpio y se le hicieron repetidas extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y centrifugaciones, en las condiciones ya descritas, hasta observar la desaparición de una "nata" blanca en la interfase.
9. El RNA total presente en la fase acuosa se precipitó por la adición de un volumen igual de isopropanol, incubación durante 1 h a -20 °C y centrifugación a 14, 000 g durante 10 min, a 4° C.
10. El sobrenadante se decantó y el botón de RNA se lavó con etanol al 70 %, preparado con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (dietilprocarbonato).
11. Se centrifugó a 14, 000 g por 10 min, a 4° C; el sobrenadante se decantó, y el líquido residual se eliminó por evaporación.
12. El botón seco de RNA se disolvió en 25 µl de agua tratada con DEPC y se le agregó 1 µl de inhibidor de RNAasa (20U/µL) (Perkin Elmer). El RNA se almacenó a -70° C.

Para evaluar la cantidad y calidad del RNA se tomó una alícuota de cada una de las preparaciones anteriores, se diluyó en una proporción de 1:1000 con agua tratada con DEPC y se leyó en el espectrofotómetro (UV-Visible Recording Spectrophotometer UV160U, SHIMADZU) a 260 y 280 nm.

Para verificar la integridad del RNA se corrió otra alícuota de cada una de las preparaciones en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (Trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2.0 mM, pH 8.0), al que se incorporó bromuro de etidio (preparado con agua tratada con DEPC) a una concentración final de 0.5 µg/ml (Figura 18 A). Como amortiguador de corrida se utilizó TAE 1X.

Todo el material de plástico con el que hizo la extracción se esterilizó durante 2 h a 20 p.s.i., a una temperatura de 120°C. El material de vidrio se horneó por más de 24 h a 180 °C.

El agua se agitó durante toda la noche con DEPC a una concentración de 0.1% (v/v) y se esterilizó a 20 p.s.i., hasta eliminar completamente el olor a DEPC.

En los ensayos de Transcripción Reversa y Extensión de cebador se utilizó el oligonucleótido RBNH2R (5' - ACT-AAT-CCA-TGG-GAT-GCA-GG-3' ), cuya secuencia, ubicada en el exón 3 del gen *ZmRBR* es la inversa complementaria a la que va del nucleótido 993 al 1011 "corriente abajo" del ATG.



En los experimentos de PCR, además del oligonucleótido RBNH2R, se utilizó el oligonucleótido RBNH2F (5' - CCG-CAA-AGC-ATA-TAA-TGA-ACT-G-3'), cuya secuencia ubicada en el exón 3 del gen *ZmRBR* comprende del nucleótido 844 al 865 "corriente abajo" del ATG.

### 3.4.2 Ensayos de RT- PCR

Para estos experimentos se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de RNA total del tejido de interés (hoja, tallo, raíz, eje y embrión de semilla seca) en el ensayo de Transcripción Reversa que se describe a continuación, y en el que se siguió el protocolo indicado por el fabricante:

#### a) Síntesis de la primera cadena de cDNA

1. A un tubo Eppendorf de 1.5 ml se le agregaron 10  $\mu\text{g}$  de RNA total, 4 picomoles del oligonucleótido RBNH2R y  $\text{H}_2\text{O}$  estéril tratada con DEPC a un volumen final de 12  $\mu\text{l}$ . La mezcla se incubó a 70°C durante 10 min y se enfrió inmediatamente en hielo.
2. A la mezcla anterior, fría en hielo, se le agregó: 4  $\mu\text{l}$  de amortiguador de primera cadena 5X (GIBCO) (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM,  $\text{MgCl}_2$  15 mM), 2  $\mu\text{l}$  de DTT (ditiotreitól) 0.1 M y 1  $\mu\text{l}$  de una mezcla de dNTPs 10 mM ( dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a una concentración de 10 mM), y se incubó por 2 min a 42°C.
3. Se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de Transcriptasa Reversa RNasa H-SUPERSCRIPT™ II (GIBCO), de 200 U/ $\mu\text{l}$ , y se incubó a 42°C, durante 1 h.
4. La reacción se detuvo calentándola a 70°C por 10 min.

Los controles negativos para esta reacción se prepararon de la misma manera que se indica arriba, con la excepción de que no se les agregó Transcriptasa Reversa.

#### b) Síntesis de la 2ª. Cadena de cDNA ( PCR )

1. Se preparó una "mezcla maestra" con la siguiente composición: amortiguador de PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.3)(10 X PCR buffer II, Perkin Elmer) a una concentración final 1X, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.33  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido (RBNH2R y RBNH2F) y 1.65 U de *Taq* Polimerasa (Amplitaq Gold, Perkin Elmer).
2. A un tubo para PCR de 200  $\mu\text{l}$  se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de la reacción de Transcriptasa Reversa y 20  $\mu\text{l}$  de la "mezcla maestra", se mezclaron muy bien y se sometieron en un termociclador (Gene Amp® PCR System 9700, Perkin Elmer), a 35 ciclos de amplificación, previa desnaturalización a 95°C durante 3 min.; las condiciones de amplificación para cada ciclo fueron: 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C.

Los controles negativos fueron:

- 1) Control de dímeros de cebador, en donde se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  en lugar de los 10  $\mu\text{l}$  de la reacción de Transcriptasa Reversa.
- 2) Uno, en donde no se agregó el oligonucleótido RBNH2F en la mezcla maestra.
- 3) Otro, en donde no se agregó el oligonucleótido RBNH2R en la mezcla maestra.

Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X.

Para verificar que el producto de PCR no fuera un artefacto se hizo un Southern Blot en el que se transfirió el producto de PCR, corrido en un gel de agarosa al 1.5 %, a una membrana y se hibridó a 68°C, utilizando como sonda el mismo producto de PCR, pero obtenido a partir de una subclona de *ZmRBR* (Hin 1P) (Ver resultados).

Otra de las pruebas fue la digestión del producto de PCR con *Sau* 3AI, una enzima que se sabe corta en un solo sitio de la secuencia del exón 3 de *ZmRBR*, generando dos fragmentos, uno de 124 pb y otro de 48 pb (Ver resultados).



### 3.4.3 Ensayos de Extensión de cebador

a) **Marcaje del oligonucleótido RBNH2R con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP por la polinucleótido cinasa de T4**  
Para marcar radiactivamente al oligonucleótido se utilizó el sistema RTS de marcaje por la cinasa T4 (RTS T4 Kinase Labeling System, GIBCO), el cual incluye en un solo tubo, después de que se reconstituye, 10 U de polinucleótido cinasa, Tris-HCl 70 mM pH 7.6, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 1 mM; a este tubo se le agregaron 20 pmoles de RBNH2R, 25  $\mu$ Cl de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (NEN™) y H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 20  $\mu$ l.

La mezcla anterior se agitó en el vórtex durante 30 s, se centrifugó brevemente y se incubó a 37°C durante 30 min.; para inactivar la enzima la reacción se calentó a 55 °C durante 5 min.

Para eliminar el [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP no incorporado la mezcla de reacción se filtró a través de una columna de Sephadex G-50.

### b) Reacción de transcripción reversa

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, libre de nucleasas, se mezclaron 15  $\mu$ g de RNA total de hoja o de tallo, 8 pmoles de RBNH2R marcado con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, con una actividad de 0.5  $\mu$ Cl, y agua estéril tratada con DEPC, hasta completar un volumen de 12  $\mu$ l. La mezcla de reacción se incubó a 70°C por 10 min e inmediatamente se enfrió en hielo.

2. A la mezcla anterior se le agregaron 4  $\mu$ l de amortiguador de primera cadena 5X (GIBCO) (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2  $\mu$ l de DTT (ditiotreitól) 0.1 M y 1  $\mu$ l de una mezcla de dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a una concentración de 10 mM), y se incubó por 2 min a 42°C.

3. Se le agregó 1  $\mu$ l de Transcriptasa Reversa RNasa H- SUPERSRIPT™ II (GIBCO), de 200 U/ $\mu$ l, y se incubó a 42°C, durante 1 h.

4. La reacción se detuvo calentándola a 70°C por 10 min.

### c) Corrimiento de los productos de la reacción de extensión de cebador en un gel de secuenciación

Los productos de la reacción de extensión de cebador se corrieron en un gel de poliacrilamida al 4.5% con la siguiente composición: acrilamida al 4.275 % (p/v), N, N'-metilénbisacrilamida al 0.225 % (p/v), urea al 45 % (p/v), amortiguador tolerante a glicerol GTE 20X (Taurina 0.570 M, Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O 10 mM, Tris-base 1.78 M) a una concentración final de 0.8 X, persulfato de amonio al 0.075 % (p/v) y TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletiléndiamina) al 0.03 % (v/v).

El gel se montó en un aparato de electroforesis para geles de secuenciación (Sequencing Gel System Model SA, GIBCO) y se recorrió a 2800 V durante 30 min, en amortiguador GTE al 0.8 X. Los productos de la reacción de extensión de cebador y los productos de las reacciones de secuenciación de la clona RB4000K, con el oligonucleótido RBG1900 (5' - CCA-AGT-CTT-CTG-CTG-ATC-3'), se calentaron a 70°C durante 10 min antes de cargarlas en el gel y se corrieron en amortiguador GTE al 0.8 X, a 2800 V, durante 10 h.

Las reacciones de secuenciación se prepararon como se describió en 3.3.9.

### d) Secado y exposición del gel

Transcurrido el tiempo de corrimiento el gel se separó de los cristales que lo contenían, se humedeció con una solución fijadora [(metanol y ácido acético glacial, ambos al 10 % (v/v)], se transfirió a un pliego de papel Whatmann 3MM de 45 X 17 cm y se secó durante 30 min, a 80°C, en un aparato secador de geles (Slab Gel Dryer GD 40/50™, GIBCO BRL).

Para la detección de señales el gel seco se expuso a una película para autorradiografía de alta sensibilidad (Hyperfilm™MP, Amersham), por 1 semana, a temperatura ambiente.



### 3.5 Detección de proteínas RBR de maíz por Western blot

#### 3.5.1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

Se extrajeron las proteínas totales de los siguientes tejidos: hoja, tallo y raíz, de plántulas de maíz de dos semanas de edad y eje embrionario de la semilla seca.

Para la extracción de las proteínas de la hoja se tomaron 10 cm de tejido contados de la punta hacia abajo.

Del tallo se tomaron 3 cm de tejido contados a partir de su inicio.

Para las muestras de la raíz se hicieron extracciones de la raíz completa de la plántula de dos semanas y de las puntas (aprox. 1.5 mm) de todas las raíces de semillas embebidas en agua por tres días.

El tejido (hoja, tallo y raíz completa) se cortó en pedazos pequeños, se congeló inmediatamente en  $N_2$  líquido, después de haberlo pesado, y se molió en un mortero con el siguiente amortiguador de homogeneización (Tris 70 mM pH 7.5,  $MgCl_2$  1.0 mM, KCl 25 mM,  $Na_2$  EDTA- $2H_2O$  5.0 mM pH 8.0, sacarosa 0.25 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 15 mM, Tritón X-100 0.1 % y 1 tableta del cocktail de inhibidores de proteasas Complete™ (Boehringer) por cada 5 ml de amortiguador). Se utilizaron 800  $\mu$ l de amortiguador por cada gramo de tejido fresco de la hoja, el tallo y la raíz completa, y 2.0 ml por cada 0.25 g de ejes embrionarios.

Los homogeneizados se centrifugaron a 135,800g (Optima™ Ultracentrifuge, rotor TLA 100.4, Beckman) por 30 min, a 4°C. El sobrenadante se separó y se centrifugó nuevamente, a 14,000g (centrifuga Jouan, MR1812, rotor 14, 500 MAXI) por 30 min, a 4°C.

Los sobrenadantes se separaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a -70°C hasta que se utilizaron.

#### 3.5.2 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas en el extracto total de cada tejido se determinó, con algunas modificaciones, por el método descrito por Bradford et al., 1976.

A 5 ml del extracto total se le agregaron 500  $\mu$ l de reactivo de Bradford [Azul Brillante de Coomassie G al 0.05 % (p/v),  $HClO_4$  al 5.2 % (v/v)], 50 ml de NaOH 1N y  $H_2O$  hasta completar un volumen de 1 ml. La absorbancia de la muestra se leyó a 595 nm contra un blanco preparado con 5 ml de amortiguador de homogeneización en lugar del extracto total, y dentro de los primeros 5 min después de haber agregado el reactivo de Bradford. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina.

#### 3.5.3 SDS-PAGE

Las muestras de proteínas de los diferentes tejidos se separaron en una SDS-PAGE al 10 %.

Los geles, apilador y separador, se prepararon de la siguiente manera:

Gel apilador:

amortiguador del gel apilador 2X	1.50 ml
acrilamida/bisacrilamida al 30 %	1.00 ml
$(NH_4)_2S_2O_8$ al 10 %	30 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
$H_2O$	c.b.p. 10.0 ml



La composición del amortiguador del gel apilador 2X fue: Trizma base 0.5 M, SDS 0.4 % (p/v), pH 6.8.

Gel separador:

amortiguador del gel separador 2X	1.25 ml
acrilamida/bisacrilamida al 30 %	3.33 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 10 %	45 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	c.b. p. 10.0 ml

La composición del amortiguador del gel separador 2X fue: Trizma base 1.5 M, SDS 0.4 % (p/v), pH 8.8

Para el gel separador se utilizaron los 10 ml y para el apilador 6 ml.

Se cargaron 40  $\mu\text{g}$  de proteína total de cada uno de los tejidos.

Antes de cargar las muestras en el gel se incubaron a 100°C durante 5 min en presencia de solución digestora (Trizma base 100 mM pH 6.8, SDS al 4% (v/v), glicerol al 20% (v/v), azul de bromofenol al 0.2% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 1.4 M).

Se agregaron 5 ml de solución de digestión por cada 20  $\mu\text{g}$  de proteína.

Las muestras se corrieron a 65 V en el gel apilador y a 87 V en el gel separador con 650 ml de amortiguador de electrodos 10X (Trizma base 250 mM pH 8.3, glicina 1.92 M, SDS al 1%), durante 5h.

### 3.5.4 Transferencia del gel

En un equipo de transferencia (LKB BROMMA 2117 MULTIPHOR, Pharmacia) se apilaron en el siguiente orden:

- 6 tiras de papel Whatmann 3MM humedecidos en solución anódica 1 (1X) (Trizma base 0.3 M pH 10.4, metanol al 4%).
- 6 tiras de papel Whatmann 3MM humedecidos en solución anódica 2(1X) ( Trizma base 25 mM pH 10.4 , metanol al 4%).
- membrana de PVDF (Immobilon <sup>TM</sup>-P, poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , MILIPORE), previamente lavada por 10 segundos con metanol absoluto y después varias veces con agua estéril, e incubada por 10 min en solución anódica 2(1X), a temperatura ambiente.
- el gel, previamente incubado en solución anódica 2(1X) durante 30 min, a temperatura ambiente.
- 3 tiras de papel Whatmann 3 MM humedecidos en solución catódica 3 (1X) (ácido  $\epsilon$ -amino-*n*-caproico 40 mM pH 7.2, metanol al 4%).

La transferencia se llevó a cabo a 75 mA por cada gel de 8.8 X4.7 cm, durante 1 h.

### 3.5.5 Bloqueo e Incubación de la membrana con el primer y segundo anticuerpo

La membrana se incubó con 10 ml de solución de bloqueo [PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.3), leche descremada Sveltes al 5%, Tween 20 al 1.2%] durante 1 h a 37 °C.

Inmediatamente después la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -Rb $\Delta$ AB\*, obtenido en conejo, a una dilución 1:1500, en solución bloqueadora fresca (PBS 1X , leche descremada Sveltes al 2.0 % y Tween 20 al 0.6%), toda la noche, a 4°C.

El anticuerpo  $\alpha$ -Rb $\Delta$ AB está dirigido contra la región "bolsillo" A/B de ZmRb1 que comprende los aminoácidos 27 a 557.



Después de la incubación con el primer anticuerpo la membrana se trató de la siguiente forma:

- 1) Se lavó 2 veces con PBS 1X , durante 15 min cada vez,
- 2) 1 vez con PBS 1X /NaCl 0.5 M por 10 min, y
- 3) 1 vez con PBS 1X por 5 min
- 4) Se incubó con un anticuerpo obtenido en cabra contra las cadenas pesada y ligera de la IgG de conejo y conjugado a la peroxidasa de rábano (goat anti-rabbit IgG(H+L)-horseradish peroxidase conjugate, GIBCO, BRL), diluido 1:2500 en 7.5 ml de solución bloqueadora (PBS 1X, leche descremada Sveltes al 2.5 %, Tween 20 al 0.6%).
- 5) Después de la incubación con el segundo anticuerpo la membrana se lavó 3 veces con PBS 1X, 15 min cada vez.

Los lavados y la incubación con el segundo anticuerpo se hicieron a temperatura ambiente.

### 3.5.6 Detección de las proteínas inmunoreactivas

Para la detección de señales, la membrana se incubó durante 2 min. en una mezcla de volúmenes iguales de los reactivos (1 y 2) del equipo de detección por quimioluminiscencia ECL™ (Amersham), y posteriormente se expuso a una película de rayos X (Kodak) por 5 y 15 min.

La membrana que se utilizó en la inmunodetección se tiñó posteriormente con rojo de Ponceau (ver Figura 19 A).

---

\* El anticuerpo a-Rb $\Delta$ AB fue proporcionado por el Dr. Crisanto Gutiérrez, del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", de la Universidad Autónoma de Madrid.



## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 Subclonación y secuenciación del gen *ZmRBR*, contenido en la clona genómica $\lambda$ Fix II 8.1.4.2

De la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 se obtuvieron por digestión con enzimas de restricción varias subclonas de diferentes tamaños que se utilizaron para facilitar la secuenciación del gen contenido en ella.

Las subclonas se identificaron por análisis de restricción e hibridación de la siguiente manera:

El fragmento de DNA contenido en  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 mide ~14 kpb y se obtiene al digerir la clona con *Not*I (Carril 1, figura 6A), aunque se obtienen fragmentos menores a 14 kpb al digerirla con las enzimas de restricción que se indican en la figura 6B. La selección del fragmento a clonar se realizó por un ensayo de Southern blot, transfiriendo el DNA del gel que se muestra en la figura 6B y utilizando como sonda en la hibridación a un fragmento *Eco*RI-*Hind*III de ~1500 pb contenido en la subclona RB1500, siendo ésta la que estaba más dirigida hacia el extremo 3' del gen.

Los resultados del ensayo de Southern blot se muestran en la figura 6C; a partir de ahí se seleccionaron, para subclonarlos, aquellos fragmentos que hibridaron con RB1500, uno de ~4.3 kpb, resultado de la digestión con *Kpn*I (carril K, figura 6C) y otro de ~9.4 kpb, producto de la actividad de *Sst*I sobre  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 (carril Ss, figura 6C).

A la clona que contiene el fragmento de ~4.3 kpb, se le denominó RB4000K (figura 6D), y a la que contiene el fragmento de ~9.4 kpb se le asignó el nombre de RB9000S (figura 6E). Primero se obtuvo la clona RB4000K, la cual se secuenció por sus extremos con el propósito de conocer su orientación y saber si abarcaba hacia el extremo 3' del gen una secuencia más allá de la que se obtuvo con RB1500. La secuencia se comparó con la del cDNA *RRB2a* y se pudo observar que el último exón que se encuentra en RB4000K sólo llega al nucleótido 998 de *RRB2a* (el tamaño de *RRB2a* es de 2.945 kpb).

Posteriormente se obtuvo la subclona RB9000S, se secuenció y se observó que contiene toda la región codificante del gen al que se denominó *ZmRBR*, así como una región de ~2600 pb "corriente arriba" del ATG de inicio y parte de la región 3'-UTR.

La posición de las subclonas RB4000K y RB9000S en  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 se muestra en la figura 7 y la secuencia del gen en la figura 8.

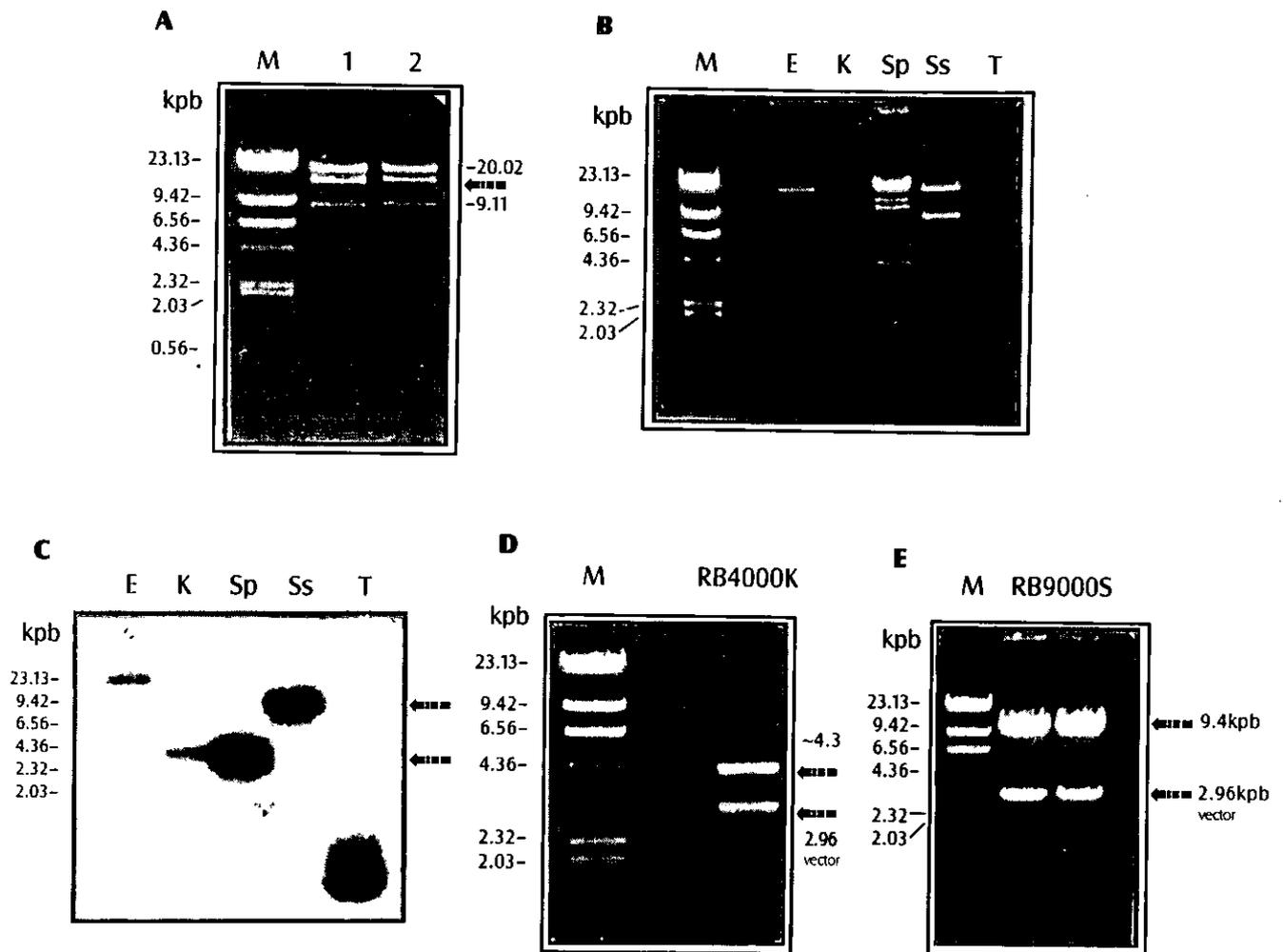


Figura 6. Clonación de RB4000K y RB9000S

(A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del DNA de las clonas genómicas (1) 8.1.4.2 y (2) 7.1.4.2, digerido con *NotI*. Se indican los tamaños de los brazos del vector  $\lambda$ Fix II (20.02 y 9.11 kpb). La flecha indica el fragmento de ~14.0 kpb contenido en  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2.

(B) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los productos de digestión de la clona genómica 8.1.4.2 con las endonucleasas de restricción: (E) *EcoRI*, (K) *KpnI*, (Sp) *SpeI*, (Ss) *SstI* y (T) *TaqI*.

(C) Análisis por Southern blot de las muestras señaladas en (B). La hibridación se llevó a cabo a 68°C, utilizando como sonda la clona RB1500. Las flechas indican los fragmentos seleccionados en los carriles K y Ss.

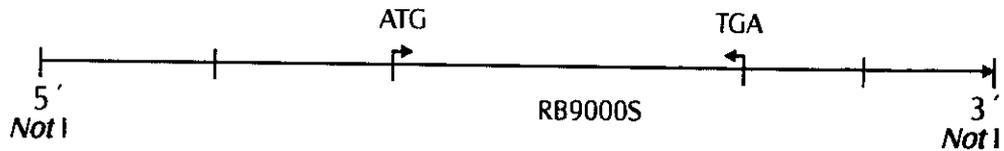
(D) Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % de la clona RB4000K digerida con *KpnI*.

(E) Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % de la clona RB9000S digerida con *SstI*.

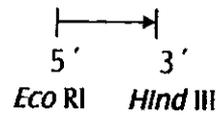
(M) Marcador de tamaño, DNA del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*.



$\lambda$ Fix II 8.1.4.2 (~14 kpb)



Rb1500 (1.534 kpb)



RB9000S (~9.5kpb)



RB4000K (4.242kpb)



Figura 7

Mapa de la posición en la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2 de las subclonas que se utilizaron para determinar la secuencia del gen *ZmRBR*. El mapa se dedujo a partir de la secuencia presentada en la figura 8.



```

-1546          ttgataccaattaaaactcgctaagaggggggggtgaataggcgt
-1500  aactcaaatTTTACAAactTTtaagccaactacaagtcagggttagcgttagaaaataaatcc
-1440  gagtccaaaaggagagggaaaccaaataccccaagaaatatagcggatgacaagttgat
-1380  ttgttttaccgaggttcggttcttgcaaacctagtcctcgttgaggtgtaacaaagacc
-1320  gggctctctttcaacccttccctctctcaaacgggtcacctagaccgagtgagctttcttc
-1260  ttaatcaaacgggtcacttagaccctcacaaggaccacacacaacttggtgtctcttgc
-1200  tttgattacaagtgctctgggaacaggaatgaagagttcagcctgtacagtcctctgggtgc
-1140  accgaacagtcgggtgcgccagaccagggttctcttcgggtttttttgctcctttctttt
-1080  gaaccctaactttgatctttttattgggtttgtgttgaaacctttgacctaataaacata
-1020  tctagagcaaacctagttagtccaattattttgtattgggcatttcaaccacaaaatcatt
-960   tatgaaaagggttgacctatttcccttccagtaacgtatgacagtaatggacgggtcctc
-900   actataggcaaaaatacgcaaccggttaggaaaggaatattcggactaaggctccgatctacc
-840   acggctctcgccctcgcccagcccggccggcgccgctcgtgtgacagtccttttctc
-780   cttttctcagcttctcaatagatgcacaaacgggtccacctatttaagttgagtgaaattgt
-720   cecttgaacttccggtatggtacaaagtacagtacactgtgcattaaagtgaacctctaa
-660   cattgactattattgaatattaatttgggtcaaaccacatttcaacacggttgagcacgt
-600   tagagaggggtgtgtagtgggacggggcatgtggcgggttgcaagttgatcgcgtcggagca
-540   cgcggcagtggtggcggttgtgtgcccggaggcgttggcggggtcggggcgttgacctcg
-480   acaagggcatggatcgatggagtggtgctttctcgtggtggcacgatgctctctcccggt
-420   ggtccgccgttgattgagcttcgatgtgggttggcggtggctatggacgagtcacacaagg
-360   aagcggatcacatgagcgtggcttccgactgggtggcgcagcgtgaccgacgtccggcgg
-300   ggtaggatcagtgagtcgggtgcaggaagcaaaaaataatgtttttgatgggcttt
-240   tgccggagaggggtgtttttgatggcgcctgagtgatgacaagggatttttaaccctcgg
-180   atgagattgagttaggaaggtggaggtaaagaaggactgggtgtgctgtgtgggagaggt
-120   tgtggatatttttttatgtgcatttagcgttgttttcaagtgatggattaagaagaagg
-60   gatagagatatagattttattttattttattaatataataatttattaatataagtaaaattt
→ +1   TAATATAATAATATACGATAGATATAGAAATAAAATAGATATATACAGATATAGATCGAT
+61   AAAAAGTATGATGTTGTTTAATTCGAACAGGAGTGGACTTGTGAGAGCGTGGATCCGCTT

```

Figura 8. Secuencia del gen *ZmRBR* contenida en la clona RB9000S

La secuencia comprende 1835 pb "corriente arriba" del ATG y 6878 pb "corriente abajo" del ATG. La flecha en la posición +1 indica el sitio de inicio de la transcripción, que se ubica a 289 pb arriba del ATG de inicio. Las regiones 5' -UTR y 3' -UTR se encuentran subrayadas. Los exones se muestran en mayúsculas, los intrones y la región promotora (-1 a -1618) se indican en minúsculas. Los codones ATG y TGA, de inicio y paro respectivamente, así como el sitio de clonación *Sst*I se indican en negritas.





+2101 AATTTTTCCAACCAAGTCTTCTGCTGATCGGGGTGGCTCATTAGGCCTCAATTGCGCAA  
+2161 TGCCTTTGATACTCTATGGGCAGATGCCAGAAAAATGGAGGCTTCCAAGTTGTACTATAG  
+2221 GGTATTAGAGGCAATCTGCAGAGCTGAGTTACAAAACAGCAATGTAAACAATCTAACTCC  
+2281 ATTGCTGTCAAATGAGCGTTTTACCAGATGTTTGATTGCATGTTTCAGCGGACGTAGTATT  
+2341 GCGGACACATAAGACGGTCATCATGATGTTTCTGCTGTTCTTGAGAGTGCTGGTCTAAC  
+2401 CTCATTTGATTTGAGCAAAATAATTGAGAACTTTGTGAGACATGAAGAGACCCTCCCAAG  
+2461 AGAATTGAAAAGACACCTAAATTCCTTAGAAGAACAATTTTGAAAGCATGGCATGGGA  
+2521 GAAAGGTTTCATCATTGTATAACTCACTGATTGTTGCCAGGCCATCTGTTGCTTCAGAAAT  
+2581 TAATCGCTTTGGTCTTCTGGCTGAATCAATGCCATCTCTGATGACTTAGTGGCAAGGCA  
+2641 GAATATTCATATTGAGGGCTTGCTGCTACACCATCTAAAAACGTGCTGCTGGTTCGAGG  
+2701 Taatttgctactcagccttaagtctgatgtttcacatttagtctataggttagccgtcatt  
+2761 ctattcagtgagtttgtaactataattggttgctgctgctatcttatcagcagaagcttca  
+2821 atgaaatgagttcagttatgacattacgtcctggaggttaagattatctttatctattgct  
+2881 tgaaaggcaaaaaagtaagggttaatgcagttgaaaattatggccagcaaaagatgaaaa  
+2941 tcagccttagtaatgtgaaacttctgcaccgatgaaacttactgaatttggttgctttt  
+3001 agcagtacaaatgtgcaatgtattcttagtaaatgtacaatgtattagtgtaatgcatgg  
+3061 tccttgctcattttatagtgacagaaggtaaatgaaactcaagttgtggtccaggatataatt  
+3121 tcctttatatcaactgtgttattggtttatagaactgactttttgaacaagaaatctatg  
+3181 acgatatgatgcccttccaattgaacaccatctaaaaattggaaggttcaataactttaa  
+3241 agattaaactgcaatccttttgaaacaagtaattctatttggactcctttggctcctttta  
+3301 gcttctgggctctactctctggtttattcatcacatgtttcttgcagacGACAATGCTGA  
+3361 TCCTCGATCACCAAAGAGACCATGCAATGAATCTAGGAGCCCAGTAGTAGAACACAATTT  
+3421 GCAGACACCTCCACCAAGCAATGCCACATGGTGTGACTAGTTTGAAAGCAAAATGCCA  
+3481 TCCACTCCAGTCCACATTTGCAaggttagtcacccgtttcagttgcactagtatctacgc  
+3541 attctatctctgttaacgaaacagaataacattttaccatctatctatctttgctAGTCCA  
+3601 ACTGTCAGTAATCCTGTTGGTGGGAACGAAAAATGTGCTGACGTGACAATTCAGATATTC  
+3661 TTTTCCAAAgatggattttctcataatcagaacttcacctttatgatttatctctcttct  
+3721 ctaaagttttaatcttgacctataattctctcagATTCTGAAGTTAGCTGCTATTAGAAT  
+3781 AAGAACTTGTGTGAAAGGATTCAATATATGGAACAGACAGAGCGTGTCTATAATGTCTT  
+3841 CAAGCAGATTCTTGATCAACAGACAACATTATTTTTTAATAGACACATCGATCAACTTAT  
+3901 TCTTTGCTGTCTTTATGGTGTGCAAAGgtatcgtttacactatttaatgagcatcctgt  
+3961 cactactcctttatctaggetggttgatcatgccttctctgcagGTTTGCCAATTAG  
+4021 AACTCTCATTGAGGAGATACTCAACAATTACAAAAAGAAGCACAATGCAAACCAGAAC

Continuación de la figura 8



+4081 TTTTTTTAAGCATCTATATTGGAAGTAGGAATCATAATGGGgtatgtatctaggettcta  
+4141 tatttgcacttccattctgacagttcttcattgggtgggtgctccttattgcttcttttc  
+4201 tgaagttatttcttatcaacagGTATTAATATCACGCCATGTTGATATCATTACTTTTT  
+4261 ACAATGAGGTC'TTGTTCAGCAGCCAAGCCTTTCCTGGTGTCAATTAATATCATCTGGTA  
+4321 CTCGTCCAGAAGACAAGAAGAATGCTAGTgggtatgtctatacccacttctcagtttga  
+4381 actgctatttcttttccatgagtcattgatgtcattactcttgettaGGCCAAGTTCCT  
+4441 GGATCACCGAAGCTATCTCCTTTCCCAAATTTACCAGATATGTCCCAAAGAAAGTTTCA  
+4501 GCTTCTCATAATGTATATGTGTCTCCTTTGCGGCAAACCAAGgttttttctggttctt  
+4561 gettttctttctttatattttctcttaagataactcataaactccaatctgttctggta  
+4621 aagtagtaaggttatcaataatctttcagattaatatggcatatgctgtttaaattcta  
+4681 cagcacagtatgtgtcaacaacagcatcaatgacaaagctgttgagtccaagcttgggg  
+4741 taggctagaggtgaagtcctccaagagccataaacacagtagtgtatcgcttcgatgatta  
+4801 tcaagaattttctagtcactccttacatttcattaaatgttcgaaaaattcctgaga  
+4861 attgagatggagcattatctaagttccttagggtaccttttgatactacagcttgtcacg  
+4921 acatttcgttttggttgaatttatattgaagactagtcaatgctgctatgaggggtgggtgg  
+4981 tactgcatccaccttattgtccacttcatalcataatagtaatgctgtcgaatcattaac  
+5041 acttaactctttactgcgttcctttttccaataaacacattcctctatgccacttatcagA  
+5101 TGGATTTACTGTCTGCACCAAGTTCAGGAGTTTTATGCATGCATTGGTGAAGGCACCC  
+5161 ATGCTTATCAGAGCCCATCTAAAGATTTGGCTGCTATAAATAGCCGCCTAAATTATgtat  
+5221 gaatctcaaaacgacactttcttttgtacatcatgatttcatgtctacaacactaattta  
+5281 taccactccgtttcatgttaaatttgcagAATGGTCCGAGAGTAAACAGTCGATTAACCT  
+5341 TTGACATGGTGAGCGACTCAGTGGTAGCTGGTAGTCTAGGCCAGCCAAATGGTGGTTCTA  
+5401 CTTCC'TGGATCCTGCAGCTGCATTTAGCCCCCTTTCAAAGAGAAAGCCAGATACTTGAT  
+5461 CBAATATAAATGGCGATCTCTCTCGTATATAGCTCACAGCTCCTAAGCAGTCTATTCTTC  
+5521 TGAATAAGTGGGTTGCTGGAGTGATTTAACTGTACATGTATGTGTTAGTGAGAACCAGCA  
+5581 GTTTATAGGCAGAACTGTTTTAAATTACTTTGAGGGTTTTATCACCATTTCCCTGCTGATT  
+5641 GAACATATTTTAGATTGTAACATCTGCTTTGTAGAATGCTAATGAATCTTTAGTTTTICAG  
+5701 TGGGTTGACATTACAAATCCTTATCCTAGTTGGCTGGTTGTGGGAGACATTCATCAAGG  
+5761 TTATATTTGGTCGTCAAATAGTACTGTACTTGATTCAATCTTTICATATTTTICACTAGC  
+5821 GTGGCAACCCTAAATGCTTTTCCTGACTAGGAACATATCTTCACAAGTATGGCAACTC  
+5881 TAAACTATTTGACCTTTTATATTCTCATTTTTAAGTACTTTCTCTATTTCTGCTACTTTT  
+5941 GTACTGTGTATTTCCAGCTTCTCCACCAGACTGATTGTTAGAGTGTATGCTCCTATATTA  
+6001 TCCATGTATGTGTAAATGGGCTGCTAGCCCATTAGGGTTAGGGTTCCCTGGGTCTATAT

Continuación de la figura 8



+6061 ATGTAACCACCCCTCTATGCAATAGAAATTTGAATATCAAGTTTCTATCACTAATGATTCCA  
+6121 TATTCAGTGGGCTGCAAAGTGATTTGACATACGGTGCCTTATCCTTCAGGTATGTCTCAT  
+6181 GTTGACTTCATTGCTTTTGTAAATGGTACTGTGGGCTTCATTGCTGGAATGCTGGTTATAA  
+6241 TCAACCTTTACTGCTCTATATTGTTCTTTTTTTGGTTTGCACAACCAGGGTGGTTGGTTT  
+6301 TCTGAATCAATCAATCCATTTCCCTCGGACACAAGATAATTTTTTGTATGTTACACTTCCCA  
+6361 AAATTGCAATTAATTCAGAAGTCTGCCTACTTTCATTTCAGTTAGTTCTCAGCAACTGA  
+6421 AAGGATATGAATCAGTCAACCCGATAGATGTTTATCTGGTTATTCCAAACAATCTGACAT  
+6481 CACATCTGTTTCTGCAGGCGAGATAAGGAAAATCTGAAATGCTATCACCATTTAAAACAT  
+6541 TGGCTCCTGGAAGTTCAGGTGallacaaacctccatctacatctgacattggcatgtag  
+6601 glagagtcagcaactcttgtgatggcaggagtcgttccttaaacagcaactgctccttcg  
+6661 ltcagcgtctctcatttctgattgtrattgaccgagagcatccaccttcccttctggtatc  
+6721 aactgaatgagttgcccacaccgacccatctgcccataatggcaggtTAGGTGTTGCTGT  
+6781 AGAATGAGATGGTTACCATCTTTACAAGCTCAGGCTATATGATTCCAGCAGCACTGTAAC  
+6841 CTGGGGTGCAAATGTGAAGGCCCTGCAAGCACITTTCCAGGCCACACCAATTCCTGCTTGGT  
+6901 TCTTGAAGATACATTCTTCCTATGGTGGCCACCTATATAAAAAGCCATTTCTGGTTGTTATG  
+6961 TTTATCCTTGACATGTCAACAGATCAGTGTGGGTTGCAGTCATGCGGTCCTTAAGTCCC  
+7021 GGAGAAGGCCGAGAAGTCAATTGCTGCTAGCATTGTGATCGTCCGCCACAAAAGTAATCAAA  
+7081 AAGTGAGAGCTACTTGTTCCTAGCAAAATGGAGAAGGGCGATATATAGGTTGATGATCgag  
+7141 tcgactcccttttaggagggllattgagctc

*Sst I*

Continuación de la figura 8



#### 4.2 Determinación de la pertenencia del gen *ZmRBR* a una familia multigénica

Dados los antecedentes de la existencia de más un cDNA para proteínas RBR de maíz y con el propósito de determinar si el gen *ZmRBR* pertenece a una familia multigénica, se llevaron a cabo estudios de Southern blot.

La integridad del DNA genómico extraído y su digestión con varias enzimas de restricción se verificó en un gel de agarosa en donde se cargaron alícuotas de DNA genómico sin digerir y digerido con las endonucleasas de restricción que se indican en la Figura 9.

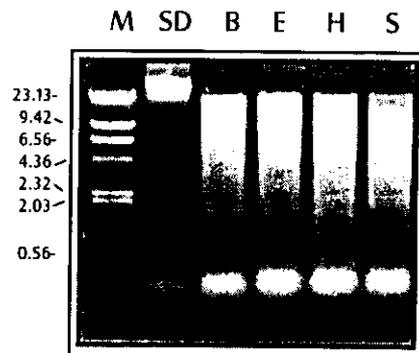


Figura 9. DNA genómico de maíz sin digerir y digerido con varias endonucleasas de restricción

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, de alícuotas de DNA genómico de maíz sin digerir (carril SD) y digerido con *Bam* HI (carril B), *Eco* RI (carril E), *Hind* III (carril H) y *Sst* I (carril S). Marcador de tamaño, DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Hind* III (M). En cada carril se cargaron 5  $\mu$ g de DNA.

Se puede observar la integridad del DNA genómico (carril SD), así como el barrido típico del DNA genómico digerido con enzimas de restricción (carriles B a S).

En los ensayos de Southern blot se utilizaron 20  $\mu$ g de DNA genómico digerido con cada una de las enzimas indicadas y la membrana se hibridó a alta astringencia utilizando como sonda un fragmento *Eco* RI -*Hind* III, de 1537 pb, contenido en la subclona RB1500.

En la figura 10 se muestran los resultados de tales experimentos y en ella también se muestra un mapa del gen, en el que se indican las posiciones de los sitios de restricción de cada una de las enzimas con las que se digirió el DNA, así como la ubicación de RB1500.

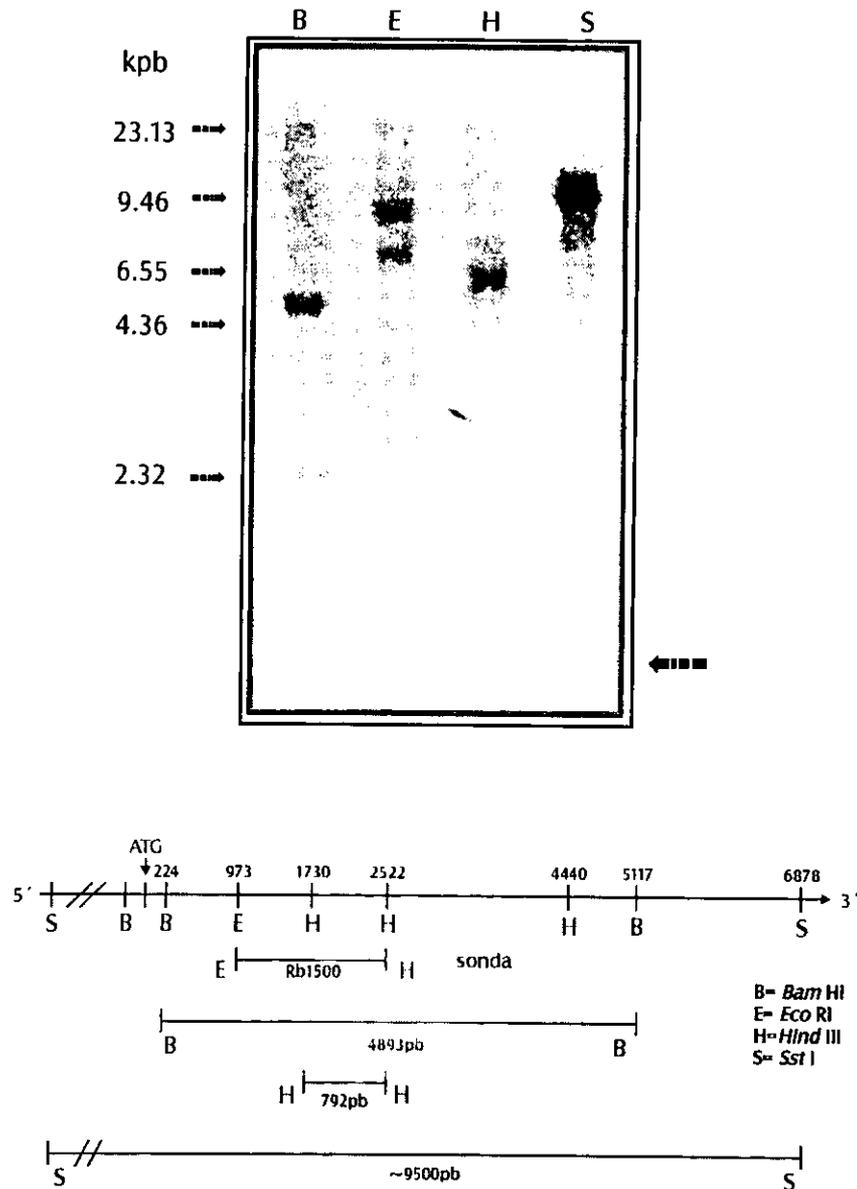


Figura 10. Análisis por Southern blot de DNA genómico de maíz

El DNA genómico que se extrajo a partir de ejes embrionarios, se digirió con *Bam*HI (carril B), *Eco*RI (carril E), *Hind* III (carril H) y *Sst*I (carril S). En cada carril se cargaron 20  $\mu$ g de DNA digerido con las enzimas indicadas. El DNA se transfirió a una membrana, la cual se hibridó a 68 °C, utilizando como sonda a RB1500, un fragmento *Eco*RI-*Hind*III de 1534 pb contenido en la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2. En la parte inferior de la figura se muestra el mapa de restricción obtenido a partir de la secuencia conocida del gen, con las posiciones de corte para cada una de las endonucleasas con las que se digirió el DNA. La flecha indica el fragmento de ~790 pb en el carril H.



En el carril B se corrieron las muestras de DNA genómico digerido con *Bam* HI y se observan dos bandas de hibridación, una de ~4.8 kpb y otra menos intensa, de ~2.3 kpb. La sonda RB1500 hibridaría con el fragmento de ~4.8 kpb, uno de los fragmentos que resultan de la digestión del gen *ZmRBR* con *Bam* HI, por lo que la presencia de la banda de ~4.8 kpb en el carril B debe corresponder posiblemente a esta señal de hibridación. De acuerdo con el mapa de restricción del gen que se muestra en la parte inferior de la figura, RB1500 no hibridaría con un fragmento de ~2.3 kpb, por lo que la presencia de una banda de este tamaño podría deberse a la hibridación con un fragmento *Bam* HI-*Bam* HI, producto de la digestión de un gen relacionado al que se aisló.

En el carril E, en el que se corrió el DNA digerido con *Eco* RI, aparecen dos bandas de intensidad similar, cuyos tamaños varían entre 6.0 y 8.0 kpb; La clona RB1500 utilizada como sonda en estos ensayos, contiene un fragmento de 1534 pb entre los sitios *Eco* RI y *Hind* III de la clona genómica, y detecta dos bandas, una de ~6.0 y otra de ~8.0 kpb, consistente con la existencia de dos genes relacionados.

En el carril H el DNA fue digerido con *Hind* III y se observa la presencia de dos bandas de hibridación, la primera más intensa, de ~6.5 kpb y la segunda menos pronunciada, de ~800 kpb, ésta última debe corresponder a la hibridación de RB1500 con el fragmento *Hind* III-*Hind* III, de ~800 pb, que se muestra en el mapa de restricción del gen (parte inferior de la figura 10). La banda de ~6.5 kpb debe corresponder a la hibridación de la sonda con la región 5' con respecto al sitio *Hind* III 1730.

Finalmente, en el carril S se observan dos bandas de hibridación al digerir el DNA con *Sst* I, cuyos tamaños se encuentran entre 9.0 y 9.5 kpb. En la restricción de la clona genómica con *Sst* I se identifica el fragmento de ~9.5 kpb, el cual contiene casi completa la secuencia del gen *ZmRBR* (figura 6B, carril Ss), por lo que la banda del mismo tamaño, proveniente del DNA genómico, podría corresponder a *ZmRBR* y la de ~9.0 kpb a un gen muy relacionado.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren la existencia de al menos dos genes que codifiquen la(s) proteína(s) RBR en maíz, consistente con los reportes sobre cDNAs aislados en bibliotecas de expresión (Ach et al., 1997a).

Ensayos de Southern blot a baja astringencia revelarían si se trata de una familia multigénica cuyos miembros esten altamente relacionados y uno de los cuales sería *ZmRBR*.



### 4.3 Análisis de la región codificante del gen *ZmRBR*

La secuencia del gen se comparó con las secuencias de cDNAs reportados en maíz: *ZmRb1* (X98923), *RRB1* (AF007793), *RRB2a* (AF007794) y *RRB2b* (AF00795), con el objetivo de definir los exones e intrones en el gen. A partir de la secuencia traducible de *ZmRBR* se dedujo la secuencia de aminoácidos que codificaría a este gen y que se presenta en la Figura 11. El producto putativo de *ZmRBR* es una proteína de 867 aminoácidos, en la que se identificaron los dominios A y B característicos de las proteínas «bolsillo» por comparación de la secuencia con la de otras proteínas tipo Rb de animales, así como 18 sitios potenciales de fosforilación similares a los que se encuentran en la pRb de humano y el residuo de cisteína equivalente a la cisteína 706 en la proteína de humano.

La secuencia de la proteína se alineó con la de otras proteínas tipo Rb de animales en los dominios A y B: pRb (M33647) y p130 (QO8999) de humano, Rb de ratón (A33718), Rb de *Xenopus* (A44879) y con la proteína RBF de *D.melanogaster* (X96975) (figura 12). La identidad de *ZmRBR* en los dos dominios es de ~30% con estas proteínas; en los dominios amino y carboxilo la identidad es menor.

La secuencia de la proteína *ZmRBR* se alineó también con las secuencias de las proteínas deducidas a partir de los cDNAs *RRB1*, *ZmRb1*, *RRB2b* y *RRB2a* (figura 13). La identidad de *ZmRBR* con cada una de las proteínas RBR de maíz se muestra en la tabla 2.

1	MSSQDPPPATSTQKKQSESLVNLLAEASRFYRKAYNELFSGLITIEWEPES	
51	STNIPDYMLFGWHLFLNLR <b>SP</b> ELFKDLVSCIHGLVAVLAILLVHVPK	
101	FRTFTIEGSSHLIKQTEKGVDLIASLCHNYHTSEECLKEMMDKSHKAIIEE	
151	VFSMKALSASECKTENLDKIDTDRLMYFKGLIDMECFQSNLEKIEKLCNS	
201	NNCEAELDFKLIITNNDYIPCAENLSRDSTNLGCSKCAFETL <b>SP</b> RKTIK	
251	NMLTVPSS <b>SPLSPT</b> NGCSVKIVQM <b>TP</b> ITSAMTTAKWLREVISSLPEKPSSK	
301	LQQLMSSCDRDLTYAVTERVSVILEAIFPTKSSADRGGLGLNCANAFDT	A
351	LWADARKMEASKLYRVLEAICRAELQNSNVNNL <b>TP</b> LLSNERFHRCLIAIC	
401	SADVVLATHKTVIMMFPVLESAGLTSFDLSKIIENFVRHEETLPRELKR	
451	HLNSLEEQILESMAWEKSSLYNSLIVARPSVASEINRFGLLAESMPSLD	
501	DLVARQNIHIEGLPA <b>TPSKKRA</b> GRDDNADPR <b>SPKR</b> PCNESR <b>SPV</b> VEHNL	
551	<b>QTP</b> PPKQCHMVLTSLKAKCHPLQSTFAS <b>PTVSNPV</b> GGNEKCADVTIQIFF	
601	SKILKLAAIRIRNLCERIQYMEQTERVYNVFKQILDQQTTLFFNRHIDQL	B
651	IL©CLYGVAKVCQLELSFREILNNYKKEAQCKPEVFLSIYIGSRNHNGVL	
701	LISRHVDIITFYNEVFVPAAPF <b>LV</b> SLISSGTRPEDKKNASGQVPG <b>SP</b> KL	
751	<b>SP</b> FPNLPDM <b>SP</b> KKVSASHNVYV <b>SP</b> LRQTKMDLL <b>SP</b> SSRSFYACIGEGTH	
801	AYQ <b>SP</b> SKDLAAINSRLNNGRRVNSRLNFDMSVSDSVVAGSLGQPNGGSTS	
851	LDPAAAF <b>SPL</b> SKRKPDT	

Figura 11. Secuencia de la proteína *ZmRBR* deducida a partir de los exones traducibles del gen *ZmRBR*

El producto putativo de *ZmRBR* es una proteína de 867 aminoácidos. Los «bolsillos» se indican con las letras A y B. Los sitios potenciales de fosforilación (S/TP) se muestran en negritas y subrayados. La señal potencial bipartita de localización nuclear se muestra subrayada. La cisteína encerrada en el círculo gris (aa 653) corresponde al residuo que se conserva en las proteínas Rb de eucariotes.



**BOLSILLO A**

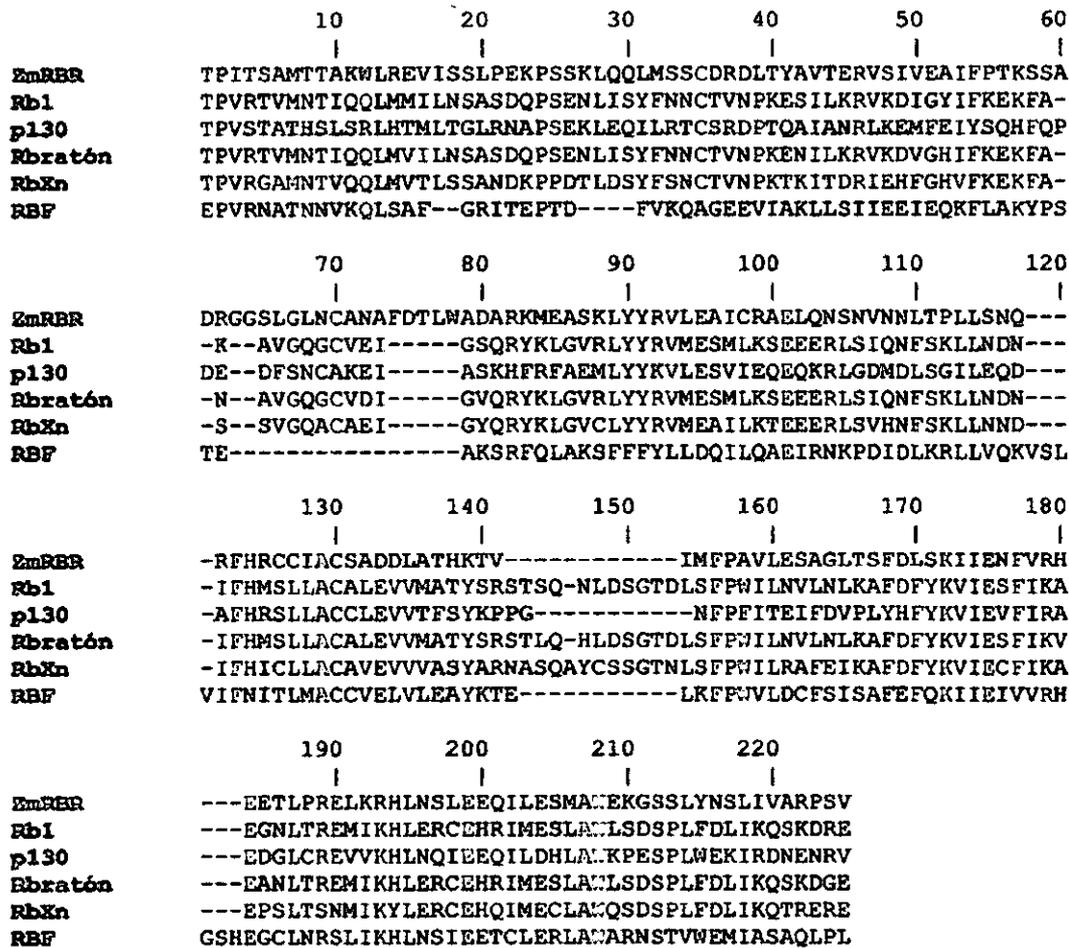


Figura 12. Continúa...

Alineamiento de las secuencias de los dominios A y B de *ZmRBR* con proteínas tipo Rb de animales: pRb (Friend et al., 1987) y p130 (Mayol et al., 1993) de humano, Rb de ratón (Bernards et al., 1989), Rb de *Xenopus* (Xn) (Destree et al., 1992) y la proteína RBF de *D. melanogaster* (Du et al., 1996). Los aminoácidos idénticos se muestran en color rojo. Con un asterisco se indica el residuo de cisteína correspondiente a la C706 de pRb de humano y que se conserva en las proteínas tipo Rb de animales reportadas hasta la fecha. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el algoritmo Multalin (Corpet, F., 1988).



**BOLSILLO B**

	10	20	30	40	50	60
<b>EmRBR</b>						
<b>RB1</b>	GGNEKCADVTIQIFFSKILKLAAIRIRNLCERI--QYMEQTERVYNVFKQILDQQTTLFF					
<b>p130</b>	--QKPLKSTSLSLFYKRVYRLAYLRLNLTLCERLLSEHPELEHI IWTLFQHTLQNEYELMR					
<b>Rbratón</b>	--NRPRKTSSLSLFFRKVYHLAAVRLRDLCAKL-DISDELRKKIWTCFEFSIIQCPPELMM					
<b>RbXn</b>	--QKPLKSTSLALFYKRVYRLAYLRLNLTLCARLLSDHPELEHI IWTLFQHTLQNEYELMR					
<b>RBF</b>	----QQKSTSLSLFYKRVYLLAYKRLSSLCSSLLSDHPELEQVIWTLQHTLQNEYELMR					
	70	80	90	100	110	120
<b>EmRBR</b>						
<b>RB1</b>	NRHIDQLILCCLYGVAKVCQL-ELSFREILNNYKKEAQCKPEVFLSIYIGSRNHNGVLIS					
<b>p130</b>	DRHLDQIMMCSMYGICKVKNI-DLKFKIIVTAYKDLPHAVQETFKRVLII-----KE---E					
<b>Rbratón</b>	DRHLDQIMMCSMYGICKVKNI-DLKFKIIVTAYKDLPHAAQETFKRVLII-----RE---E					
<b>RbXn</b>	DRHLDQIMMCSMYGICKAKNI-DLRFKIIVTAYKGLTNTNQETFKHVLI-----RD---G					
<b>RBF</b>	DRHLDQIMMCSMYGICKAKNI-DLRFKIIVTAYKGLTNTNQETFKHVLI-----RD---G					
	130	140				
<b>EmRBR</b>						
<b>RB1</b>	RHVDIITFYNEVFVPAKPF--					
<b>p130</b>	EYDSIIVFYNSVFMQRLKTNIL					
<b>Rbratón</b>	SGSSDSRSHQNSPTELKDRTS					
<b>RbXn</b>	EFDSIIVFYNSVFMQRLKTNIL					
<b>RBF</b>	QHDSIIVFYNLVFMQRLKSHIL					
	KVKDI IHFYNHITYVPLMRQFVI					

\*

Continuación de la Figura 12

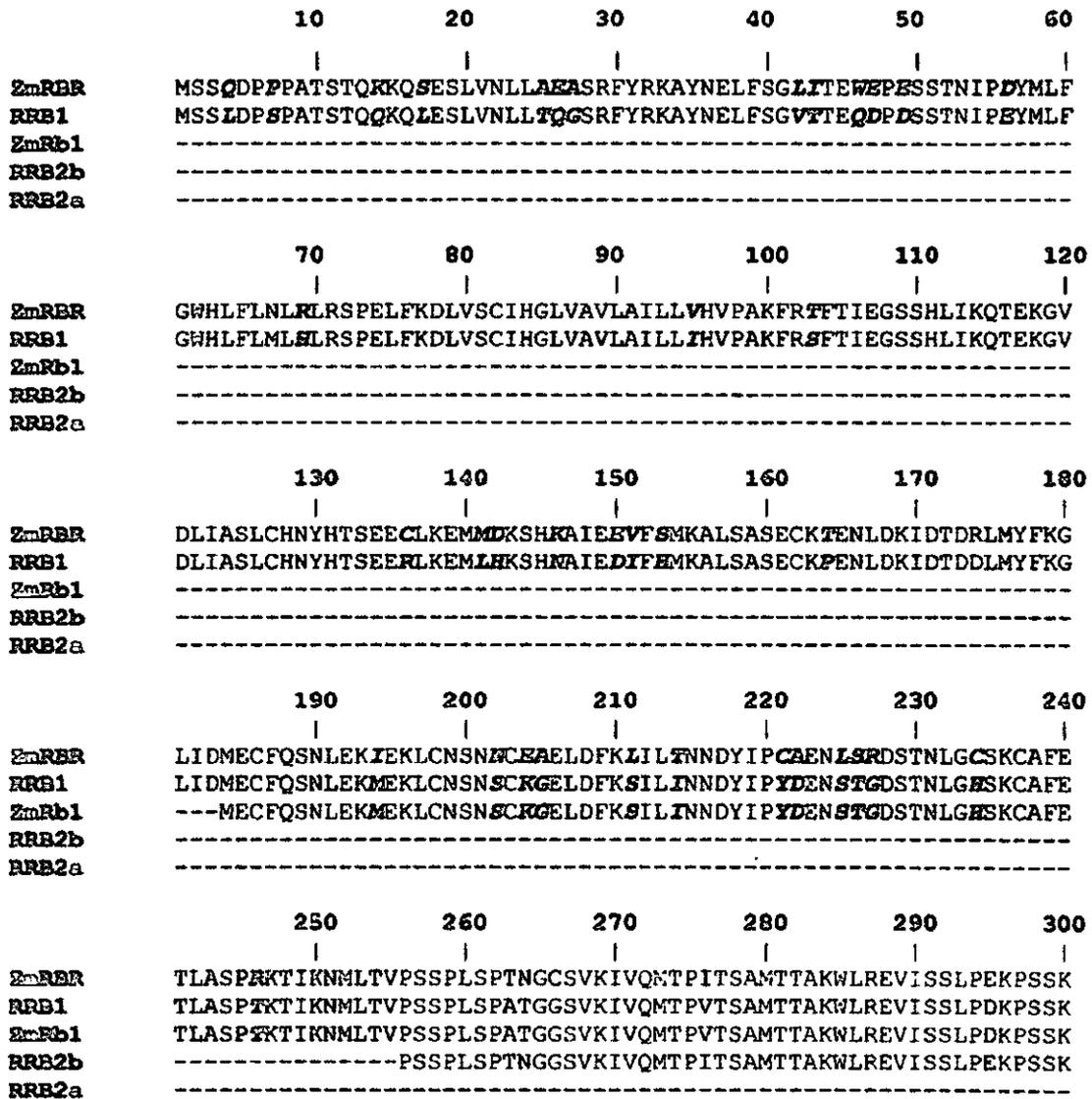


Figura 13. Continúa...

Alineamiento de la secuencia de la proteína deducida a partir de los exones traducibles del gen *ZmRBR*, con las secuencias de las proteínas deducidas a partir de los cDNAs *RRB1*, *ZmRb1*, *RRB2b* y *RRB2a*. Los aminoácidos que son diferentes se muestran en negritas e itálicas hasta el aminoácido 255, y en adelante, en color distinto al del bloque en el que se encuentran. Las líneas punteadas indican que no hay secuencia reportada en esa región, ya que *ZmRb1*, *RRB2a* y *RRB2b* son cDNAs parciales. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el algoritmo Multalin (Corpet, F., 1988).



	310	320	330	340	350	360
<b>2mRRR</b>						
<b>RRB1</b>	LQQLMSSCDRDLTYAVTERVSI	VLEAIFPTKSSADRGGSLGLN	CANAFDTLWADARKMEA			
<b>2mRb1</b>	LQQLMSSCDRDLTNAVTERVSI	VLEAIFPTKSSANRGVSLGLN	CANAFDIPWAEARKVEA			
<b>RRB2b</b>	LQQLMSSCDRDLTNAVTERVSI	VLEAIFPTKSSANRGVSLGLN	CANAFDIPWAEARKVEA			
<b>RRB2a</b>	-----					
	370	380	390	400	410	420
<b>2mRRR</b>						
<b>RRB1</b>	SKLYYRVLEAICRAELQNSVNNLT	PLLSNERFHRCLIACSADVL	LATHKTVIMMFP	PAVL		
<b>2mRb1</b>	SKLYYRVLEAICRAELQNSVNNLT	PLLSNERFHRCLIACSADVL	LATHKTVIMMFP	PAVL		
<b>RRB2b</b>	SKLYYRVLEAICRAELQNSVNNLT	PLLSNERFHRCLIACSADVL	LATHKTVIMMFP	PAVL		
<b>RRB2a</b>	-----					
	430	440	450	460	470	480
<b>2mRRR</b>						
<b>RRB1</b>	ESAGLTSFDLSKIIENFVRHEETL	PRELKRHLNSLEEQILESM	AWEKGSSLYNSLIVAR			
<b>2mRb1</b>	ESAGLTSFDLSKIIENFVRHEETL	PRELKRHLNSLEEQILESM	AWEKGSSLYNSLIVAR			
<b>RRB2b</b>	ESAGLTSFDLSKIIENFVRHEETL	PRELKRHLNSLEEQILESM	AWEKGSSLYNSLIVAR			
<b>RRB2a</b>	-----ELKRHLNSLEEQILESM					
	490	500	510	520	530	540
<b>2mRRR</b>						
<b>RRB1</b>	SVASEINRFGLLAESMPSLDDL	VARQNIHIEGLPATPSKKRA	AGRDDNADPRSPKRPCNE			
<b>2mRb1</b>	SVASEINRFGLLAESMPSLDDL	VARQNIHIEGLPATPSKKRA	AGRDDNADPRSPKRPCNE			
<b>RRB2b</b>	SVASEINRFGLLAESMPSLDDL	VARQNIHIEGLPATPSKKRA	AGRDDNADPRSPKRPCNE			
<b>RRB2a</b>	-----					
	550	560	570	580	590	600
<b>2mRRR</b>						
<b>RRB1</b>	SRSTVVEHNLOTPPPQCHMVL	TSLKAKCHELQSTFASPTV	SNPVGNEKCADVTI	QIFF		
<b>2mRb1</b>	SRSTVVEHNLOTPPPQCHMVL	TSLKAKCHELQSTFASPTV	SNPVGNEKCADVTI	QIFF		
<b>RRB2b</b>	SRSTVVEHNLOTPPPQCHMVL	TSLKAKCHELQSTFASPTV	SNPVGNEKCADVTI	QIFF		
<b>RRB2a</b>	-----					
	610	620	630	640	650	660
<b>2mRRR</b>						
<b>RRB1</b>	SKILKLAAIRIRNLCERIQYMEQ	TERVYNVFKQILDQQTTL	FFNRHIDQILLCCLY	GVAK		
<b>2mRb1</b>	SKILKLAAIRIRNLCERIQYMEQ	TERVYNVFKQILEQQTTL	FFNRHIDQILLCCLY	GVAK		
<b>RRB2b</b>	SKILKLAAIRIRNLCERIQYMEQ	TERVYNVFKQILDQQTTL	FFNRHMHQILLCCLY	GVAK		
<b>RRB2a</b>	-----					

Continuación de la Figura 13





#### 4.4 Análisis de la región 3'-UTR del gen *ZmRBR*

Al obtener la región codificante de gen *ZmRBR* como se describió en el inciso anterior, se identificó el codón de terminación TGA en el mismo marco de lectura. La secuencia comprendida entre el TGA y el sitio de clonación *Sst*I se consideró como la región 3'-UTR y se alineó con la región 3'-UTR de los cDNAs *ZmRb1*, *RRB1*, *RRB2a* y *RRB2b* (Figura 14).

Como se señaló en el capítulo de Antecedentes, existen dos cDNAs *RRB2*, *RRB2a* y *RRB2b*, cuyas secuencias sólo se conocen de manera parcial, debido a que son clonas truncadas hacia la región amino terminal. Dos regiones del transcrito *RRB2a* sufrieron corte de intrones y empalme de exones alternativo para dar origen al transcrito *RRB2b*. Uno de los eventos de corte y empalme ocurre dentro de la región codificante, dando como resultado proteínas con un extremo -COOH terminal diferente, el otro ocurre en la región 3'-UTR (Ach et al., 1997a).

La identidad de la región 3'-UTR del gen *ZmRBR* es del 97% con *RRB2b*, del 93%-97% con *RRB2a* y del 83%-88% con *RRB1* y con *ZmRb1*. Estos datos y los de % de Identidad de la región codificante se resumen en la Tabla 2.

Los resultados de S. blot sugieren que en el genoma de maíz existe más de un gen *RBR*. El hecho de que *ZmRBR* no tenga una Identidad del 100% en su región codificante y 3'-UTR con ninguno de los cDNAs de maíz reportados, sugiere la posibilidad de que sea un gen diferente, aunque muy relacionado, a los que codificarían las proteínas *RRB1*, *RRB2* y *ZmRb1*.

	REGION CODIFICANTE (aa)		REGION 3'-UTR ( nt )	
	% Identidad	% Homología	% Identidad	% Homología
<i>RRB1</i>	88	92	83-88	83-88
<i>ZmRb1</i>	89	92	83-88	83-88
<i>RRB2a</i>	97	97	93-97	93-97
<i>RRB2b</i>	98	98	97	97

Tabla 2

Se muestra el % de identidad y homología de la región codificante y de la 3'-UTR del gen *ZmRBR* con las correspondientes regiones codificantes y 3'-UTR de los diferentes cDNAs *RBR* de maíz.

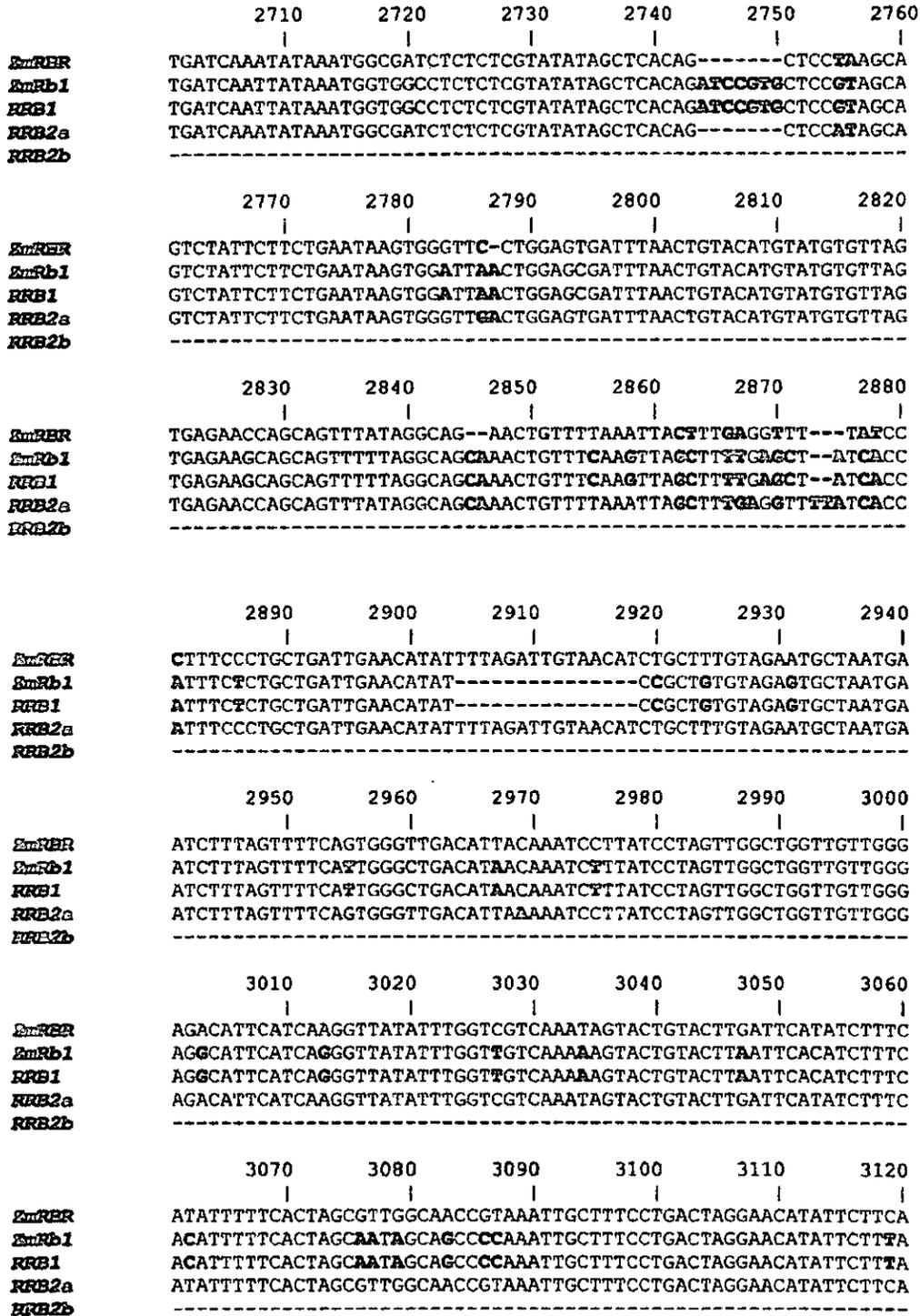


Figura 14, Continúa.

Alineamiento de la secuencia 3'-UTR del gen *ZmRBR* con la secuencia 3'-UTR de los cDNAs *ZmRb1*, *RRB1*, *RRB2a* y *RRB2b*. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el algoritmo Multalin (Corpet, F., 1988). Los aminoácidos diferentes se muestran en negritas



	3130	3140	3150	3160	3170	3180
<b>EnRRR</b>	CAAGTAT	-----GGCAACTCTAAACTATTTGA	-----CCTTTTATATTCTCATT	TTTTAAGT		
<b>EnRb1</b>	CAGGTAT	<del>AGCA</del> AGCCAACCTCTAAACTATATGAATCCT	TTTTTATATTCTCATT	TTTTAAGT		
<b>RRB1</b>	CAGGTAT	<del>AGCA</del> AGCCAACCTCTAAACTATATGAATCCT	TTTTTATATTCTCATT	TTTTAAGT		
<b>RRB2a</b>	CAAGTAT	-----GGCAACTCTAAACTATTTGA	-----CCTTTTATATTCTCATT	TTTTAAGT		
<b>RRB2b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3190	3200	3210	3220	3230	3240
<b>EnRRR</b>	ACTTTCTCTATTTCTGCTACTTTTGTACTGTGTATT	CCAGCTTCTCCACCAGACTGATT				
<b>EnRb1</b>	ACTT-CTCTGTTTCTGCTACTTTTGTACTGTATATT	CCAGCTTCTCCACAGACTGAT				
<b>RRB1</b>	ACTT-CTCTGTTTCTGCTACTTTTGTACTGTATATT	CCAGCTTCTCCACAGACTGAT				
<b>RRB2a</b>	ACTTTCTCTATTTCTGCTACTTTTGTACTGTGTATT	CCAGCTTCTCCACCAGACTGATT				
<b>RRB2b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3250	3260	3270	3280	3290	3300
<b>EnRRR</b>	GTTAGAGTGATGCTCCTATATTATCCATGTATGTGTA	AAATGGGCTGCTAGCCCATTAGG				
<b>EnRb1</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>RRB1</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>RRB2a</b>	GTTAGAGTGATGCTCCTATATTATCCATGTATGTGTA	AAATGGGCTGCTAGCCCATTAGG				
<b>RRB2b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3310	3320	3330	3340	3350	3360
<b>EnRRR</b>	GTTAGGTTCCCCCTGGGTCTATATATGTA	ACCACCCTCTATGCAATAGAA	TTGAATATC			
<b>EnRb1</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>RRB1</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>RRB2a</b>	GTTAGG-TTCCCCCTGGGTCTATATATGTA	ACCACCCTCTATGCAATAGAA	TTGAATATC			
<b>RRB2b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3370	3380	3390	3400	3410	3420
<b>EnRRR</b>	AAGTTTCTATCACTAATGATTCCATATTCAGTGGGCTGCAA	AGTGATTTGACAA	CCGTG			
<b>EnRb1</b>	-----	GATCCCATATTCAGTGGCTGCAA	GTGATTTGACAA	ATG		
<b>RRB1</b>	-----	GATCCCATATTCAGTGGCTGCAA	GTGATTTGACAA	ATG		
<b>RRB2a</b>	A-GTTTCTATCACTAATGATTCCATATTCAGTGGGCTGCAA	GTGATTTGACAA	ATG			
<b>RRB2b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3430	3440	3450	3460	3470	3480
<b>EnRRR</b>	CCTTATCCTTCAGGTATGCTCATCTTGACT	-----TCATTGCTTTT	GAAATGTA			
<b>EnRb1</b>	GCTTATCCTTCAGGTATGCTCATCTTGACT	-----TCATTGCTTTT	GAAATGTA			
<b>RRB1</b>	GCTTATCCTTCAGGTATGCTCATCTTGACT	-----TCATTGCTTTT	GAAATGTA			
<b>RRB2a</b>	CCTTATCCTTCAGGTATGCTCATCTTGACT	-----TCATTGCTTTT	GAAATGTA			
<b>RRB2b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	3490	3500	3510	3520	3530	3540
<b>EnRRR</b>	CTGTGGGCTTCATTGCTGGAATGCTGGTTATAATCAACCTT	ACTGCTCTATATTGTTCT				
<b>EnRb1</b>	CTGTTGAGTTCATTCTGG	-----TTACAATCAGCCTTTACTGCT	TTATATTGTTCT			
<b>RRB1</b>	CTGTTGAGTTCATTCTGG	-----TTACAATCAGCCTTTACTGCT	TTATATTGTTCT			
<b>RRB2a</b>	CTGTTGGCTTCATTGCTGGAATGCTGGTTATAATCAACCTT	ACTGCTCTATATTGTTCT				
<b>RRB2b</b>	CTGTTGGCTTCATTGCTGGAATGCTGGTTATAATCAACCTT	ACTGCTCTATATTGTTCT				

	3550	3560	3570	3580	3590	3600
<b>EnRRR</b>	TTT---TTTGGTTTGCACAACCCAGGGTGGTGGTTTCTGAATCAATCAATCCATTTCCT					
<b>EnRb1</b>	ACTAAATTTGGCTTGCACAGCCAGGACGATTGGTTTCTGCATCAATCAATCTTTT					
<b>RRB1</b>	ACTAAATTTGGCTTGCACAGCCAGGACGATTGGTTTCTGCATCAATCAATCTTTT					
<b>RRB2a</b>	TTT---TTTGGTTTGCACAACCCAGGGTGGTGGTTTCTGAATCAATCAATCCATTTCCT					
<b>RRB2b</b>	TTT---TTTGGTTTGCACAACCCAGGGTGGTGGTTTCTGAATCAATCAATCCATTTCCT					

Continuación de la Figura 14





	4090	4100	4110	4120	4130	4140
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	CAAGCTCAGGCTATATGATTCCAGCAGCACTGTAACCTGGGGTGCAAATGTGAAGGCCCT					
<i>RRB1</i>	GGAGCTCATGTCAT--GATTCCAGCTGCACCGT-----GT-CAAATGTGAAGGCCCT					
<i>RRB2a</i>	GGAGCTCATGTCAT--GATTCCAGCTGCACCGT-----GTGCAAATGTGAAGGCCCT					
<i>RRB2b</i>	CAAGCTCAGGCTATATGATTCCAGCAGCACTGTAACCTGGGGTGCAAATGTGAAGGCCCT					
	4150	4160	4170	4180	4190	4200
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	GCAAGCACTTCCAGGCCACACCAATCTGCTGGTCTTGAAGATACATTCTTCCTAGG					
<i>RRB1</i>	GCAAGC-CTTCCAGGCCACACCAATCTGCTGGTCTTGAAGATACATATG-----G					
<i>RRB2a</i>	GCAAGCCTTCCAGGCCACACCAATCTGCTGGTCTTGAAGATACATTCTTCCTATG					
<i>RRB2b</i>	GCAAGCACTTCCAGGCCACACCAATCTGCTGGTCTTGAAGATACATTCTTCCTATG					
	4210	4220	4230	4240	4250	4260
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	TGCCACCTATATAAAAGCCATTCTGCTGGTGTATGTTATCCTTGACATGTCAACAGATC					
<i>RRB1</i>	TGCCACCTATAAAAGCTGTTCTGGTT---ATGCTCTCCTTGACATGTCAACAGATT					
<i>RRB2a</i>	TGCCACCTATAAAAGCCATTCTGCTGGTGTATGTTATCCTTGACATGTCAACAGATT					
<i>RRB2b</i>	TGCCACCTATAAAAGCCATTCTGCTGGTGTATGTTATCCTTGACATGTCAACAGATT					
	4270	4280	4290	4300	4310	4320
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	AGTGTGGGTTGCAGTCATGCGGTCCTTAAGTCCGGAGAAGCGAGAAGTCATTGCTGC					
<i>RRB1</i>	AGTGTGGGTTGCAGTCATGCGGTTCTTAAGTCTGGAGAAGCGAGAAGTCATTGCTGC					
<i>RRB2a</i>	AGTGTGGGTTGCAGTCATGCGGTCCTTAAGTCTGGAGAAGCGAGAAGTCATTGCTGC					
<i>RRB2b</i>	AGTGTGGGTTGCAGTCATGCGGTCCTTAAGTCTGGAGAAGCGAGAAGTCATTGCTGC					
	4330	4340	4350	4360	4370	4380
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	TAGCATTGTGATCGTCGGCCACAAAGTAATCAAAAAGTGAGAGCTACTT-GTTCCTAGC					
<i>RRB1</i>	CAGCATTGTGATCGTCAGGCACAGAGTACTCAAAA-GTGAGAGCTACTT-GTTCAGC					
<i>RRB2a</i>	CAGCATTGTG-TGTCAGGCACAGAGTACTCAAAA-GTGAGAGCTACTTGTTCAGC					
<i>RRB2b</i>	TAGCATTGTGATCGTCGGCCACAAAGTAATCAAAAAGTGAGAGCTACTT-GTTCCTAGC					
	4390	4400	4410	4420	4430	4440
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	AAATCGAGAAGGGCGATATATAGGTTGATGATCGT-----					
<i>RRB1</i>	AAACCGAGGCG-----ATATACGTTGATAGCCAAATTCAGTCTCTATATACAAGCAGC					
<i>RRB2a</i>	AAACCGAGGCG-----ATATAGGTTGATAGCCAAATTCAGTCTCTATATACAAGCAGC					
<i>RRB2b</i>	AAATGGAGAAGGGCGATATATAGGTTGATGATCAATTCAGT-----TATGCAAGCAGC					
	4450	4460	4470	4480	4490	4500
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	GGATTTGTTAGAGTTAGCTTTTGAGATGCATCATTTC-TTTCACACTGATTCTCTGT					
<i>RRB1</i>	GGATTTGTTAGAGTTAGCTTTTGAGATGCATCATTTC-TTTCACACTGATTCTCTGT					
<i>RRB2a</i>	GGATTTGTTAGAGTTAGCTTTTGAGATGCATCATTTCATTTCACACTGATTCTCTAT					
<i>RRB2b</i>	GGATTTGTTAGAGTTAGCTTTTGAGATGCATCATTTCATTTCACACTGATTCTCTAT					
	4510	4520	4530	4540	4550	4560
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	-----					
<i>RRB1</i>	GTTGTAACCTCG-AGTCGGGTAGAAATTAGAATGCTAACTGACC-TTAATTTTACCAGAA					
<i>RRB2a</i>	GTTGTAACCTCG-AGTCGGGTAGAAATTAGAATGCTAACTGACCCTTAATTTTACCAGAA					
<i>RRB2b</i>	GTTGTAACCTCTTAGTCGGGTAGAAATTAGAATGCTAACTG---CTTAATTTTACCAGAA					
	4510	4520	4530	4540	4550	4560
<i>EmRER</i>						
<i>EmRb1</i>	-----					
<i>RRB1</i>	GTTGTAACCTCG-AGTCGGGTAGAAATTAGAATGCTAACTGACCCTTAATTTTACCAGAA					
<i>RRB2a</i>	GTTGTAACCTCTTAGTCGGGTAGAAATTAGAATGCTAACTG---CTTAATTTTACCAGAA					
<i>RRB2b</i>	GTTGTAACCTCTTAGTCGGGTAGAAATTAGAATGCTAACTG---CTTAATTTTACCAGAA					



```

          4570      4580      4590      4600      4610      4620
          |         |         |         |         |         |
ZmRBR    -----CGACTCCCITTTAGGACGGTTATTGAGCTC-----
ZmRb1    TAATTTGCTAGCGTITTTTCAGTATCAAATCCTTGTC-----TTAAAAA
RFB1     TAATTTGCTAGCGTITTTTCAGTATGAAAAAAAAA-----AAAAAAA
RFB2a    TAATTTGCTAGTATATTTTGAATGTAATTGCAGTAGCTCTGCCCTTTCAATAAGAAAAA
RFB2b    TAATTTGCTAGTATATTTTGAATGTAATTGCAGTAGCTCTGCCCTTTCAATAAAAAAAAA

          4630
          |
ZmRBR    -----
ZmRb1    AAAAAAAAAAAA-
RFB1     AAAAAAAAAAAA
RFB2a    AAAAAAAAAAAA
RFB2b    AAAAAAAAAAAA--

```

Continuación de la Figura 14



#### 4.5 Estructura del gen *ZmRBR*

La estructura del gen *ZmRBR* está esquematizada en la Figura 15 a partir de la secuencia que se mostró anteriormente (Figura 8). La región codificante del gen *ZmRBR* está contenida en 15 exones cuyos tamaños varían entre 42 y 1246 pb. El exón 15 contiene el codón de terminación TGA y 1104 pb de la región 3'-UTR que se interrumpe por un intrón de 207 pb antes del exón 16, el cual que contiene 368 pb de región 3'-UTR. El sitio *Sst*I de clonación en la subclona RB9000S se encuentra en el intrón 16. Una característica interesante de la estructura del gen es que el exón 7, el más largo de los traducibles, contiene completo al "bolsillo A", mientras que la región traducible del "bolsillo B" está contenida en los exones 9, 10, 11 y 12. los dominios "bolsillo" A y B son característicos de las proteínas Rb.

Los tamaños de los exones e intrones, así como los sitios de corte de intrones y empalme de exones, donadores y aceptores, se presentan en la Tabla 3.

Los intrones de planta son 15% más ricos en AT que los exones flanqueantes, los cuales son 15% más ricos en GC; en el caso del gen *ZmRBR* la última característica se observa sólo en cuatro de los quince exones identificados (exones 2, 4, 8 y 9, tabla 3) (Luehrsen et al., 1994).

En la tabla 3 se muestra el % de AT de los intrones y exones del gen *ZmRBR*.

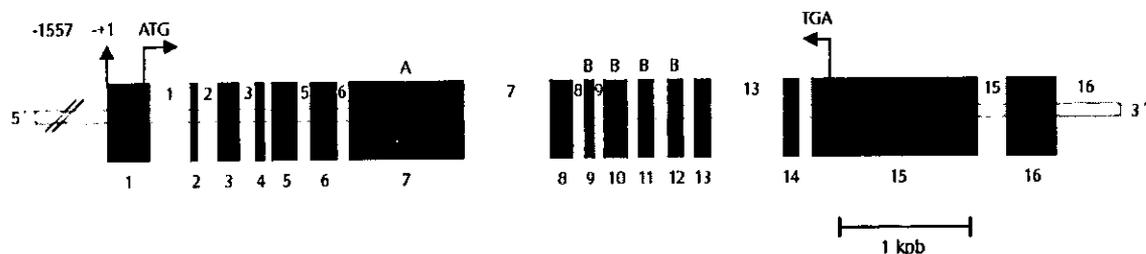


Figura 15. Esquema de la estructura del gen *ZmRBR*

Los bloques negros representan los exones del gen y se indican aquellos que codifican los dominios «bolsillo» A y B, así como el codón de inicio ATG y el codón de terminación TGA. La posición +1 indica el sitio de inicio de la transcripción determinado por extensión de cebador. Los intrones se indican con la línea gris que atraviesa los bloques negros.



Exón	Seuencia en el límite exón-Intrón	Intrón	Intrón	Exón		
					No., tamaño (pb)	5' sitio donador
1	42	CAAAG <sup>42</sup> /gtatacc	tccagcag <sup>/43</sup> AAGCAA	298	49	51
2	45	AGCAGG <sup>67</sup> /taatgatg	acgccagg <sup>/68</sup> TTCTAC	162	64	50
3	183	GTATTG <sup>270</sup> /gtcagttt	caatgcag <sup>/271</sup> GCCATA	122	60	58
4	66	CACTTA <sup>336</sup> /agtaattc	gaattcag <sup>/337</sup> ATCAAAC	64	72	55
5	180	GACACA <sup>516</sup> /ggcatgg	tctgtccag <sup>/517</sup> GATCGC	101	59	65
6	192	TCAAAG <sup>700</sup> /gtatccgg	tttggcag <sup>/709</sup> TGTGCC	88	58	66
7	870	GGTCGA <sup>1578</sup> /ggtaattg	gtttcttca <sup>/1579</sup> GACGAC	651	66	57
8	156	TTTGCA <sup>1731</sup> /aggllagt	taltttgc <sup>/1732</sup> AGTCCA	92	68	52
9	75	TCCAAA <sup>1806</sup> /gtatggatt	tttcttcag <sup>/1807</sup> ATTCTG	85	73	59
10	174	GCAAAG <sup>1980</sup> /gtatcgttt	ctgacag <sup>/1981</sup> GTTTGC	79	59	64
11	114	AATGGG <sup>2004</sup> /gtatgatac	tcaacag <sup>/2005</sup> GTATTA	102	65	65
12	126	GCTAGT <sup>2220</sup> /ggataat	tcttgctta <sup>/2221</sup> GGCCAA	79	64	61
13	114	ACCAAG <sup>2334</sup> /gttttttctg	cttatcag <sup>/2335</sup> ATGGAT	557	64	56
14	117	AATTAT <sup>2451</sup> /gtatgaatc	tttgcag <sup>/2452</sup> AATGGT	93	68	58
15	1252	CAGGTC <sup>3697</sup> /attcaaaa	gcagggtt <sup>/3698</sup> AGGTGT	207	53	61
16	369	ATGATC <sup>4066</sup> /gagtcga	- - - - -	---	---	---

Tabla 3. Secuencias donadoras yceptoras de los intrones del gen *ZmRBR*

Organización parcial intrón-exón del gen *ZmRBR* contenido en la clona RB9000S. Se muestra la secuencia de los exones adyacentes (letras mayúsculas) a la de cada intrón (letras minúsculas). En supraíndices se señalan las posiciones de los nucleótidos correspondientes a la secuencia putativa de cDNA. El exón 15 contiene el codón de terminación TGA. En negritas se muestran las secuencias donadoras yceptoras en el corte de intrones y empalme de exones de *ZmRBR*.



### 4.6 Análisis de la región 5' del gen *ZmRBR*

#### A) Mapeo del sitio de inicio de la transcripción en el gen *ZmRBR*

La localización del sitio de inicio de la transcripción se llevó a cabo por medio de ensayos de extensión de cebador utilizando el oligonucleótido RBNH2R y RNA total de hoja y tallo de plántula de maíz. De acuerdo al mapa de exones, RBNH2R abarca los nucleótidos 242-260 "corriente abajo" del ATG de inicio del gen *ZmRBR*, según se muestra a continuación:

```

1ATGCTTCGCGAGGACCCTCCGCCGGCGACGAGCACCCAAAAGAAGCAATCGGAGAGTTTGGTAAACC
TACTGGCAGAGGCAAGCAGGTTCTACCGCAAAGCATATAATGAACTGTTCTCAGGTTAATTACTGAGTG
GGAGCCTGAATCATCTACTAATCTCCCTGACTATATGCTTTTTGGTTGGCATCTCTTCCTAACCTTCGTTT
GAGATCACCAGAATTGTTCCAAGACCTGGTGT CCTGCATCCATGGATTAGT 260
                                     ←
                                     RBNH2R

```

El producto de extensión de cebador se observa como un doblete en los carriles señalados como H y TA en la Figura 16. En H se utilizó como fuente de RNA al de hoja de plántulas de maíz de dos semanas de edad, en TA se usó RNA total del tallo de plántulas de dos semanas de edad.

El tamaño de cada una de las bandas del doblete se estimó en 541 y 549 pb por medio de la reacción de secuenciación que se corrió simultáneamente en el gel en donde se corrieron los productos de extensión de cebador, y se localizaron a 281 y 289 pb "corriente arriba" del ATG, en el motivo TAATAT; este hexanucleótido es similar a la secuencia CTAATAT, en la que se localiza el sitio de Inicio de la transcripción del gen que codifica la zeína de 19 kDa (Pedersen et al., 1982), una proteína de almacenamiento en maíz (Geraghty et al., 1981). Por lo anterior, se asume que las bandas corresponden a sitios putativos de inicio de la transcripción en el gen *ZmRBR*, sin embargo no se tienen más elementos para definir exactamente cual de ellas corresponde al sitio de inicio de la transcripción, o bien si hay más de uno en *ZmRBR*, por lo que se decidió asignar como tal sitio en el gen, con la posición +1, al nucleótido ubicado a 289 pb «corriente arriba» del sitio de inicio de la traducción, como se muestra en la siguiente secuencia.

```

                                     549      541
                                     +1 ↓ (289) ↓ (281)
AGATATAGATTTATTTATTTATTAATAATAATAATATAGTAAATTTAATATAATAATATACGATAGATA
TAGAAATAAAATAGATATATACAGATATAGATGGATAAAAAGTATGATGTTGTTAATTGCAACAGGAGTGG
ACTTGTGAGAGCGTGGATCCGCTTCCGTGCTTCGGGGCTGTTTCGAGTCATCGTCCGCATCGCACGCCGT
TTATTGAGGAACAATTCGTTTTTATTCTCACGTTTATTCCGCGGGCGCAGGTTTTTTTTCGTGGCGATCGC
TGACCGTAGCGGCCACCTCCGCCAGGTGGCCAGGTTTTCGTGTGGCCCTCCGCC ATG
TCTTCGCGAGGACCCTCCGCCGGCGACGAGCACCCAAAAGAAGCAATCGGAGAGTTTGGTAAACCTACTG
GCAGAGGCAAGCAGGTTCTACCGCAAAGCATATAATGAACTGTTCTCAGGTTAATTACTGAGTGGGAGC
CTGAATCATCTACTAATCTCCCTGACTATATGCTTTTTGGTTGGCATCTCTTCCTAACCTTCGTTTGAGAT
CACCAGAATTGTTCCAAGACCTGGTGT CCTGCATCCATGGATTAGT
                                     ←
                                     RBNH2R

```



La secuencia en donde se localizan los sitios de inicio de la transcripción es una región rica en A's y T's, y hacia 5' de esta posición se pueden localizar algunas secuencias que podrían funcionar como caja TATA.

### B) Secuencias flanqueantes del gen *ZmRBR*

El análisis de la secuencia "corriente arriba" del sitio de inicio de la transcripción de *ZmRBR* identificó una región de 570 pb, que comprende del nucleótido -1500 al -929 y que tiene una identidad por BLAST (Altschul et al., 1997) de más del 80% con el 5'-LTR (Long Terminal Repeat) del retrotransposón JI-6, así como también con el retroelemento PREM-2 y con la secuencia nuclear autónoma de replicación ARS 3. En la Figura 17 se muestra el alineamiento por BLAST con el 5'-LTR de JI-6.

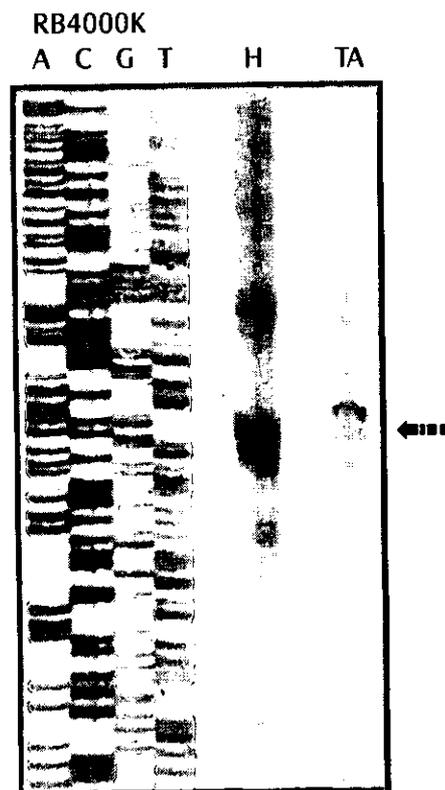


Figura 16. Identificación de los sitios de inicio de la transcripción en el gen *ZmRBR*

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida al 4.5 %, en el que se corrieron los productos del ensayo de extensión de cebador y los de secuenciación de la clona RB4000K.

(A, C, G y T) indican los carriles en donde se corrieron las reacciones de secuenciación de la clona RB4000K. Se utilizó como oligonucleótido en estas reacciones a RBG 1600.

(H) Producto del ensayo de extensión de cebador a partir del RNA total de hoja de plántula de maíz de dos semanas de edad.

(TA) Producto del ensayo de extensión de cebador a partir del RNA total de tallo de plántula de maíz de dos semanas de edad.

En los ensayos se utilizaron 15  $\mu$ g de RNA total de hoja o de tallo y el oligonucleótido RBNH2R.

El gel de secuenciación se corrió a 2800 V, durante 10 h.



Identidad = 86%

\*

**sfgn**: -1499 aactcaaatttacaactttaagccaactacaagt cagggttagcgtagaataaatcc -1440  
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

**Ji-6** : 1139 aactgaaatttaca-ctttaacacactacaagccgggttagtgtagaataaatcc 1081

**sfgn**: -1439 gagtccaaaag-gagagggaaaccaatcacccaaagaatatageggatgacaagttga -1381  
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

**Ji-6** : 1080 aagtccggaagagaggggaaaaacaaatcaaccaagaagtaaagtggatgacacagtga 1021

**sfgn**: -1380 tttgttttaccgaggttcgggttcttgcaaacctagccccggtgaggtggaacaaagac -1321  
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

**Ji-6** : 1020 tttgttttaccgaggtttgggttctaataaacctagccccggtgaggtggtcacaatac 961

**sfgn**: -1320 ggggtctctttcaaccctttccctctctcaaacggtcacctagaccgagtgagctttctt -1261  
| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||

**Ji-6** : 960 cgagctctctttcaaccctttccctctctcaaacggtcacctagaccgagtgaggtctctc 901

**sfgn**: -1260 cttaatcaaacgggtcacttagaccctcacaaggacca-cacacaacttgggtgtctctt -1201  
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||

**Ji-6** : 900 cttaatcaaacgggtcacttagacc--cacaaggatcaccacac-acttgggtgtctctt 844

**sfgn**: -1200 gctttgattacaagt -1186  
||||| ||||||| |||

**Ji-6** : 843 gctttgattacaagt 829

**sfgn**: -1148 ccctggtgcaccgaacagt-ccggtgcccagaccagggttctcttcgggtttttttgct -1090  
||||| ||||||| ||| ||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||

**Ji-6** : 224 ccctggtgcaccggacactgcccgtgcccagaccagggtg-tcttcggtttcttttctt 166

**sfgn**: -1089 cctttctttt-gaacctaactttgatctttttattggtttgggttgaaccttttgacc -1031  
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||

**Ji-6** : 165 cctttctttttgaaccttaactt-gatctttttatttggtttgggttgaacctttaccatc 107

**sfgn**: -1030 tatagaacatat---ctagagcaaacctagtttagtccaattatttgtattgggcatttcaa -974  
| ||||||| ||| ||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||

**Ji-6** : 106 tgtagaatatataatctagagcaaacctagtttagtccaattatttgttgggca-ttcaa 48

**sfgn**: -973 ccaccaaatacatttat--gaaaaggtttgacctatttccctttca -929  
||||| ||||||| ||| ||| ||||||| ||| ||| ||||||| |||

**Ji-6** : 47 ccaccaaataattttataggaaaaggttaaacctatatttctctttca 1

Figura 17

Alineamiento por BLAST entre la secuencia flanqueante del gen *ZmRBR* (\* sfgn) y el 5'-LTR del retroelemento Ji-6.



#### 4.7 Análisis de la expresión del gen *ZmRBR* a nivel de RNA mensajero

Mediante ensayos de RT-PCR, debido a que la expresión de *ZmRBR* en diferentes tejidos de maíz no pudo ser detectada por Northern blot, se estudió la expresión del gen en el RNA total de hoja de plántula de maíz de una y dos semanas de edad, del tallo y de la raíz completa de plántula de dos semanas de edad, y del eje embrionario y del embrión de la semilla seca (figura 18 A). Los oligonucleótidos que se utilizaron en estos ensayos fueron los denominados RBNH2F y RBNH2R, cuyas secuencias flanquean al exón 3 del gen *ZmRBR*. La secuencia de ambos en el exón 3 se muestra a continuación:

##### EXON 3

```
TTCTACCGCAAAGCATATAATGAACTGTTCTCAGGTTTAATTACTGAGTGGGAGCCTGAATCATC
      RBNH2F                                     |
TACTAATCTCCCTGACTATATGCTTTTGGTTGGCATCTCTCCTAACCTTCGTTGAGATCACCAGAATT
                                     Sau 3AI
GTTCCAAGACCTGGTGCCTGCATCCATGGATTAGTTGCTGTATTGGTCCAG
      RBNH2R
```

En la reacción con la transcriptasa reversa se utilizó el oligo RBNH2R para la síntesis del cDNA y en la reacción de amplificación por oligonucleótidos.

El producto de la reacción de RT-PCR que se espera es de 168 pb, mismo que se observa en la Figura 18 B, cuando se utilizó RNA total de hoja de plántula de una semana de edad (carril H1), de hoja de plántula de dos semanas de edad (carril H2) y del tallo de plántula de dos semanas de edad (carril T2). No se observó amplificación a partir de RNA del eje embrionario de la semilla seca (carril EE), del embrión de la misma (carril E) y de la raíz de plántula de dos semanas de edad (carril R2). En los ensayos se utilizó la misma cantidad de RNA total (10  $\mu$ g) para todos los tejidos.

Podría darse el caso de que en los tejidos en los que no se detecta la presencia del mensaje éste sí estuviera, pero en cantidades tan pequeñas que no fuera posible visualizarlo en un gel teñido con bromuro de etidio, razón por la cual ese mismo gel se transfirió a una membrana de nylon que se hibridó con una sonda de DNA que era el mismo producto de PCR, pero obtenido a partir del DNA de una subclona de  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2.

Los resultados de la hibridación se muestran en la figura 18 C, en donde se puede observar que las únicas bandas de hibridación que se detectan corresponden a los carriles en los que se nota la presencia del producto de PCR (carriles H1, H2 y T2). Además, el ensayo de Southern blot nos permitió confirmar la identidad del fragmento de DNA amplificado por PCR. Esto también se corroboró por ensayos de restricción, ya que en la secuencia del producto de PCR se puede localizar un sitio de restricción para la enzima *Sau* 3AI, de manera que al hacer una digestión del producto de PCR con esta enzima se generan dos fragmentos, uno de 124 pb y otro de 48 pb. Este hecho nos permitió confirmar de otra manera que el producto de PCR no es un artificio, ya que al realizar un ensayo de restricción del producto de PCR con *Sau* 3AI, se obtuvieron dos fragmentos del tamaño esperado (Figura 18 D, carriles TD y HD).



En estos ensayos se ha visto una expresión diferencial del (los) gen (es) RBR de maíz en los tejidos estudiados, puesto que su presencia es muy clara en hoja y tallo, no así en raíz, en el eje embrionario, ni en el embrión de la semilla seca.

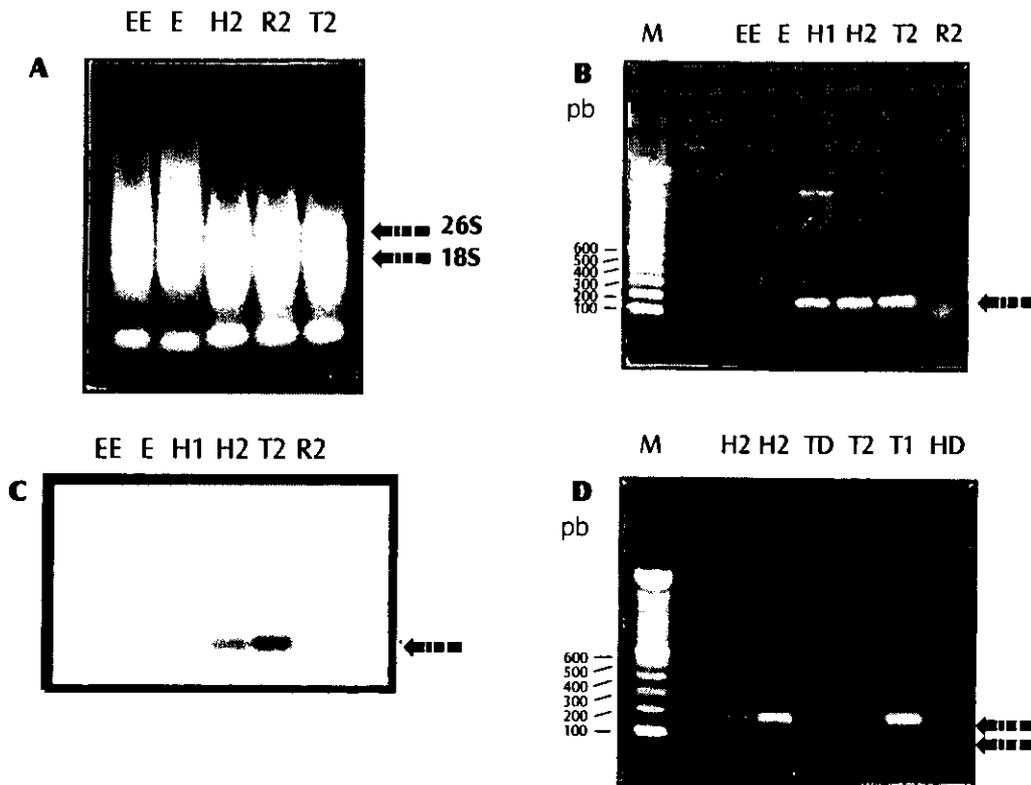


Figura 18. Análisis de la expresión del gen *ZmRBR*, por RT-PCR

- (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de RNA total de (EE, E) eje embrionario y embrión, respectivamente, de semilla seca, (H2, R2 y T2) hoja, raíz completa y tallo, respectivamente, de plántulas de maíz de 2 semanas de edad. Las flechas indican los tamaños de los RNA ribosomales de maíz.
- (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de amplificación, por RT-PCR, del mensaje de *ZmRBR* en (EE, E) eje embrionario y embrión, respectivamente, de semilla seca, (H1) hoja de plántulas de 1 semana de edad, (H2) hoja de plántulas de 2 semanas de edad, (T2) tallo de plántula de 2 semanas y (R2) raíz completa de plántulas de dos semanas de edad. (M) Marcadores de tamaño de 100 pares de bases. La flecha indica el producto de RT-PCR.
- (C) Southern blot de los productos de RT-PCR señalados en (B). La hibridación se llevó a cabo a 68°C, utilizando como sonda el producto de PCR denominado "Exón 3". La flecha indica la hibridación correspondiente al producto de RT-PCR.
- (D) Digestión con *Sau*3AI de los productos de RT-PCR de (TD) tallo y (HD) hoja de plántulas de 2 semanas de edad. (H2) producto de RT-PCR a partir de RNA total de hoja de plántula de 2 semanas de edad y (T1, T2) producto de RT-PCR a partir de RNA total de tallo de plántulas de una y dos semanas de edad, respectivamente. Las flechas indican los fragmentos resultantes de la digestión del producto de RT-PCR con *Sau*3AI.



#### 4.8 Análisis de los niveles de proteínas RBR en diferentes tejidos de maíz

Con el propósito de estudiar los niveles de la proteína ZmRBR en diferentes tejidos de la planta y en la semilla de maíz, se llevaron a cabo ensayos de Western blot.

Debido a que no se contaba con un anticuerpo dirigido contra la proteína ZmRBR se decidió utilizar un anticuerpo policlonal obtenido contra el "bolsillo" A/B de una proteína RBR, la proteína recombinante ZmRb1. El "bolsillo" A/B está altamente conservado entre las proteínas RBR de maíz al igual que entre las proteínas Rb de animales, por lo que se esperaba que entre las proteínas inmunodetectadas estuviera la proteína ZmRBR.

En la figura 19A se muestra una membrana teñida con Rojo de Ponceau después de la inmunodetección con extractos proteicos totales ( $40\mu\text{g}$  por carril), separados previamente mediante un gel de poliacrilamida y obtenidos de: eje embrionario de maíz (carril E), hoja de plántula de maíz de dos semanas de edad (carriles H2), raíz completa de plántula de dos semanas de edad (carriles R2), puntas de las raíces de semillas embebidas en agua por tres días (carriles PR) y tallo de plántulas de dos semanas de edad (carriles T2).

En el gel de poliacrilamida se cargó la misma cantidad de proteínas, cuantificadas por el método de Bradford, de cada uno de los tejidos. Sin embargo, en la figura se puede observar que el patrón de bandas es diferente para cada tejido, lo que hace difícil la estimación visual del cargado de éstas. Los carriles H2, R2 y T2 son repeticiones. En los carriles R2 la cantidad de proteína total de raíz que se cargó es apenas perceptible.

La inmunodetección se llevó a cabo con el anticuerpo policlonal denominado RB- $\Delta$ AB (Figura 19B). Se inmunodetectaron dos proteínas, que varían entre los 95 y 100 kDa, tamaño que se espera para las proteínas RBR de maíz, y que podrían corresponder al tamaño de la proteína ZmRBR en hoja (carriles H2) y en tallo (carriles T2) de plántulas de dos semanas de edad; en las puntas de la raíz de semillas embebidas en agua por tres días se observa la presencia de dos proteínas, una de  $\sim 60$  kDa y la otra de  $\sim 35$  kDa (carril PR), en el eje embrionario solo se inmunodetectó una proteína, de  $\sim 35$  kDa; en la raíz completa de plántulas de dos semanas de edad (carriles R2) no se detectaron proteínas, debido muy probablemente a que la cantidad de proteína que se cargó es muy baja.

El tamaño de las proteínas que se inmunodetectaron en las puntas de las raíces de las semillas embebidas en agua durante tres días, de  $\sim 60$  kDa y  $\sim 35$  kDa, sugiere que podrían ser los productos de la proteólisis de las proteínas de entre 95 y 100 kDa que se inmunodetectan en los extractos de hoja y de tallo, aunque durante la extracción de proteínas se utilizaron inhibidores potentes de proteasas, así como urea y SDS.

Otra posibilidad para explicar la presencia de las proteínas de  $\sim 60$  kDa y  $\sim 35$  kDa, es que se trate de dos proteínas serológicamente relacionadas a la familia "bolsillo", puesto que el anticuerpo con el que se llevó a cabo el Western está dirigido contra el "bolsillo" A/B, la región más conservada en las proteínas RBR.

Estos ensayos son la primera aproximación en el estudio de los niveles de proteína ZmRBR en diferentes tejidos de maíz y corroboran la dificultad que han tenido otros autores en la identificación y determinación del peso molecular de la(s) proteína(s) RBR de plantas. Para tener ensayos más específicos es necesaria la obtención de anticuerpos dirigidos contra dominios específicos de la proteína ZmRBR.

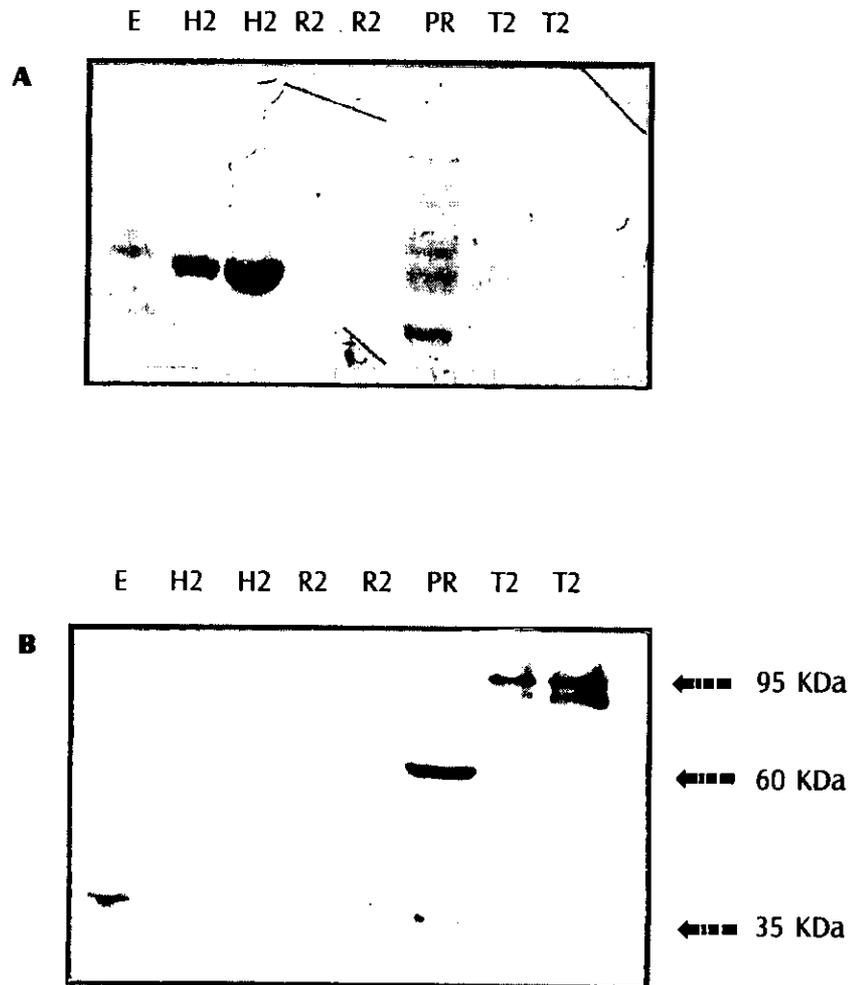


Figura 19. Análisis de los niveles de la proteína ZmRBR en diferentes tejidos de maíz

(A) Membrana de PVDF, teñida con Rojo de Ponceau, después de la Inmunodetección.

(B) Inmunoblot. Se utilizaron extractos proteicos totales de (E) eje embrionario de semilla seca, (H2) hoja de plántula de dos semanas de edad, (R2) raíz completa de plántulas de dos semanas de edad, (PR) puntas de raíz de semillas embebidas en agua por tres días, (T2) tallo de plántulas de dos semanas de edad y el anticuerpo policlonal RB- $\Delta$ AB. La detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia. Tiempo de exposición, 15 min.



## DISCUSIÓN

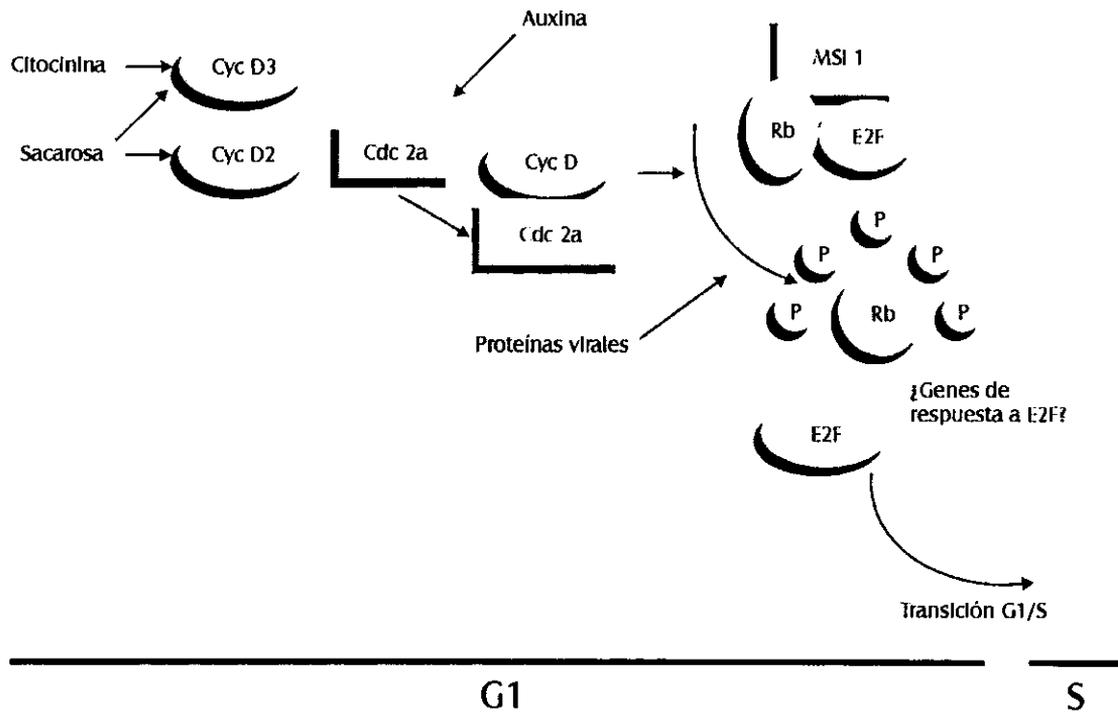
A diferencia de los animales, las plantas son organismos que han desarrollado una gran capacidad de adaptación a distintos ambientes, así como en la respuesta a factores externos; tienen un estilo de vida notablemente diferente al de los animales, empezando porque no se pueden desplazar de manera autónoma. A nivel de organismos y órganos, las diferencias entre plantas y animales son notables, por ejemplo, en la organización corporal y en el desarrollo. La ausencia de migración celular, la existencia de un proceso morfogenético continuo y la plasticidad de las plantas requieren de una proliferación celular continua y de la existencia de programas génicos altamente regulados (Gutierrez, 1998).

Con relación al ciclo celular, estructuralmente el de las plantas difiere del de los animales en las etapas tempranas de la mitosis en donde antes de la formación del huso, un arreglo microtubular, la banda de profase, define el futuro plano de división de la célula y, al final de la mitosis, en donde otro arreglo microtubular, el fragmoplasto, está involucrado en la citocinesis. Mutantes con defectos en la citocinesis o en el control del plano de división celular exhiben efectos dramáticos en el desarrollo de la planta, apoyando la idea de que la posición y/o la orientación del plano de división celular es crucial para el desarrollo de la planta.

A pesar de estas diferencias, la suposición de que los mecanismos moleculares básicos de funcionamiento del ciclo celular son similares en todas las células eucarióticas ha proporcionado un punto de partida conveniente para el estudio de la división celular en las plantas superiores (Doonan et al, 1997).

Durante los últimos años se han caracterizado proteínas y cDNAs en plantas que son homólogas funcionales, o que tienen una alta similitud con proteínas del ciclo celular de los animales y las levaduras. Los ejemplos más notables son las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), consideradas como reguladores centrales del ciclo celular de los animales; asimismo, se ha demostrado la existencia de cinasas activadoras de CDKs (CAKs) y de inhibidores de CDKs (CKIs) en algunas especies vegetales (Mironov, 1999). Sin embargo, aún existen preguntas acerca del control de la entrada, el mantenimiento y la salida del ciclo celular en las plantas con relación a sus procesos particulares de desarrollo y crecimiento.

El aislamiento en diferentes especies de plantas de los componentes de la "ruta del retinoblastoma" caracterizada en células animales (Figura 20), indica que una vía similar podría operar en la regulación de la proliferación celular en las plantas.



**Figura 20. Modelo para el control de la transición G1-S en plantas**

Las ciclinas tipo D (Cyc D) responden a señales de crecimiento tales como citocinina y sacarosa, y se asocian con la subunidad cinasa Cdc 2a (Inzé et al., 1999). Se ha reportado que al menos un complejo Cyc D-Cdc2a puede fosforilar Rb de tabaco *in vitro* (Nakagami et al., 1999). Además, se sabe que las proteínas Rb de plantas interactúan con proteínas E2F de plantas y con el homólogo de RbAp48, MSI 1, aunque no se ha demostrado un papel directo para las primeras en la modificación de histonas, o de las proteínas E2F en la transcripción de genes importantes en la fase S. Esquema tomado de (Jager et al., 1999).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



En la ruta del retinoblastoma en animales, la proteína central es pRb y en plantas se ha tomado la convención de llamarlas RBRs (Inzé et al., 1999), las cuales han mostrado compartir características estructurales y bioquímicas con la primera.

Se ha reportado el aislamiento de cDNAs *RBRs* de diferentes especies vegetales, tanto monocotiledóneas (*Zea mays*) como dicotiledóneas (*Nicotiana tabacum* y *Chenopodium rubrum*) (Nakagami et al., 1999; Fountain et al., 1999), pero no se ha reportado el aislamiento del gen como tal. En este trabajo se caracteriza la estructura y la expresión de un gen que codifica una proteína RBR de maíz, al que se ha denominado *ZmRBR*.

En cuanto a la estructura del gen, la secuencia de aproximadamente 7170 pb "corriente abajo" del sitio de inicio de la transcripción se ha organizado en 16 exones y 16 intrones, lo que se llevó a cabo por comparación de la secuencia del gen con la de los cDNAs *RRB1* y *RRB2s*, con el primero debido a que se conoce su secuencia completa hacia 5', y con los segundos por la mayor identidad que tienen con el gen.

El tamaño de los intrones y de los exones del gen *ZmRBR* se muestran en la Tabla 4, en donde se compara con los genes *Rb* de otros organismos: *Rb1* (pRb) (Hong et al., 1989) y *Rb2* (p130) (Baldi et al., 1996) de humano. Se puede observar que los intrones de estos últimos son más grandes y se encuentran en un número mayor (Figura 21, Tabla 4), midiendo la mayoría de ellos más de 1.0 kpb, mientras que el intrón más grande de *ZmRBR* es menor de 600 pb. En tamaño son más parecidos los intrones del gen de maíz al *RBf* de *D. melanogaster*. El mayor número y tamaño de los intrones de los genes *Rb* de humano hacen que su tamaño sea considerablemente mayor al de maíz, ya que se calcula que este mide ~9.5 kpb, contra 200 y 50 kpb de *Rb1* y *Rb2*, respectivamente (Figura 21).

Se puede observar también en más del 50% de los intrones de maíz la presencia de secuencias conservadas para sitios de corte de intrones y empalme de exones, donadores y aceptores, *gt* y *ag*, respectivamente, como las que se observan en los intrones de los genes de animales y procariotes.

El porcentaje en el contenido de AT de los intrones del gen *ZmRBR* es aproximadamente del 60%, característica distintiva de los intrones de plantas. El significado funcional del alto porcentaje en AT no es claro, pero se especula que puede actuar para minimizar la estructura secundaria dentro de los intrones (Goodall et al., 1989).

También se ha hecho una correlación positiva entre un alto contenido de T's en los intrones de maíz y la eficiencia de corte de intrones y empalme de exones, lo que sugiere que los motivos ricos en T's son un elemento clave en el corte y empalme de los RNAs heteronucleares de maíz (Ko et al., 1998). También se ha propuesto que los motivos ricos en ATs en los intrones de maíz en ausencia de un sitio 5' de corte y empalme, dirige la poliadenilación de ciertos RNAs (Luerhsen et al., 1994).

El gen *ZmRBR* se encuentra flanqueado por elementos transponibles, característica encontrada frecuentemente en los genes de maíz, y que puede explicarse si se toma en cuenta que en el mar de secuencias repetidas que rodean a los genes en el genoma de maíz, la mayoría corresponde a estos elementos (White et al., 1997). La secuencia que flanquea al gen tiene una identidad de más del 80% con el 5'-LTR del retrotransposón Ji-6, con el también retroelemento PREM-2 y con la secuencia nuclear autónoma de replicación ARS-3.

Los retroelementos PREM-2 (Pollen Retroelement Maize-2) son muy abundantes y se estima que constituyen alrededor del 5% del genoma de maíz y que pudieron, posiblemente, haber jugado un papel importante en la determinación de la estructura genómica y en la generación de secuencias repetitivas de maíz. Los elementos PREM-2 se han encontrado muy cercanos a la secuencia de varios genes registrados en GenBank, entre los cuales se incluyen a tres miembros de la familia de la poligalacturonasa que se expresan en polen, a una clona genómica que codifica



la subunidad A de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, y a una secuencia no codificante que tiene las propiedades de una secuencia de replicación autónoma de levaduras, llamada MZEARS3 o ARS3 (Turcich et al., 1995). Aunque no se sabe a ciencia cierta si los retroelementos pudieran estar involucrados en la duplicación génica en maíz y en otras plantas, existen reportes en donde se señala que secuencias de un retroelemento flanquean al gen que codifica a la zeína (proteína de 19 kDa considerada como la principal proteína de reserva en maíz) y, además de servir como promotor pueden haber facilitado la amplificación de la familia génica a la que pertenece la zeína. Debido a que los genes de la zeína se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 7, pudiera darse el caso de que estuvieran arreglados en "tandem". Esta organización sugiere que los genes de la zeína fueron duplicados por un entrecruzamiento homólogo entre retrotransposones insertados a ambos lados de un gen progenitor (White et al., 1994).

En el mismo sentido, se ha especulado que debido a que la mayoría de los miembros de la familia génica de la poligalacturonasa contienen una secuencia PREM-2, se incrementa la posibilidad de que la presencia del retroelemento haya facilitado su duplicación génica (Turcich et al., 1995).

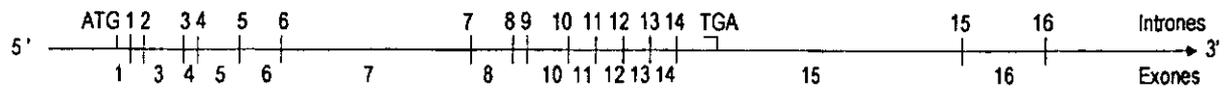
Si en el caso del gen *ZmRBR* las especulaciones anteriores no fueran solo eso, entonces se esperaría que el (los) otro (s) miembro (s) de la familia multigénica a la que *ZmRBR* perteneciera, estuviera (n) arreglados en tandem y flanqueado (s) por PREM-2.

El papel de Rb como inhibidor de la proliferación celular en humanos es tan importante que las mutaciones del gene *Rb* se han asociado a muchos tumores, además de los retinoblastomas, que fue en los casos donde primero se observó esta mutación, y la pérdida de función parece ser un paso crítico en el desarrollo de muchos cánceres. En las plantas no se presentan aparición y desarrollo de tumores, con excepción de los fenómenos de hiperplasia e hipertrofia que produce *Agrobacterium tumefaciens* en algunas especies de dicotiledóneas que infecta. Sin embargo, tampoco se han estudiado los efectos en el desarrollo que pudiera tener, por ejemplo, la pérdida de un gen *RBR*. Aunque en plantas se tienen evidencias que sugieren que las proteínas RBR pueden actuar, al igual que Rb, como reguladores negativos del ciclo celular, siendo una de ellas que la sobreproducción de una proteína RBR de maíz inhibió la replicación de geminivirus (Xie et al., 1997), y la otra, que la sobreproducción e inhibición de una proteína RBR de *A. thaliana* provocaron la formación de inflorescencias fasciadas y meristemas distorsionados, siendo estos últimos la región donde ocurre la mayor parte de la división celular (Inzé, et. al., 1999), en maíz, la pérdida de un gen *RBR* pudiera no tener efectos similares, en parte debido a su posible naturaleza multigénica (de la cual se presentan indicios en este trabajo), por lo que el conocimiento de su secuencia proporciona una herramienta muy importante para estudiar, por medio de experimentos de inhibición antigénica o antisentido, los efectos que una inhibición provocaría en su expresión. Asimismo, el conocimiento de la secuencia de la región promotora proporciona un instrumento para el estudio de la regulación de la expresión del gen por medio de experimentos de expresión transitoria, mismos que se llevan a cabo en un proyecto colateral.

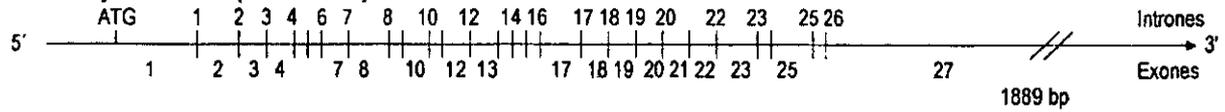
Por otro lado, en este trabajo se dan indicios de la existencia de más de un gen *ZmRBR* por medio de experimentos de Southern blot, lo que concuerda con lo insinuado previamente en (Ach et al., 1997a), aunque no con lo que se sugiere en (Grafi, et al., 1997). Se había sugerido que por el hecho de haber encontrado solo dos tipos de cDNAs *RBRs*, *RRB1* y *RRB2* en búsquedas exhaustivas en varios bancos de cDNAs, que los genes *RBRs* podrían pertenecer a una familia multigénica, tal vez de solo dos miembros, sin embargo, por el hecho de que las secuencias exónicas de *ZmRBR* no tienen una identidad del 100% con ninguno de los cDNAs mencionados, se puede especular que se ha aislado a un gen diferente, aunque altamente relacionado con los que darían origen a los



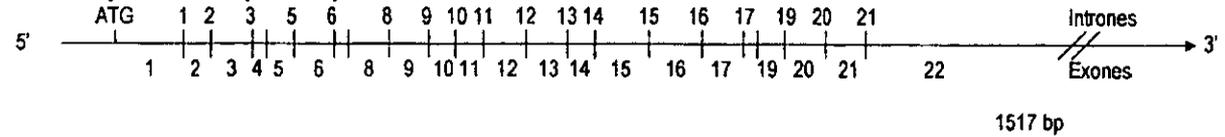
*Zea mays* RBR (*ZmRBR*) (~ 9.5 kb)



*Homo sapiens* Rb1 (~200 kb)



*Homo sapiens* Rb2 (50 kb)



*D. melanogaster* RBF (~ 3.5 kb)

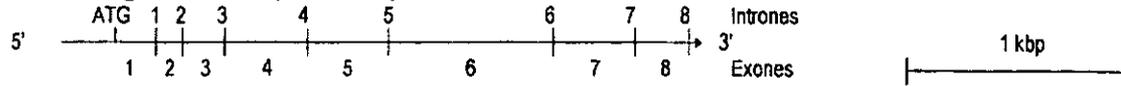


Figura 21

Comparación de la estructura y el tamaño de los genes *ZmRBR* (*Zea mays*), *Rb1* y *Rb2* (*Homo sapiens*) y *RBF* (*D. melanogaster*). La posición de los intrones se indica como barras verticales. El tamaño de los intrones se muestra en la tabla 4.



NÚMERO INTRON	<i>Z. MAYS</i> <i>ZmRBR</i> (kpb)	<i>H. SAPIENS</i> <i>Rb1</i> (kpb)	<i>H. SAPIENS</i> <i>Rb2</i> (kpb)	<i>D. MELANOGASTER</i> <i>RBF</i> (kpb)
1	0.298	~3	~4.5	0.079
2	0.161	~30	~3.8	0.061
3	0.117	~2	~3.86	0.064
4	0.061	~2	~4.57	0.063
5	0.101	~1	~1.62	0.102
6	0.088	~12	~0.092	0.135
7	0.648	~1.5	~1.046	0.069
8	0.092	~0.5	~4.5	
9	0.085	~1	~2.13	
10	0.079	~1	~0.716	
11	0.103	~5	~1.0	
12	0.079	~4	~1.08	
13	0.556	~0.5	~1.45	
14	0.094	~0.5	~2.74	
15	0.208	~0.08	~0.197	
16		~1.6	~0.082	
17		~60.0	~1.079	
18		~3.0	~.659	
19		~4.0	~.572	
20		~3.0	~0.902	
21		~1.7	~9.0	
22		~2.0		
23		~6.5		
24		~3.0		
25		~0.2		
26		~2.5		

Tabla 4

Número y tamaño de los intrones contenidos en el gen *Rb* de diferentes organismos.



transcritos *RBR1*, *RBR2s* o *ZmRb1*, es decir, a un tercer gen *RBR*, con lo que se refuerza la idea derivada a partir de los resultados de S. blot de que en el genoma de maíz se encuentra más de un gen que codifica proteínas RBR.

Aunque no puede descartarse la posibilidad de que las regiones exónicas de *ZmRBR* no tengan una identidad del 100% con ninguno de los cDNAs *RBR* de maíz pudiera deberse a que el gen *ZmRBR* fuera polimórfico, característica que tienen varios genes de maíz como el Opaque-2, el gen *gbl 1*, y un gen que codifica una zeína (Henry and Damerval, 1997; Bhatramakki and Kriz, 1996; Pedersen, K. et al., 1982), dado que los distintos cDNAs y la clona genómica se aislaron a partir de bibliotecas de maíz de diferentes variedades. Entonces, debido a que la secuencia de *ZmRBR* tiene la mayor identidad en sus regiones exónicas con los cDNAs *RBR2a* y *RBR2b*, cabe la posibilidad de que *ZmRBR* es el que da origen a los dos transcritos. El aislamiento del cDNA correspondiente a *ZmRBR* ayudaría a definir cualquiera de las posibilidades planteadas en cuanto a la identidad del gen.

Por otro lado, se ha especulado que por analogía con los sistemas animales, la actividad de las proteínas RBR de plantas depende probablemente de su fosforilación y su asociación específica con otras proteínas, como por ejemplo, con el factor transcripcional E2F.

En este sentido, se ha observado fosforilación de la proteína RBR de tabaco, NtRb1, por un complejo ciclina D/cdc 2, ambos de tabaco (Nakagami et al., 1999) y en lo referente a las proteínas RBR de maíz, específicamente ZmRb1 y ZmRB, la primera ha mostrado ser un buen sustrato *in vitro* para complejos ciclina/cinasa de G1/S (ciclina D/CDK4, ciclina A/CDK2 y ciclina E/CDK2) y la segunda sufre cambios en su estado de fosforilación concomitantemente con la endoduplicación y se fosforila *in vitro* por una cinasa de fase S de células de endoespermo en endoduplicación (Grafi et al., 1996).

En la proteína ZmRBR, predecida a partir de las regiones traducibles del gen, de 867 aminoácidos y con un tamaño de ~95 kDa, se pueden identificar 18 sitios de fosforilación (S/TP), similares a lo que se encuentran en las otras proteínas RBR de maíz, lo que es consistente con que la regulación de su actividad esté dada por fosforilación.

La obtención de un anticuerpo dirigido contra un carboxilo terminal de la proteína que es donde se encuentra la mayor cantidad de sitios putativos de fosforilación permitirá dilucidar el estado de fosforilación de la proteína en procesos como la germinación de semillas de maíz, la diferenciación y la apoptosis en las plántulas de maíz.

Se ha observado también la formación de complejos entre las proteínas RBR de maíz y proteínas E2F, tanto de humanos como de plantas. Con ZmRb1, se observó la formación de complejos con la proteína TmE2F de trigo (Ramírez-Parra et al., 1999). Estos datos propocionan fuertes evidencias de que el mecanismo de acción de las proteínas RBR es similar al que se ha descrito para las proteínas Rb de animales. No tenemos evidencias de que la proteína ZmRBR forme complejos con E2F, a similitud de las otras proteínas RBR de maíz, por lo que resultaría muy interesante estudiar la formación de tales complejos en diferentes estados de desarrollo de la planta.

Por otro lado, la expresión del gen *ZmRBR* en diferentes tejidos del maíz no pudo ser detectada por Northern blot, no obstante por RT-PCR se pudo detectar la presencia del mensaje en la hoja y el tallo de plántulas de maíz, aunque no en la raíz completa ni en el embrión ni eje embrionario de la semilla seca, aunque la limitante de la técnica es que no genera información acerca del tamaño del RNA mensajero de ZmRBR. Los reportes previos de estudios de expresión del (los) gen (es) *RBR* por Northern blot indican la presencia en maíz de dos RNAs mensajeros, uno de ~4.5 kb y otro de ~3.2 kb (Ach et al., 1997a), en *Nicotiana tabacum* el RNA mensajero detectado es de 3.3 kb (Nakagami et al., 1999), y en *Chenopodium rubrum* de ~3.4 kb (Fountain et al., 1999). En



estos experimentos, en maíz y en tabaco, se encontró también que a similitud con el gen *Rb* en animales, el (los) gen (es) *RBR* en maíz se expresan de manera ubicua en los tejidos de la planta (hojas maduras, flores, plántulas etioladas, ápices radicales, raíz, espigas inmaduras, estigma, polen, embrión y endospermo). En tabaco se detectaron niveles altos de RNA mensajero en tallo, hojas y raíces, tejidos que consisten predominantemente de células diferenciadas, y niveles bajos del mensaje en flores y en células no diferenciadas. Se sugiere que el gen *NIRb1* pudiera estar involucrado en inducir y/o mantener un estado de diferenciación en plantas. Nuestros resultados sugieren lo mismo en maíz, puesto que la presencia del mensaje es muy clara en tallo y en hoja.

La semilla seca, resultante del proceso de embriogénesis, contiene a la mayoría de células embrionarias bloqueadas en la fase G1 del ciclo (Georgieva et al., 1994), que es donde pRb ejerce su acción como regulador negativo de la proliferación celular en células humanas. Una estrategia para definir el papel fisiológico de ZmRBR en células vegetales, es el estudio de su expresión a nivel de mensaje y proteína en el embrión y eje embrionario de la semilla seca, lo que indicaría niveles residuales de estas moléculas que funcionaron durante la embriogénesis. Sin embargo, no se detectó el mensaje de *ZmRBR*, aún por RT-PCR, ni en el embrión ni en el eje embrionario, lo que puede deberse posiblemente a dos causas, la primera, que la cantidad de RNA total utilizada en los ensayos no hubiera sido suficiente para determinar niveles muy bajos del mensaje y la segunda, que los diferentes genes que presumiblemente existen en el genoma de maíz se expresen de manera diferencial, siendo *ZmRBR* un gen que no se expresa en estos tejidos en la semilla seca. El diseño de sondas específicas de secuencias conocidas hasta ahora de los diferentes cDNAs *RBR* de maíz y su utilización en experimentos de Northern blot, ayudarán a saber si existe expresión diferencial.

En cuanto a la detección de los niveles de proteína ZmRBR en diferentes tejidos de la plántula de maíz y en la semilla seca, se utilizó un anticuerpo dirigido contra el "bolsillo" A/B de la proteína recombinante ZmRb1, bajo la suposición de que aún cuando el anticuerpo estuviera dirigido contra una proteína que pudiera ser ligeramente diferente a ZmRBR, al ser obtenido contra este dominio en el que la proteínas RBR de maíz muestran mayor identidad, detectaría también a la proteína codificada por *ZmRBR*. Bajo esta suposición se llevaron a cabo experimentos de Western blot en donde se detectaron proteínas RBR en la hoja y el tallo de plántulas de maíz del tamaño esperado para las mismas (~100 kDa), lo que concuerda con lo que se ha reportado previamente en ensayos similares utilizando extractos proteicos de la punta de la hoja de maíz, compuesta de células diferenciadas, en donde se detectó la presencia de una proteína *RBR* de 110 kDa, cuyo nivel disminuye conforme se avanza hacia la base de la hoja, en donde las células se encuentran en estado de proliferación. Estos resultados sugieren que algunas proteínas *RBR* podrían estar involucradas en la supresión de la división celular durante la diferenciación, siendo un reflejo de lo que sucede con la proteína Rb en animales, en donde actúa para detener la división celular, lo cual es un prerequisite para la diferenciación terminal (Jacks et al., 1992).

Respecto a los polipéptidos de ~35 y ~65 kDa que se detectaron en las puntas de la raíz de semillas germinadas por tres días y en el eje embrionario de semillas secas, se especula que pueden ser resultado de la proteólisis de la proteína de ~100 kDa. Se tiene conocimiento de que la proteína Rb de humano sufre proteólisis, originando un fragmento de ~60 kDa a partir de la proteína de 110 kDa, debido a que la intensidad de la primera aumenta conforme disminuye la de la segunda (Rogalsky et al., 1993). Sin embargo, la identidad de la proteasa responsable se desconoce. Una segunda posibilidad para explicar la presencia de los polipéptidos de ~35 y ~65 kDa es que éstas son proteínas relacionadas antigénicamente a las RBR pero de menor tamaño, una especie de proteínas "bolsillo" como lo serían p107 y p130 en el caso de humanos.



Un dato interesante que apoyaría el hecho de la existencia de una proteína RBR de ~65 kDa en maíz, proviene de experimentos en donde se estudiaron las interacciones en extractos totales de endospermo entre proteínas RBR de maíz y la proteína LeMSI de tomate, un homólogo de las proteínas humanas RbAp48, RbAp46 y la Msi 1 de levadura. En estos experimentos se esperaba la interacción de LeMSI con una proteína RBR de ~96 kDa, lo cual no se observó, aunque sí se detectaron dos proteínas de unión a Rb de ~60 y ~65 kDa, así como una proteína de ~40 kDa (Ach et al., 1997b). Aunque de estos experimentos los autores concluyen que puede tratarse de proteínas de interacción con LeMSI diferentes a las RBRs, el tamaño de las proteínas es sugerente, pues es muy similar al que en nuestros experimentos hemos detectado con un anticuerpo dirigido contra el "bolsillo A/B" de una proteína RBR. A manera de especulación, estas proteínas podrían ser productos de degradación de la proteína de ~100 kDa, pues además, en nuestros experimentos se detectan en donde la proteína de mayor tamaño no está presente.

Es interesante suponer que al igual que la fosforilación, la proteólisis pudiera ser un mecanismo de regulación de las funciones de las proteínas RBR en plantas, específicamente en maíz. Sin embargo, es necesario comprobar primero si efectivamente las proteínas RBR son proteolizadas específicamente *in vivo*, y no un resultado del proceso de extracción. La obtención de un anticuerpo dirigido contra la proteína ZmRBR permitirá que los estudios de niveles de la misma en diferentes tejidos o en diferentes estados de desarrollo de la planta sean más precisos.



## CONCLUSIONES

- ✦ El gen de ~9.5 kpb contenido en la clona  $\lambda$ Fix II 8.1.4.2., denominado *ZmRBR*, codifica una proteína RBR (relacionada a retinoblastoma) que tiene una alta identidad en sus regiones exónicas traducibles y no traducibles, a nivel de nucleótidos, con los cDNAs *RBRs* de maíz reportados previamente. No se tiene conocimiento de secuencias de genes *RBRs* publicadas hasta la fecha en la literatura.
- ✦ El gen *ZmRBR* presenta una alta identidad en sus regiones exónicas con los cDNAs *RBR* de maíz reportados, pero no es del 100% con ninguno de ellos, lo que permite pensar que *ZmRBR* podría ser un gen diferente a los que originan los transcritos *RRB1*, *RRB2* y *ZmRb1*. Además, los indicios presentados en este trabajo sugieren que existe más de un gen *RBR* en el genoma de maíz, por lo que *ZmRBR* sería un miembro más de esta familia multigénica.
- ✦ En la caracterización del gen se identificó un ATG en marco y un codón de terminación TGA que ayudó a la definición de la región 3'-UTR, que es donde mayor variabilidad se encuentra entre los cDNAs *RBR* de maíz y el gen *ZmRBR*. También se identificó un sitio putativo de inicio de la transcripción que permitió definir a su vez a la región 5'-UTR.
- ✦ Por comparación de la secuencia de *ZmRBR* con la de los cDNAs *RBR* de maíz se identificaron en el gen 16 exones y 16 intrones, con secuencias de corte de intrones y empalme de exones, *gt* y *ag*, conservadas. Además, *ZmRBR* está flanqueado por un retroelemento, característica que se ha observado en otros genes de maíz.
- ✦ La estructura del gen *ZmRBR* difiere del gen *Rb* de humano tanto en tamaño, número de intrones y exones y la organización de éstos.
- ✦ La proteína deducida a partir de las regiones traducibles del gen y a la cual se denominó *ZmRBR*, se compone de 867 aminoácidos y tiene un tamaño calculado de ~95 kDa; presenta las características conservadas en las proteínas RBR de maíz y en las pRb de mamíferos, tales como la presencia de dos dominios conservados, llamados "bolsillos" A y B, sitios S/T-P susceptibles a fosforilación por complejos ciclina/CDKs, una señal de localización nuclear y una cisteína en una posición equivalente a la Cys706 de pRb de mamíferos, aminoácido esencial para las funciones de la proteína como inhibidor de la proliferación celular.



- ↪ La presencia del transcrito *RBR* se detectó en hoja y tallo de plántulas de maíz, aunque no en raíz ni en semilla seca, lo que indica que la expresión del gen *ZmRBR* no ocurre en todos los tejidos. Es posible, entonces, que los distintos genes *RBR* tengan una expresión diferencial en tejidos y estadios de desarrollo de la planta. El incremento en el nivel de transcrito de *ZmRBR* en tejidos diferenciados de maíz es similar a lo que ocurre en células animales, en donde el mensaje de pRb se incrementa notablemente en tejidos diferenciados, lo que indicaría la posible participación del gen en el proceso de diferenciación de la planta, no así en tejidos quiescentes como son el embrión y el eje embrionario de la semilla seca.
- ↪ La presencia en tejidos diferenciados de maíz de proteínas RBR de un tamaño entre 95 y 100 kDa, relacionadas antigénicamente y entre las que probablemente se encuentra *ZmRBR*, sugiere la participación de la proteína *ZmRBR*, así como de las otras proteínas RBR en el proceso de diferenciación de la planta de maíz.

Hasta ahora se ha caracterizado la estructura del gen *ZmRBR* y se han hecho las primeras aproximaciones al estudio de su expresión y en la detección de los niveles de la proteína en diferentes tejidos de la planta de maíz. Sin embargo todavía quedan por contestar preguntas fundamentales sobre el papel de éstas proteínas en el desarrollo y diferenciación en el maíz y, mientras mientras no se tengan plantas cuyo(s) gen(es) RBR sea(n) eliminado(s) de manera que permita(n) estudiar los fenotipos resultantes, se pueden utilizar otras aproximaciones moleculares y bioquímicas para determinar si:

- ¿existe una expresión tejido o estadio de desarrollo específico de los diferentes genes *RBR* de maíz?,
- ¿la proteína *ZmRBR* tiene una función como Inhibidor de la proliferación celular en las plantas, similar a la que tiene pRb en las células animales?,
- ¿la actividad de *ZmRBR* se regula por fosforilación?, si así fuera ¿qué tipo de cinasas la fosforilan?,
- ¿son proteínas de tipo ciclina/CDK como las que se han descrito que fosforilan a proteínas RBR de otras plantas?,
- ¿*ZmRBR* forma complejos en la planta con proteínas tipo E2F y tipo histona desacetilasa como lo hace pRb de animales, o bien con proteínas propias de la planta?,
- ¿si estos complejos se forman, se mantienen en diferentes estadios de desarrollo de la planta, por ejemplo en la proliferación y la diferenciación, o durante la quiescencia y la germinación de semillas de maíz, e inclusive durante la apoptosis, proceso en donde pRb juega un papel importante en células animales?.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ach, R. A., Durfee, T., Miller, A. B., Zambryski, P. C., Hanley-Bowdoin, L. and Grissem, W. (1997 a) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell Biol.* 17, 5077-5086.
- Ach, R. A., Taranto, P., and Grissem, W. (1997 b) A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *The Plant Cell* 9, 1595-1606.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. M., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (eds.) (1992) *Short Protocols In Molecular Biology*, 2nd ed., Greene Publishing Assoc. and Wiley & Sons, New York.
- Baldi, A., Boccia, V., Claudio, P. P., De Luca, A., and Giordano, A. (1996) Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2 / p130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4629-4632.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas J. (1996) The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 805-814.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas J. (1997) The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell Res.* 237, 1-6.
- Bernards, R., Schackelford, G. M., Gerber, M. R., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Schartl, M., Bogenmann, E., Rapaport, J. M., McGee, T., Bryja, T. P. and Weinberg, R. A. (1989) Structure and expression of the murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6474-6478.
- Berndt, N., Dohadwala, M. and Liu, C.W. (1997) Constitutively active protein phosphatase 1 alpha causes Rb-dependent G1 arrest in human cancer cells. *Curr. Biol.* 7, 375-386.
- Bhatramakki, D. and Kriz, A. L. (1996) Nucleotide sequence analysis of a novel *globulin 1* null allele from the Illinois high protein strain of maize. *Plant Mol. Biol.* 32, 1215-1219.
- Bookstein, R., Lee, E. Y.-H. P., To, H., Young L.-J., Sery, T.W., Hayes, R.C., Friedmann, T., and Lee W.-H. (1988) Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2210-2214. S
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brehm, A., and Kouzarides, T. (1999) Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 24, 142-145.
- Buchkovich, K., Duffy, L. A. and Harlow, E. (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58, 1097-1105.



- Cobrinik, D., Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Mittnacht, S., and Weinberg, R. A. (1993) The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem. Sci.* 17, 312-315.
- Coppola, J. A., Lewis, B. A., and Cole, M. D. (1990) Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene* 5, 1731-1733.
- Corpet, F. (1998) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10 881-10 890.
- Chellapan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., and Nevins, J. R. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053-1061.
- Chen, P.-L., Scully, P., Shew, J.-H., Wang, J. Y. J., and Lee, W.-H. (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58, 1193-1198.
- Dahl, M., Meskene, I., Bögre, L., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H., and Heberle-Bors, E. (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* 7, 1847-1857.
- De La Porta, S. L., Wood, J. A., and Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21.
- DeCaprio, J. A., Furukawa, Y., Ajchembaum, F., Griffin J. D., and Livingston, D. M. (1992) The retinoblastoma susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1795-1798.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Lynch, D., Furukawa, Y., and Griffin, J. (1989) The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulating element. *Cell* 58, 1085-1095.
- Destree, O. H., Lam, K. T., Petersen-Maduro, L. J., Eizema, K., Diller, L., Gryka, M. A., Frebourg, T., Shibuya, E. and Friend, S. H. (1992). Structure and expression of the *Xenopus* retinoblastoma gene. *Dev. Biol.* 153, 141-149.
- Doonan, J. and Fobert, P. (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 824-830.
- Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., Weinberg, R. A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73, 499-511.
- Du, W., Vidal, M., Xie, J. E. and Dyson, N. (1996) *RBF*, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 1206-1218.
- Dyson, N., Buchkovich, K., White, P. and Harlow, E. (1989) The cellular 107 K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigen of SV40 and JC virus. *Cell* 58, 249-255.
- Endo, T. and Goto, S. (1992) Retinoblastoma gene product Rb accumulates during myogenic differentiation and is deinduced by the expression of SV40 large T antigen. *J. Biochem.* 112, 427-430.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J.-Y., Livingston, D. M. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497.



- Friend, S. H., Horowitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X. F., Bogenmann, E., Li, F. P. and Weinberg, R. A. (1987) Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9059-9063.
- Fountain, M. D., Murray, J. A. H., and Beck, E. (1999) Isolation of a full-length cDNA encoding a retinoblastoma (Accession No. AJ011681) protein from suspension cultured photoautotrophic *Chenopodium Rubrum* L. cells. *Plant Physiol.* 119, 363.
- Georgjeva, E. I., López-Rodas, G., Hiltmair, A., Feichtinger, H., Brosch, A. and Loidl, P. (1994) Maize embryo germination. I. Cell cycle analysis. *Planta* 192, 118-124.
- Geraghty, D., Peifer, M.A., Rubenstein, I. and Messing, J. (1981) The primary structure of a plant storage protein: zein. *Nucl. Acids Res.* 9, 5163-5174.
- Goodall, G. J. and Filipowicz, W. (1989) The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell* 58, 473-483.
- Goodrich, D. W., Wang, N. P., Qian Y.-W., Lee, E.Y.-H.P., Lee, W.-H. (1991) The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 67, 293-302.
- Goodrich, D. W. and Lee, W.-H. (1993) Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1115, 43-61.
- Graf, G., and Larkins, B. A. (1995) Endoreduplication in maize endosperm: Involvement of M phase - promoting factor inhibition and induction of S phase-related kinases. *Science* 269, 1262-1265.
- Graf, G., Burnett, R. J., Helentjaris, T., Larkins, B. A., DeCaprio, J. A., Sellers, W. R., Kaelin, and W. G. Jr. (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8962- 8967.
- Gutierrez, C. (1998) The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 492-497.
- Hensey, C. E., Hong, F., Durfee, T., Qian, Y. W., Lee, E. Y., and Lee, W. H. (1994) Identification of discrete structural domains in the retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* 269, 1380-1387.
- Henry, A. M. and Damerval, C. (1997) High rates of polymorphism and recombination at the *Opaque-2* locus in cultivated maize. *Mol. Gen. Genet.* 256, 147-157.
- Herwing, S. and Strauss, M. (1997) The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 246, 581-601.
- Hiebert, S. W., Chellapan, S. P., Horowitz, J. M. and Nevins, J. R. (1992) The interaction of RB with E2F coincides with a inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* 6, 177-185.
- Hinds, P. W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., Weinberg, R. A. (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70, 993-1006.
- Hong, F. D., Huang, H.-J. S., To H., Young, L.-J. S., Oro, A. (1989) Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5502-5506.
- Hu, Q. J., Dyson, N., and Harlow, E. (1990) The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* 9, 1147-1155.



- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makkert, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A. J., Kouzarides, T., Gutiérrez, C., Doonan, J. H., and Murray, J. (1998) The maize retinoblastoma protein homologue *ZmRb1* is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin (D-Type) proteins. *Plant Mol. Biol.* 37, 155-169.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Inzé, D., Gutiérrez, C., and Chua, N.-H. (1999) Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell* 11, 991-994.
- Jacks, T., Fazell, A., Schmitt, E. A., Bronson, R. T., Goodell, M. A., and Weinberg, R. A. (1992) Effects of an *Rb* mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.
- Jager, S.M. and Murray, J. A. H. (1999) Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 41, 295-299.
- Janicke, R. V., Walkr, P. A., Lin, X. Y. and Porter, A. G. (1996) Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 15, 6969-6978.
- Kaye, F. J., Kratzke, R. A., Gerster, J. L., and Horowitz, J. M. (1990) A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6922-6926.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H. K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M. et al. (1996) The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J.* 15, 7060-7069.
- Ko, C. H., Brendel, V., Taylor, R.D., and Walbot, V. (1998) U-richness is a defining feature of plant introns and may function as an intron recognition signal in maize. *Plant Mol. Biol.* 36, 573-583.
- Lee, E. Y.-H. P., Chang, Ch.-Y., Hu, N., Wang, Y.-Ch. J., Lai, Ch.-Ch., Herrup, K., Lee, W.-H., and Bradley, A. (1992) Mice deficient for *Rb* are non viable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288-294.
- Lee, J.-O., Russo A. A., Pavletich, N.P. (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 391, 859-865.
- Lee, W.-H., Bookstein R., Hong, F., Young L.-J., Shew, J.-Y., and Lee, E. Y.-H. P. (1987a) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235, 1394-1399.
- Lee, W. H., Shew, J. Y., Hong, F. D., Sery, T. W., Donoso, L. A., Young, L. J., Bookstein, R., and Lee, E. Y. (1987b) The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329, 642-645.
- Lees, J. A., Buchkovich, K. J., Marshak D. R., Anderson, C. W., Harlow, E. (1991) The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *EMBO J.* 10, 4279-4290.
- Ludlow, J. W., DeCaprio, J. A., Huang, C. M., Lee, W. H., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1989) SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 56, 57-65.
- Luehrsen, K. R. and Walbot, V. (1994) Intron creation and polyadenylation in maize are directed by AU-rich RNA. *Genes Dev.* 1, 1117-1130.



- Lukas, J., Batkova, J., and Bartek, J. (1996) Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors on the cyclin D/cdk-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6917-6925.
- MacLachlan, T. K., Sang, N., and Giordano, A. (1995) Cyclins, cyclin-dependent kinases and Cdk inhibitors: Implications in cell cycle control and cancer. *Critical Reviews In Eukaryotic Gene Expression* 5, 127-156.
- Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman S., and Lee W.-H. (1994) The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 418-422.
- Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q. and Giordano, A. (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 8, 2561-2566.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *Plant Cell* 11, 509-521.
- Mitnacht, S. and Winberg, R. A. (1991) Phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 65, 381-393.
- Mitnacht, S. (1998) Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 21-27.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H., and Shinmyo, A. (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J.* 18, 243-252.
- Nevins, J. R. (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424-429.
- Nigg, E. A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17, 471-480.
- Pardee, A. B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.
- Pedersen, K., Devereux, J., Wilson, D. R., Sheldon, E. and Larkins, B. A. (1992) Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related zein genes in maize. *Cell* 29, 1015-1026.
- Ping Dou, Q. and Bing, A. (1998) RB and apoptotic cell death. *Front. Biosci.* 3, 419-430.
- Planas-Silva, M.D. and Weinberg, R. A. (1997) The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 768-772.
- Ramírez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M. B. and Gutierrez, Crisanto (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucl. Acids Res.* 27, 3527-3553.
- Riley, D. J., Lee, E.Y.-H.P., and Lee W.-H. (1994) The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 1-29.
- Rogalsky, V., Todorov, G., and Moran, D. (1993) Translocation of retinoblastoma protein associated with tumour cell growth inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 1139-1146.
- Rustgi, A.K., Dyson, N., and Bernards, R. (1991) Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352, 541-544.



- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. M. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., and Shinmyo, A. (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* 460, 117-122.
- Shen, B., Carnelro, N., Torres-Jerez, I., Stevenson, B., McCreery, T., Helentjaris, T., Baysdorfer, C., Almira, E., Ferl, R. J., Habben, J. E., and Larkins, B. (1994) Partial sequencing and mapping of clones from two maize cDNA libraries. *Plant Mol. Biol.* 26, 1085-1101.
- Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149-1163.
- Sherr, C.J. (1996). *Cancer cell cycles.* *Science* 274, 1672-1677.
- Slacks, R. S., Hamel, P. A., Bladon, T. S., Gill, M., and Mc Burney, M. W. (1993) Regulated expression of the retinoblastoma gene in differentiating embryonal carcinoma cells. *Oncogene* 8, 1585-1591.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., and Murray, J. A. H. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7, 85-103.
- Turcich, M.P., Bokhari-Riza, A., Hamilton, D. A., He, C., Messler, W., Stewart, C.-B., and Mascarenhas, J.P. (1996) PREM-2, a copia-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores. *Sex. Plant Reprod.* 9, 65-74.
- Wang N.P., Chen P.L., Huang, S.-H., Donoso, L. A., Lee, W.-H., and Lee E.Y.-H.P. (1990) DNA binding activity of retinoblastoma protein is intrinsic to its carboxyl-terminal region. *Cell Growth Differ* 1, 233-239.
- Welch, P.J. and Wang, J. Y. (1995) A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75, 779-790.
- Weinberg, R. A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- White, S. and Doebley, J. (1998) Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends Genet.* 14, 327-332.
- Xie, Q., Suarez-Lopez, P., and Gutierrez, C. (1995) Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* 14, 4073-4082.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Hannon, G.J., and Gutierrez, C. (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15, 4900-4908.
- Zacksenhaus, E., Bremner, R., Phillips, R. A., and Gallie, B.L. (1993) A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biologic activity. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4588-4599.
- Zarkowska, T., Harlow, E., Mitnacht, S. (1997) Monoclonal antibodies specific for underphosphorylated retinoblastoma protein identify a cell cycle regulated phosphorylation site targeted by CDKs. *Oncogene* 14, 249-254.



## APÉNDICE A

### SOLUCIONES Y MEDIOS

#### A) SOLUCIONES

- **AMORTIGUADOR DE CARGA (DNA)**

Azul de bromofenol al 0.25 %

Glicerol al 50%

Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2.0 mM, pH 8.0

- **AMORTIGUADOR DE DESFOSFORILACIÓN CIAP 10X**

Tris-HCl 50 mM

EDTA 0.1 mM

- **AMORTIGUADOR DE DILUCIÓN CIAP**

Trietanolamina 30 mM pH 7.6

NaCl 3.0 M

MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM

ZnCl<sub>2</sub> 0.1 mM

- **AMORTIGUADOR DE ELECTRODOS 10X**

Trizma-base 250 mM, pH 8.3

Glicina 1.92 M

SDS al 1%

- **AMORTIGUADOR DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO**

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0,

Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 50mM pH 8.0,

NaCl 0.5 M,

1.5ml de β-mercaptoetanol

60 ml de SDS al 20%.



• **AMORTIGUADOR DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Tris 70 mM pH 7.5  
MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM  
KCl 25 mM  
Na<sub>2</sub> EDTA·2H<sub>2</sub>O 5.0 mM, pH 8.0  
Sacarosa 0.25 mM  
β-mercaptoetanol 15 mM  
Tritón X-100 al 0.1 %

• **AMORTIGUADOR GTE**

Glucosa 50 mM  
Tris 25 mM pH 8.0  
Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 10 mM pH 8.0

• **AMORTIGUADOR DE LIGACIÓN 10X (pH 7.5)**

Tris-HCl 20 mM  
EDTA 1 mM  
Ditioeritritol 5 mM  
KCl 60 mM

• **AMORTIGUADOR PBS 1X ( pH 7.3)**

NaCl 137 mM  
KCl 2.7 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.3 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM

• **AMORTIGUADOR TAE 1X (pH 8.0)**

Trizma base 40 mM,  
Ácido acético glacial 20 mM  
Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2.0 mM.

• **AMORTIGUADOR TE (pH 8.0)**

Tris-HCl 10 mM  
Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 1.0 mM

• **AMORTIGUADOR TOLERANTE AL GLICEROL GTE 20 X**

Taurina 0.570 M  
Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 10 mM  
Tris-base 1.78 M

• **REACTIVO DE BRADFORD**

Azul Brillante de Coomassie G al 0.05 % (p/v)  
HClO<sub>4</sub> al 5.2 % (v/v)

• **SOLUCIÓN ALCALINA DE LISIS**

NaOH 0.2 N  
SDS al 1%



- **SOLUCIÓN ANÓDICA 1 (1X)**  
Trizma base 0.3 M, pH 10.4  
Metanol al 4%
  
- **SOLUCIÓN DE BLOQUEO (PROTEÍNAS)**  
PBS 1X  
Leche descremada Sveltes al 5%  
Tween 20 al 1.2%
  
- **SOLUCIÓN CATÓDICA 3 (1X)**  
Ácido  $\epsilon$ -amino -n caproico 40 mM, pH 7.2  
Metanol al 4%
  
- **SOLUCIÓN DESNATURALIZANTE**  
NaCl 1.5 M  
NaOH 0.5 M
  
- **SOLUCIÓN DE DETENCIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN**  
Formamida al 95 % (v/v)  
EDTA 20 mM  
Azul de bromofenol al 0.05 % (p/v)  
Xilén cianol al 0.05 % (v/v)
  
- **SOLUCIÓN FIJADORA DEL GEL DE SECUENCIACIÓN**  
Metanol al 10% (v/v)  
Ácido acético glacial al 10% (v/v)
  
- **SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN (DNA)**  
SSC 4X (NaCl 0.6 M, Na<sub>3</sub>citrato-2H<sub>2</sub>O 0.06M)  
Solución de Denhardt 5X (Ficoll 400, polivinilpirrolidona y la fracción V de la albúmina sérica bovina, todos al 0.1 %)  
SDS al 0.5 % (p/v)  
DNA de esperma de salmón 0.1mg/ml
  
- **SOLUCIÓN DE NEUTRALIZACIÓN ( pH 8.0)**  
Tris-HCl 0.5 M  
NaCl 1.5 M



## B) MEDIOS

- **AGAR LB**

Peptona al 1% (p/v)  
Extracto de levadura al 0.5 % (p/v)  
NaCl 170 mM  
Agar al 1.5 % (p/v)

- **MEDIO LB**

Peptona al 1% (p/v)  
Extracto de levadura al 0.5 % (p/v)  
NaCl 170 mM

- **MEDIO SOB (pH 6.7-7.0)**

Peptona al 2 % (p/v)  
Extracto de levadura al 0.5% (p/v)  
NaCl 10 mM  
KCl 2.5 mM  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM

- **MEDIO SOC**

Peptona al 1.6 % (p/v)  
Extracto de levadura al 0.4 % (p/v)  
NaCl 136 mM  
Glucosa 20 mM

- **MEDIO TB (pH 6.7)**

Pipes (ácido piperazínodietanosulfónico) 10 mM,  
MnCl<sub>2</sub> 55 mM  
CaCl<sub>2</sub> 15 mM  
KCl 250 mM



## APÉNDICE B

Enzimas de restricción utilizadas en los ensayos de Southern blot, clonación y la caracterización del producto de PCR ( Material y Métodos).

Enzima	Género, Especie y Cepa	Secuencia de reconocimiento
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.	G↓GATCC
<i>Eco</i> RI	<i>E. coli</i> RY13	G↓AATTC
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus Influenzae</i> Rd	A↓AGCTT
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GGTAC↓C
<i>Sau</i> 3AI	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	↓GATC
<i>Spe</i> I	<i>Sphaerotilus species</i>	A↓CTAGT
<i>Sst</i> I	<i>Streptomyces stanford</i>	GAGCT↓C
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	T↓CGA