



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE DOS PROTEÍNAS MICROSOMALES DE
TEJIDO DE ALEURONA DE CEBADA (*HORDEUM VULGARE*),
SENSIBLES A ÁCIDO GIBERÉLICO: ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN Y
OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DEL TRANSCRITO”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RODRIGO REYNA DE JESÚS



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: IRMA BERNAL LUGO
VOCAL: MARINA GAVILANES RUÍZ
SECRETARIO: IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ
1° SUPLENTE: MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS
2° SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 104 DEL CONJUNTO "E", DE LA FACULTAD DE QUÍMICA. PASEO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, CIRCUITO INSTITUTOS. CIUDAD UNIVERSITARIA 04510, MÉXICO, D. F.

ASESOR DEL TEMA:



Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

SUSTENTANTE:



Rodrigo Reyna de Jesús

Agradecimientos

Durante el desarrollo experimental de la tesis pertencí al programa 127: "Formación básica en investigación" de la Facultad de Química.

Me permito expresar mi más amplio y sincero agradecimiento a la Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo, por la valiosa oportunidad que me brindó al incorporarme a sus proyectos de investigación, así como todas las enseñanzas que serán guía de mi camino profesional.

Agradezco a la M. en C. Natalia Gutiérrez Granados y a la Dra. Vanessa Maya Ampudia, por sus valiosas contribuciones para la realización de esta tesis.

A la Q. Laurel Fábila por la excelente coordinación que mantiene en el uso de equipos comunes.

Agradezco al jurado asignado por sus observaciones en el manuscrito.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AG ₃	Ácido giberélico
H ⁺ -ATPasa	Bomba de protones dependientes de hidrólisis de ATP
ATP	Adenosín Trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
GMPc	Guanil del monofosfato cíclico
iCa	Calcio citoplasmático
Ca ²⁺	Calcio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	mezcla de deoxinucleótidos fosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ER	Retículo endoplásmico
GA	Aparato de Golgi
MAE	MOPS, ácido acético, EDTA
MOPS	Ácido 3-morfolinopropanosulfónico
N ₂	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NO	Óxido nitroso
nM	Nanomolar
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa por Transcripción Reversa
SA-PMP's	partículas paramagnéticas de estreptavidina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TAE	Tris-HCl, ácido acético, EDTA
ug	Microgramo
ul	Microlitro
uM	Micromolar

CONTENIDO

Capítulo 1	Resumen	1
Capítulo 2	Introducción	3
Capítulo 3	Antecedentes	6
	3.1 Función del tejido de aleurona y modelo de estudio de transducción de señales.	6
	3.2 Eventos nucleares que el AG_3 regula en las células de la aleurona.	7
	3.3 Eventos moleculares del citoplasma regulados por AG_3 en el tejido de aleurona	8
	3.4 Mensajeros secundarios en la transducción de señales de AG_3 en aleurona.	12
Capítulo 4	Justificación	16
Capítulo 5	Objetivos	17
Capítulo 6	Materiales y Métodos	18
	6.1 Material Biológico: Obtención de medias semillas y aislamiento del tejido de aleurona	18
	6.2 Tratamiento fitohormonal del tejido de aleurona	19
	6.3 Extracción de ARN total	20
	6.4 Cuantificación del RNA total por espectrofotometría	21
	6.5 Determinación de la integridad del RNA total por electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes	21
	6.5.1 Preparación del gel de agarosa	21
	6.5.2 Preparación de la muestra de RNA total y su análisis electroforético	22
	6.6 Aislamiento de ARN mensajero (mRNA)	22
	6.6.1 Reacción de alineación	22

6.6.2 Lavado de las partículas paramagnéticas de estreptavidina (SA-PMPs)	23
6.6.3 Captura y lavado del mRNA	23
6.6.4 Elución del mRNA	23
6.6.5 Precipitación del mRNA	24
6.7 RT-PCR de dos pasos	24
6.7.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA, mediante la Transcriptasa Reversa	24
6.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
6.7.2.1 Amplificación del fragmento de 200 pb del transcrito codificante de la proteína constitutiva actina	25
6.7.2.2 Amplificación de los transcritos Hv RRP-6 y 14-3-3 isoforma A	27
6.8 RT-PCR de un paso	28
6.8.1 Amplificación de los transcritos Hv RRP-6 y 14-3-3 A	
6.9 Reacción de síntesis de primera cadena de cDNA y Amplificación Rápida de Secuencias Terminales 3' (RT-PCR RACE3') para los transcritos Hv RRP-6 y 14-3-3 A	30
6.10 Reacción de síntesis de primera cadena de cDNA y Amplificación Rápida de Secuencias Terminales 5' (RT-PCR RACE 5') para el transcrito Hv RRP-6	33
6.10.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA empleando un oligonucleótido en antisentido específico del transcrito.	33
6.10.2 Purificación del cDNA a través de columnas S.N.A.P	34
6.10.3 Adición de secuencia de poli deoxicitidina al cDNA en el extremo 5'.	34
6.10.4 Reacción de PCR RACE 5'	35
6.11 Purificación de bandas electroforéticas de un gel de agarosa con bromuro de etidio	36
6.12 Reacción de ligación: plásmido-producto de PCR	
6.13 Transformación de células competentes	37
6.13.1 Reacción de transformación	38
6.13.2 Selección de células probablemente	

	<i>transformadas con el plásmido recombinante</i>	39
6.14	Purificación del DNA plasmídico: Miniprep	39
	6.14.1 <i>Concentración de las células transformadas</i>	
	6.14.2 <i>Re-suspensión de las células transformadas</i>	40
	6.14.3 <i>Lisis de las células</i>	40
	6.14.4 <i>Neutralización</i>	40
	6.14.5 <i>Carga de la muestra en columna</i>	40
	6.14.6 <i>Lavado en columna</i>	41
	6.14.7 <i>Elución del plásmido</i>	41
6.15	Aislamiento de la fracción microsomal de aleurona de cebada	41
6.16	Determinación de la cantidad de proteína por el método de Lowry	42
6.17	Determinación de la actividad de ATPasa	42
Capítulo 7	Resultados	45
7.1	Evaluación de integridad y pureza del RNA total aislado del tejido de aleurona	45
7.2	Aislamiento y secuenciación de los transcritos de Hv RRP-6 y 14-3-3 A	46
	7.2.1 <i>Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de Hv RRP-6.</i>	46
	7.2.2 <i>RT-PCR RACE 3' para el transcrito Hv RRP-6</i>	49
	7.2.3 <i>RT-PCR RACE 5' para el transcrito Hv RRP-6</i>	51
	7.2.4 <i>Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de 14-3-3 isoforma A</i>	58
	7.2.5 <i>RT-PCR 3' para el transcrito 14-3-3 A</i>	60
7.3	Determinación de los patrones de transcripción de los genes codificantes de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 isoforma A	62
7.4	Análisis de elementos cis ubicados en la región promotora del	72

	DNA genómico codificante de la proteína Hv RRP-6 y 14-3-3 A	
	7.7 Determinación del efecto de la incubación en AG ₃ del tejido de aleurona sobre la actividad de ATPasa	76
Capítulo 8	Discusión	79
Capítulo 9	Conclusiones	83
Capítulo 10	Perspectivas	85
Capítulo 11	Apéndices	87
Capítulo 12	Referencias Bibliográficas	92

ÍNDICE DE DIAGRAMAS, TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Tratamientos fitohormonales evaluados	19
Tabla 2	Secuencias de oligonucleótidos, empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos de 200 pb y 500 pb del transcrito de actina.	25
Tabla 3	Condiciones de la reacción de PCR, para la amplificación de los fragmentos de 200 pb y 500 pb del transcrito de actina.	26
Tabla 4	Componentes de la reacción de PCR (20 ul) para la amplificación del fragmento de 200 pb del transcrito de actina.	26
Tabla 5	Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para los transcritos de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 A.	27
Tabla 6	Condiciones de la reacción de PCR, para la amplificación de los transcritos Hv RRP-6 y 14-3-3 A.	27
Tabla 7	Componentes de la reacción de PCR (20 ul) para la amplificación del fragmento de 1000 pb del transcrito de 14-3-3 A y del fragmento de 252 pb del transcrito de Hv RRP-6.	28
Tabla 8	Componentes de la reacción de PCR (20ul) para la amplificación del fragmento de 750 pb del transcrito de Hv RRP-6.	28
Tabla 9	Condiciones de la reacción de RT-PCR en un paso, para la amplificación de los transcritos de 14-3-3 A y Hv RRP-6.	29
Tabla 10	Componentes de la reacción de RT-PCR de un paso (20 ul).	29
Tabla 11	Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región 3' del transcrito Hv RRP-6 y del transcrito 14-3-3 A.	31
Tabla 12	Componentes de la reacción de PCR RACE 3' (50 ul), para la amplificación de la región 3' del transcrito Hv RRP-6.	32
Tabla 13	Condiciones de la reacción de PCR-RACE 3', para la amplificación del transcrito Hv RRP-6	32
Tabla 14	Componentes de la reacción de polimerización de citosina en la región 5' del cDNA de Hv RRP-6.	35
Tabla 15	Componentes de la reacción de PCR RACE 5' (50 ul).	35
Tabla 16	Condiciones de la reacción de PCR RACE 5', para la amplificación de la región 5' del transcrito Hv RRP-6.	36

Tabla 17	Componentes de la reacción de ligación del transcrito al vector pGem T easy.	38
Tabla 18	Inhibidores específicos de ATPasas y de Fosfatasa ácida y las concentraciones utilizadas en el ensayo de actividad.	44
Tabla 19	Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para los transcritos de la proteína Hv RRP-6, amplicón de 252 pb.	48
Tabla 20	Secuencias de oligonucleótidos, empleados para la amplificación de la región 3' del transcrito Hv RRP-6	49
Tabla 21	Secuencia del oligonucleótido, empleado para la síntesis a 42 °C del cDNA del fragmento 5' del transcrito Hv RRP-6.	52
Tabla 22	Secuencia del oligonucleótido empleado para la síntesis a 60 °C del cDNA del fragmento 5' del transcrito Hv RRP-6.	54
Tabla 23	Proteínas que muestran homología con Hv RRP-6, cuya función ha sido descrita.	58
Tabla 24	Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región 3' del transcrito 14-3-3 A.	60
Tabla 25	Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para los transcritos de las proteínas actina, 14-3-3 A y el fragmento de la Hv RRP-6...	63
Tabla 26	Secuencias de oligonucleótidos, empleados para la síntesis del amplicón de 750 pb del transcrito de Hv RRP-6.	71
Tabla 27	Secuencia y descripción de elementos cis presentes en los promotores de los genes de alfa-amilasa y de Hv RRP-6 (homólogo en <i>O. sativa</i>).	74
Figura 1	Diagrama de la reacción de RT-PCR RACE 3'.	30
Figura 2	Gel de agarosa de RNA total.	45
Figura 3	Secuencia y traducción teórica (ORF 3+), del TC 193358. Secuencias consenso de dominios de unión a calcio.	48
Figura 4	Imagen electroforética y secuencia del amplicón de 252 pb, del transcrito de Hv RRP-6	49

Figura 5	Imagen electroforética del producto de PCR-RACE 3´.	50
Figura 6	Secuencia obtenida hacia el extremo 3´ del mRNA codificante de la proteína Hv RRP-6, a través de PCR-RACE 3´.	51
Figura 7	Imagen electroforética del producto de amplificación de la PCR RACE 5´ (RT-42°C).	52
Figura 8	Producto obtenido de la secuenciación del inserto en el plásmido pGem RACE5´-6	53
Figura 9	Producto de PCR empleando DMSO en la reacción	53
Figura 10	Secuencia obtenida del inserto en el plásmido pGem RACE5´-6b.	55
Figura 11	Secuencia obtenida del inserto del pGem6-750.	55
Figura 12	Secuencia del transcrito de Hv RRP-6	56
Figura 13	Secuencia de la proteína 14-3-3 A (P29305) y su mRNA (X62388.1).	59
Figura 14	Secuencia del transcrito 14-3-3 obtenida mediante la reacción de RT-PCR RACE 3´, con su traducción teórica a proteína.	61
Figura 15	Secuencia del mRNA codificante de la proteína actina, reportada para cebada (AY145451.1).	62
Figura 16	Imágenes electroforéticas de los productos de RT-PCR, empleando RNA total como templado	64
Figura 17	Amplificación del transcrito 14-3-3 A, utilizando cDNA como templado.	65
Figura 18	Patrón de transcripción del gen codificante de la proteína 14-3-3	66
Figura 19	Imágenes electroforéticas del amplicón de 252 pb del transcrito de Hv RRP-6, tras 35 ciclos de amplificación	68
Figura 20	Imágenes electroforéticas del amplicón de 252 pb del transcrito de Hv RRP-6, tras 15 ciclos de amplificación.	69

Figura 21	Niveles de expresión del amplicón de 252 pb del transcrito Hv RRP-6 tras 20 ciclos de PCR	70
Figura 22	Cuantificación de la intensidad de las bandas en la Figura 21	71
Figura 23	Patrón de transcripción del gen codificante de la proteína Hv RPP-6	72
Figura 24	Secuencia de la región promotora del gen de la alfa-amilasa en <i>Oryza sativa</i> .	73
Figura 25	Secuencia de la región promotora del gen de la proteína homóloga a Hv RRP-6 en <i>Oryza sativa</i> .	74
Figura 26	Secuencia de la región promotora del gen de la proteína homóloga a 14-3-3 en <i>Oryza sativa</i> .	75
Figura 27	Actividad específica de ATPasa y de fosfatasa ácida de fracción microsomal de aleurona de cebada.	78

Capítulo 1

RESUMEN

Para su acción, el AG_3 se une a su receptor en la parte externa de la membrana plasmática de las células de la aleurona y activa dos vías de señalización: una que induce la activación de un sistema de expresión génica reprimido y la otra, que conduce a la elevación de los niveles de calcio en el citoplasma. A la fecha se conocen los elementos que participan en la activación de la transcripción de los genes regulados por AG_3 , así como algunos de los elementos moleculares que regulan el flujo de calcio al citoplasma, como Ca-ATPasas y canales de calcio. Sin embargo, la calmodulina es la única molécula descrita en este sistema, que es capaz de sensor los flujos de calcio, aunque en otros sistemas de transducción de señales en los que el calcio está involucrado, existen un conjunto de proteínas sensoras de los flujos de este ión.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación de la transcripción por AG_3 y ABA de dos genes cuyos productos proteicos poseen características que les permite ser postulados como posibles sensores de calcio y moduladores del flujo de este ión. Estos genes son: el *Hv RRP-6*, cuyo producto proteico posee dominios EF de unión a calcio, y el *14-3-3 A*, cuyo producto regula a algunos de los elementos responsables de establecer los flujos celulares de calcio. Los transcritos de ambas proteínas se aislaron utilizando técnicas de cDNA-PCR, para lo cual los oligos se diseñaron a partir de las secuencias de péptidos reportadas en un estudio previo de proteómica. Los patrones de transcripción mostraron que el transcrito *Hv RRP-6* fue inducido por AG_3 y su expresión inhibida por ABA. Mientras que la expresión del transcrito *14-3-3 A* fue constitutiva e independiente de la presencia de fitorreguladores.

Capítulo 2

INTRODUCCIÓN

El crecimiento del embrión, tras la germinación de las semillas de cereales, depende de la eficiente movilización de reservas almacenadas en el endospermo. Este proceso requiere una variedad de enzimas hidrolíticas (alfa-amilasa, proteasas, glucanasas, RNAsas, fosfatasas, xilanasas, lipasas, etc.), que participan en la hidrólisis de el almidón, las proteínas, los lípidos y las paredes celulares. Todos estos polímeros se encuentran almacenados en el endospermo. La inducción y la regulación de la expresión génica de algunas de estas hidrolasas, así como su síntesis proteica y su secreción son realizadas por el AG_3 (Ritchie et al, 2000). Este fitorregulador es sintetizado por el embrión y por difusión llega hasta a la aleurona donde ejerce su acción. La regulación de la fisiología de la aleurona por AG_3 , es antagonizada por ABA (Kaneko et al, 2003). Esta sensibilidad del tejido de aleurona a AG_3 y ABA, persiste en aleuronas aisladas e incubadas en presencia de estos fitorreguladores, lo cual ha convertido al tejido de aleurona en un modelo de estudio

para conocer el mecanismo de señalización y de acción del AG₃. Los estudios realizados en este sistema, indican que la interacción del AG₃ con su receptor, induce un cambio conformacional, del complejo proteico-receptor y ésto a su vez, induce el recambio de GDP/GTP en proteínas G heterotriméricas asociadas a él (Hartweck, 2006). La disociación de la subunidad alfa de la proteína G (se hipotetiza), puede inducir la activación de un canal de calcio membranal (Lovegrove y Hooley, 2000), cuya actividad produce un incremento de calcio en el citoplasma, diez minutos después de la percepción.

Lo anterior indica que la percepción del AG₃ en la membrana citoplásmica se bifurca en dos vías de señalización: una que regula los eventos génicos que conducen a la transcripción de los genes regulados por AG₃, y que se ha demostrado son independientes de calcio. La segunda vía activada, modula los cambios citoplásmicos de calcio y los eventos que en este compartimiento se modifican por efecto de este incremento en Ca²⁺ y que en general incluye los cambios metabólicos requeridos para la síntesis y secreción de las hidrolasas, de las cuales la más estudiada ha sido la alfa amilasa. En este trabajo se aislaron y secuenciaron los transcritos de dos proteínas cuyas características sugieren su participación como proteínas sensoras de los flujos de calcio o como reguladoras de la velocidad del flujo de este ión en el sistema de aleurona. Los dos genes estudiados fueron uno que codifica para la proteína 14-3-3 A y otro que codifica para una proteína con dominios EF de unión a calcio, cuya función no se ha

reportado. Sin embargo, proteínas con dominios EF similares a los que presenta la proteína aquí estudiada, en otros sistemas participan como proteínas sensoras de calcio. Por otro lado, también en otros sistemas se ha reportado que las proteínas 14-3-3 interaccionan con canales de calcio y ATPasas para regular su actividad y modular así, los flujos de calcio intracelular.

Capítulo 3

ANTECEDENTES

3.1 Función del tejido de aleurona y modelo de estudio de transducción de señales

La aleurona es el tejido que rodea el endospermo de las semillas monocotiledóneas, como son los cereales. El tejido de aleurona, en el caso de la semilla de cebada (*Hordeum vulgare*), se conforma por hasta tres capas de células homogéneas, con la misma especialización celular. Estas células pierden su capacidad de división celular durante la maduración de la semilla. La función biológica de este tejido, es la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas que son secretadas al endospermo, en donde hidrolizan los polímeros de reservas nutritivas. De esta forma, se generan nutrientes asequibles al embrión heterotrófico en desarrollo. La función del tejido, culmina con los procesos de muerte celular

programada inducidos por especies reactivas de oxígeno (ROS), que son generados por el metabolismo celular (Brecraft, 2007).

La síntesis proteica en la aleurona, es posible gracias a las reservas proteicas almacenadas en vacuolas, mismas que son empleadas como fuente de aminoácidos en la síntesis *de novo*. Para que la aleurona active los procesos metabólicos que dan lugar a la síntesis y secreción de hidrolasas, debe percibir el fitorregulador AG₃, mismo que es sintetizado por el embrión. La percepción de este fitorregulador ocurre en receptores, aun no identificados, ubicados en dominios externos de la membrana plasmática de la aleurona. Los procesos celulares inducidos por AG₃ en la aleurona, son antagonizados por ABA, sin que este efecto sea el resultado de las interacciones moleculares con el mismo receptor (Sun, 2004).

La sensibilidad del tejido de aleurona a AG₃ y ABA persiste en el tejido, aún cuando es aislado de las semillas, así mismo es posible aislar microsomas de este tejido con la misma capacidad de respuesta, siendo los microsomas modelos de estudio que permiten evaluar la participación de algunos elementos moleculares en las redes de señalización, a través de su microinyección o expresión transitoria. Estas características, aunadas a que las células que integran la aleurona manifiestan una respuesta uniforme a los fitorreguladores, que la secreción enzimática puede ser monitoreada a través de la actividad de alfa amilasa y que es posible aislar el tejido han hecho de la aleurona un sistema modelo de estudio de respuesta a fitorreguladores y sistemas de señalización celular (Lovegrove y Hooley, 2000).

3.2 Eventos nucleares que el AG₃ y regula en las células de la aleurona

En el tejido de la aleurona de cebada, los genes regulados por AG₃ constituyen un sistema reprimido a través de una proteína DELLA, SLNI, que impide la transcripción de dichos genes. La interacción del AG₃ con su receptor hipotético, una proteína aún no identificada situada en la cara externa de la membrana, induce la

degradación por proteólisis del represor SLN1. Esta degradación, en la que participa el sistema de ubiquitinilación y los proteosomas 26S, se detecta entre los dos a tres minutos después de la percepción del AG₃ (Dill, 2001). A la fecha se desconocen los eventos moleculares que conducen la señal del AG₃ desde la membrana plasmática hacia el núcleo, aunque se ha demostrado que entre la degradación de SLN1 y la transcripción (1 h después de que se percibió al AG₃), del primer gen regulado por AG₃, el factor de transcripción GAMYB, se detecta un incremento de GMPc (45 minutos después de la percepción del AG₃), por lo que se ha propuesto que este nucleótido cíclico, forma parte de la vía que conduce la señal del AG₃ de la membrana plasmática al núcleo (Simon et al,1996).

3.3 Eventos moleculares del citoplasma regulados por AG₃ en el tejido de aleurona

Por otro lado, también se ha demostrado que la interacción del AG₃ con su receptor, induce un cambio conformacional, del complejo proteico receptor-AG₃ y esto a su vez, induce el recambio de GDP/GTP en proteínas G heterotriméricas asociadas a él (Hartweck, 2006). La disociación de la subunidad alfa de la proteína G se hipotetiza, puede inducir la activación de un canal de calcio membranaral (Lovegrove y Hooley, 2000), que induce el incremento de calcio en el citoplasma, diez minutos después de la percepción. Lo anterior indica que la percepción del AG₃ en la membrana citoplásmica, se bifurca en dos vías de señalización: una que regula los eventos genéticos que conducen a la transcripción de los genes regulados por AG₃, y que se ha demostrado son independientes de calcio; y una segunda vía que produce los cambios citoplásmicos de calcio. Los eventos que se modifican en este compartimiento por efecto del incremento en Ca²⁺, en general incluyen los cambios metabólicos requeridos para la síntesis y secreción de las hidrolasas, de las cuales la más estudiada ha sido la alfa amilasa.

Debido a que en este trabajo se estudiaron proteínas que podrían estar ligadas a esta última vía de señalización, en este apartado se describirán los eventos

moleculares que se ha reportado que forman parte de esta segunda vía de señalización.

Como se mencionó anteriormente, 10 minutos después de la percepción del AG_3 la concentración de calcio en el citoplasma se incrementa. Este primer incremento puede ser resultado de la activación de canales de la membrana plasmática, así como de la salida del ión a partir de reservas celulares del ER y del GA (Chen, 1997). En estos últimos, los transportadores de calcio podrían ser receptores sensibles al IP_3 o canales sensibles a voltaje. Para que este incremento se traduzca en una respuesta celular debe ser percibido por proteínas sensibles a calcio.

Cuando el calcio ha sido liberado al citoplasma, estas proteínas transportadoras unen al ión en sitio de alta afinidad. La interacción con el calcio induce en la proteína, una modificación conformacional, lo que le permite interactuar con elementos celulares corriente abajo de la vía de señalización y son éstos elementos los que dan la especificidad en la respuesta, pero también la posibilidad de activar numerosas redes de señalización celular (Sanders et al, 1999). En el tejido de aleurona y otros sistemas vegetales, la calmodulina es una de estas proteínas, que tras la unión a calcio, sufre una reestructuración espacial, exponiendo sitios de unión a otras proteínas (Clapham, 2007).

Otras proteínas cuya función también es la de detectar los incrementos de calcio en el citoplasma son aquellas que presentan dominios EF. Estos dominios son conservados en una amplia variedad de proteínas en sistemas vegetales y animales (Jia et al, 2009). Por lo general, estas proteínas cuentan con al menos dos dominios EF de unión a calcio, existiendo algunas con cuatro dominios, en donde uno de ellos interactúa con el calcio y otro de ellos estabiliza la interacción del ión calcio con uno de los dominios. Los dominios EF de unión a calcio son estructurados por 12 residuos de aminoácidos, en los que 8 son altamente conservados y son los que participan en la coordinación con el catión divalente, formando una horquilla

flanqueada por un dominio canónico de alfa hélice en cada lado, en cada dominio EF. Los dominios se encuentran unidos por secuencias de residuos de aminoácidos variables, denominados puentes de unión de dominios de EF (Heizmann, 1991). Tanto la calmodulina como una proteína con dominios EF han sido reportadas en aleurona tratada con AG₃ (Woodger et al, 2007; Maya, 2007). En el primer caso, se ha demostrado que su expresión y función es regulada por AG₃. En el caso de la proteína con dominios EF sólo se ha descrito su presencia en microsomas tratados con el fitorregulador.

Como en algunos sistemas eucariontes, en la aleurona también se han descrito al menos dos mecanismos básicos que permiten revertir el incremento de los niveles citoplásmicos del ión calcio. Uno de ellos sería el transporte del ión hacia el interior del RE y el otro la salida del ión al espacio extra citoplasmático, ambos procesos mediados por bombas de iones, en los que se intercambia calcio (Strehler y Treiman, 2004). Una de éstas bombas, es la bomba de ATPasa dependiente de calcio, que se ubican en la membrana plasmática denominada PMCA y la que se localiza en el Retículo Endoplásmico: SERCA; ambas mantienen un sistema antiporte de protones y calcio; para el caso del las PMCA un ión calcio, y en las SERCA dos iones calcio son transportados, por molécula de ATP hidrolizada. Se considera que el sistema SERCA es el responsable de regresar el calcio liberado al citoplasma al lúmen del RE.

Aunado a éstas bombas, encontramos un segundo mecanismo de control del flujo de calcio, los acarreadores de Na⁺/Ca²⁺, los cuales mantienen un sistema antiporte, en el que transportan 3 iones Na⁺, por uno de Ca²⁺, o los acarreadores Na⁺/Ca²⁺-K⁺, que cotransportan un ión K⁺ y Ca²⁺, por cuatro iones Na¹⁺, permitiendo ambos mecanismos el flujo de calcio, desde el RE al citoplasma o del citoplasma al exterior de la célula, siendo éste mecanismo el responsable de eliminar el calcio que no fue almacenado en el RE, liberándolo al espacio extracelular (Gouaux y Mackinnon, 2005).

Otro proceso celular temprano a la percepción de AG_3 por la aleurona, es la acidificación del citoplasma. Esto ocurre una hora tras la incubación de protoplastos de aleurona en presencia de AG_3 , y comienza minutos posteriores a la elevación de calcio. La acidificación citoplasmática es transitoria, restaurándose el pH a 7.0 en las seis horas posteriores. Por ello se considera es parte de los elementos de señalización celular. El mecanismo por el cual ocurre esto, no se ha descrito y se hipotetiza que ocurre por la inhibición de la salida del malato de la aleurona al espacio extra celular (Heimovaara et al, 1994).

Esta acidificación de compartimientos celulares, no es la única que se ha identificado en el tejido de aleurona incubado en AG_3 . Dos horas posteriores a la incubación en AG_3 del tejido de aleurona, ocurre la acidificación de vacuolas de reserva proteica. La inhibición de la acidificación vacuolar, trae como consecuencia que no se realice la síntesis proteica *de novo*, incluyendo la síntesis de alfa-amilasa. De esto se deduce, que la disminución del pH 6.6 a pH 5.8, es necesaria para la hidrólisis de las proteínas almacenadas, que genera los aminoácidos para la síntesis *de novo* de proteínas (Swanson y Jones,1996). El mecanismo que induce el flujo de protones al interior de las vacuolas en protoplastos de aleurona tratados con AG_3 , no se conoce con certeza. Se identificó que el uso de un inhibidor específico de canales de H^+/Cl^- , impedía la acidificación vacuolar, sin que se haya caracterizado el canal proteico (Hwang et al, 2003). En este contexto, también existe evidencia indirecta, que describe la presencia de bombas de protones vacuolares. En protoplastos de aleurona de cebada expuestos a luz azul, se induce la acidificación vacuolar. Se ha demostrado que esta acidificación es consecuencia de la activación de la bomba primaria vacuolar H^+ -ATPasa (Hv^+ -ATPasa), a través de su interacción con la proteína 14-3-3 isoforma A. Este complejo proteico ha sido aislado e identificado a través de geles de poliacrilamida, usando inhibidores de fosfatasas (Klychnokov et al, 2007). En microsomas de aleurona de cebada incubados en AG_3 se ha identificado a la proteína 14-3-3 A, pero es necesario determinar si bajo estas condiciones la Hv -ATPasa es blanco molecular de la proteína 14-3-3 A (Elías, 2007).

Claro está que es posible que en las vacuolas de aleurona, la acidificación vacuolar ocurra por canales de H^+/Cl^- y por la bomba primaria Hv^+ -ATPasa.

La síntesis y secreción de alfa amilasa se realiza cuatro horas después de la exposición de protoplastos de aleurona a AG_3 . A este tiempo se detectan vacuolas exocíticas en regiones cercanas a la membrana plasmática. Concomitantemente, en esta última región se acumula calcio en concentraciones hasta de 500 nM (Gilroy, 1992). Lo anterior indica que la presencia de AG_3 genera los microambientes requeridos para que se realicen los procesos de transporte vesicular y exocitosis, que caracterizan a los tejidos secretores como es el caso de la aleurona. Además, dado que la alfa amilasa es una metaloenzima, su síntesis y estabilidad también están reguladas por la disponibilidad de calcio en el retículo endoplásmico. Se ha descrito que en microsomas de aleurona enriquecidos en membranas de ER, la actividad de la bomba Ca-ATPasa se incrementa hasta 5 veces cuando son tratados con AG_3 , lo que señala que la síntesis de alfa amilasa y su secreción desde el ER requiere de constante flujo de este ión hacia el interior del organelo (Bethke et al, 2007).

De lo anterior se concluye que las proteínas membranales sensoras de calcio y las proteínas moduladoras de H^+ -ATPasas juegan un papel importante en la señalización del AG_3 y la respuesta fisiológica de la aleurona a este fitorregulador.

3.4 Mensajeros secundarios en la transducción de señales de AG_3 en aleurona

La interacción del AG_3 con su receptor, en las células de aleurona, genera el reclutamiento de numerosas moléculas denominadas mensajeros secundarios, para conformar cascadas de señalización intracelular (Richards y King, 2001). Estas cascadas o redes de señalización inducen en los organelos celulares la reorientación metabólica para orquestar la respuesta celular. Es decir, las redes de señalización funcionan como un lenguaje intracelular que traducen el estímulo externo a un estímulo comprensible para cada uno de los organelos que participan en la

respuesta. Siendo esta la razón que no sea una sola molécula la que señalice ante el estímulo, cada organelo posee una memoria a los cambios que ocurren en los mensajeros secundarios para así generar respuestas específicas a cada estímulo (Tuteja y Mahajan, 2007).

En el caso específico de la aleurona, se han descrito 3 mensajeros secundarios, que posiblemente sean los elementos responsables de inducir las cascadas de señalización para orquestar la reorientación metabólica, y conducir a la respuesta fisiológica (Lovegrove y Hooley, 2000).

El primero de ellos son las proteínas G heterotriméricas, las cuales consisten en un complejo proteico formado por tres subunidades, denominadas, alfa, beta y gamma. Cuando la célula se encuentra en estado de reposo, el complejo de proteínas G, se encuentra asociado al receptor mediante la subunidad gamma. En este estado, la subunidad alfa mantiene unido GDP. Al unirse un agonista a su receptor membranal, el receptor modifica su estructura conformacional que induce sobre el complejo de proteínas G el recambio de GDP por GTP y con ello la disociación de la subunidad alfa, que es capaz de unirse a otras proteínas. Esto permite el reclutamiento de moléculas de señalización y la conformación de cascadas de señalización específicas del estímulo (Tesmer, 2010). Las proteínas G heterotriméricas han sido implicadas en la señalización de estímulos asociados a división celular, respuesta a auxinas, regulación de canales iónicos, entre otros (Perfus-Barbeoch et al, 2004)

El segundo mensajero secundario es el GMPc, molécula que es capaz de modular la actividad de otras proteínas al unirse a dominios específicos, siendo ejemplos de sus blancos moleculares la bomba primaria de H-ATPasa, canales iónicos de Na⁺, K⁺, Cl⁻ así como también cinasas dependientes de GMPc, lo cual permite su participación en numerosas redes de señalización. También se ha identificado que el GMPc es capaz de regular la expresión génica en sistemas vegetales. La síntesis de GMPc es realizada por dos tipos de Guanilil ciclasas,

diferenciadas por su ubicación celular. Un grupo de estas enzimas se ubican asociadas a receptores membranales, por lo que su activación depende de la unión del agonista al receptor. La segunda clase de Guanilil ciclasas son solubles en el citoplasma y se ha evidenciado que algunas moléculas como el NO son capaces de inducir su activación (Meier y Gehring, 2006)

El tercer mensajero secundario, y que ha sido el más estudiado es el calcio. Su participación como mensajero secundario depende de la activación de mecanismos que permitan su flujo al citoplasma, por lo cual las fluctuaciones transitorias del ión en el citoplasma funcionan como un mensajero secundario. Las proteínas que unen calcio como son las proteínas con dominios EF y C2, son activadas al unir calcio y son capaces de asociarse a otras proteínas para activar su función. Los blancos moleculares de proteínas activadas por unión a calcio son muy variados, pudiendo ser enzimas de vías metabólicas, así como canales iónicos y otras proteínas estructurales. De esta manera, el calcio participa como elemento de transducción en estímulos para la reorientación metabólica, la división celular, la reestructuración de fibras de actina, y en los procesos de señalización de muerte celular programada, en donde las reservas intracelulares de calcio se ven alteradas (Vaka et al, 2004; Micaroni, 2008; Fath y Bethke, 2000; Orrenius y Zhivotovsky, 2004).

Es conocido que los niveles de calcio funcionan en otros sistemas eucarióticos como mensajero secundario. Sin embargo, en la aleurona el incremento de calcio juega dos papeles en la respuesta a AG₃, no solo actúa como elemento en la señalización a organelos celulares, sino que participa en los procesos de exocitosis para la secreción enzimática (Gilroy, 2001). Por ello, la aleurona cuenta con mecanismos que evitan efectos negativos de su baja solubilidad en la célula. Se ha evidenciado que a las 4 horas posteriores a la incubación con AG₃ se forman microdominios alrededor de la membrana plasmática, en donde participa en la secreción enzimática. Es aquí donde deben existir mecanismos que establezcan los niveles de calcio a las concentraciones requeridas.

Es notorio que estos mensajeros secundarios, requieren de otros elementos moleculares que no han sido descritos, para señalar a sus blancos celulares y así enviar mensajes específicos a cada uno de ellos. Estos blancos celulares, resultan ser organelos membranosos como el ER, GA y la misma membrana plasmática, los cuales participan activamente en los procesos exocíticos.

Capítulo 4

Justificación

En estudios previos en el laboratorio, se identificaron dos proteínas que podrían formar parte de los elementos que estructuran las redes de señalización, inducidas por AG₃ en la aleurona de cebada. En este trabajo, se aislaron los transcritos de las proteínas, para definir los patrones de transcripción, así como obtener su secuencia y generar las construcciones necesarias para sobreexpresar ambas proteínas.

Capítulo 5

Objetivos

Objetivo general

Definir el efecto del AG₃ y ABA sobre los patrones de transcripción de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 isoforma A en la aleurona de cebada.

Objetivos Específicos

1. Aislar y obtener la secuencia de los transcritos de ambas proteínas
2. Realizar el análisis *in silico* de los transcritos para proponer una posible función como elemento de señalización de AG₃.

Capítulo 6

Materiales y Métodos

6.1 Material Biológico: Obtención de medias semillas y aislamiento del tejido de aleurona

Las semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) utilizadas, se obtuvieron del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA, cosecha 1998 y fueron guardadas a 4°C a 50 % de HR. En estas condiciones, las semillas mantuvieron su viabilidad y vigor de germinación. El embrión se descartó mediante un corte transversal con un bisturí. Las medias semillas sin embrión fueron desinfectadas en un matraz de 250 ml, con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1.2 % (v/v), por espacio de 20 minutos, con agitación continua. Posteriormente el matraz conteniendo las semillas y la solución de hipoclorito se transfirió a una campana de flujo laminar y el resto de las manipulaciones se hicieron en ambiente estéril. Una vez desinfectadas, las medias semillas fueron lavadas

repetidas veces con agua bidestilada estéril hasta eliminar el olor a hipoclorito de sodio.

Las medias semillas desinfectadas y lavadas fueron colocadas en cajas de petri estériles con papel filtro No.1 (Wathman) con 10 ml de agua estéril, suplementada con cloranfenicol (20ug/ml) y estreptomicina (20 ug/ml), por 96 horas. Transcurrido el tiempo de imbibición, el almidón de las medias semillas fue retirado en condiciones de asepsia, empleando una espátula estéril.

6.2 Tratamiento fitohormonal del tejido de aleurona

Las capas de aleurona, fueron lavadas con agua estéril y colocadas en una solución amortiguadora que contenía: cloruro de calcio (20 mM) y ácido succínico pH 5.0 (20 mM), en una proporción de 25 aleuronas por 5 ml de solución amortiguadora, el cual además contenía Cloranfenicol (20ug/ml) y Estreptomicina (20ug/ml). Se prepararon lotes de 75 capas de aleurona, en matraces de 125 ml, para colocarlas en incubación a 25°C, en agitación constante, bajo el siguiente esquema fitohormonal:

Tabla 1. Tratamientos fitohormonales evaluados

Fitorregulador	Tiempo de incubación (h)
AG ₃ (5 uM)	5 y 24
ABA (50 uM)	5 y 24
AG ₃ + ABA	5 y 24
Control (sin fitorreguladores)	0

6.3 Extracción de ARN total

El RNA total fue extraído empleando el reactivo Plant RNA Isolation Reagent® (Invitrogen). A las aleuronas aisladas e incubadas bajo los diferentes tratamientos fitohormonales previamente descritos, les fue eliminado el medio de incubación remanente y enjuagadas con amortiguador de incubación, para luego secarse con toallas de papel. Las aleuronas se homogenizaron en un mortero frío con N₂ líquido, hasta formar un polvo fino. Empleando una espátula estéril, previamente enfriada, el homogenado fue colocado en tubos eppendorf de 1.5 ml, que contenían 700 ul del reactivo de aislamiento a 4°C.

Una vez que todo el homogenizado del tejido se colocó en los tubos con el reactivo, se agitó en vórtex hasta resuspender todo el homogenado. Los tubos con la mezcla de extracción, se incubaron por diez minutos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se procedió a centrifugar a 14 000 rpm, durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en tubos de 1.5 ml, previamente enfriados, y se les adicionó 200 ul de una solución 5 M de NaCl, libre de RNAasa. Se agitó suavemente por inversión y se les adicionaron 300 ul de cloroformo a los tubos, agitando vigorosamente en el vórtex. Se procedió a centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4°C.

La fase acuosa superior, se colocó en tubos de 1.5 ml, se adicionándose, a cada tubo, un volumen equivalente de isopropanol. Los tubos se mantuvieron en hielo por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar a 14 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Las pastillas de RNA total, se lavaron con 1 ml de etanol enfriado en hielo al 75% (v/v). Se centrifugó a 12 000rpm durante 10 minutos. Las pastillas de RNA total se resuspendieron en un volumen total de 100 ul con agua previamente tratada con DEPC. Se procedió a cuantificar el RNA total por espectrofotometría (260 nm /280 nm), así como a determinar su integridad por electroforesis en gel de agarosa.

6.4 Cuantificación del RNA total por espectrofotometría

Para la cuantificación por espectrofotometría, se emplearon celdas de cuarzo de 1 ml colocando 5 ul del concentrado de RNA total y 995 ul de agua-DEPC. A ésta disolución se le determinó su densidad óptica a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm utilizando como blanco 1000 ul de agua-DEPC, con la finalidad de determinar la posible contaminación con proteína, cuyos residuos de aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano, absorben a 280 nm y por su cercanía a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos, pueden contribuir a una sobreestimación de los valores reales de ácido nucleicos cuantificados. El cálculo para obtener la cantidad de RNA total, a partir de la densidad óptica medida, se realizó considerando la siguiente relación:

$$D.O. \times \frac{40 \frac{\mu g}{mL}}{1 D.O.} \times \frac{\mu L_{vol\ final}}{\mu L_{aliquota}} \times \frac{1 mL}{1000 \mu L} = \frac{\mu g_{RNA\ tot}}{\mu L}$$

6.5 Determinación de la integridad del RNA total por electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes

6.5.1 Preparación del gel de agarosa

En un matraz estéril de 125 ml, se colocó la cantidad de agarosa Ultrapure® (Invitrogen) necesaria para alcanzar el % p/v deseado. La agarosa se disolvió en 30 ml de solución amortiguadora MAE 1X (MOPS: 40 mM, pH7, Acetato de sodio 10 mM, EDTA disódico: 1mM, pH 8); se calentó hasta disolver completamente la agarosa y observar que la disolución fuera traslúcida. Se permitió enfriar hasta 50 °C, para entonces agregar 900 ul de formaldehído al 37% y 7 ul de bromuro de etidio (10 mg/ml), se agitó hasta formar una disolución homogénea y entonces se decantó en la cámara de electroforesis (GIBCO BRL Horizontal gel electrophoresis Apparatus Horizon®58). Se colocó el peine y se dejó enfriar el gel. Una vez enfriado (hasta

obtener un color blanquecino) se adicionó solución amortiguadora MAE 1X (MOPS: 40 mM, pH 7, Acetato de sodio 10 mM, EDTA disódico 1mM, pH 8), como amortiguador de corrida (200 ml).

6.5.2 Preparación de la muestra de RNA total y su análisis electroforético

Para 5 ul de RNA total se adicionaron 20 ul de amortiguador de carga (4x) y se incubó la muestra a 65°C durante 15 minutos para desnaturalizar el RNA, inmediatamente se enfrió en hielo por 5 minutos. Se cargó la muestra en el gel y se corrió a 110 V durante 20 minutos aproximadamente, o hasta que el azul de bromofenol hubiera migrado por lo menos de 2 a 3 cm. Los geles fueron visualizados en el transiluminador UV (Macro Vue, Hoeffer) y la imagen fue tomada en el analizador de imágenes Fluores®, mediante el programa (Quantity one, Bio Rad Laboratories).

6.6 Aislamiento de ARN mensajero (mRNA)

6.6.1 Reacción de alineación

El aislamiento del mRNA, se realizó empleando el sistema RNA polyAtract mRNA Isolation System III (Promega). Para emplear éste sistema se requiere tener al menos 1 mg de mRNA.

El mRNA, se llevó a un volumen total de 500 ul, en un tubo de 1.5 ml. Se desnaturalizó a 65°C por 10 minutos, en un heatblock (Multi-block heater, Lab-line). Transcurrido este tiempo, antes de remover del heatblock, se adicionaron 3 ul de oligonucleótido biotinilado de deoxitimina (oligo dT), así como 13 ul del reactivo 20 X SSC (Citrato de sodio 0.35 M, pH 7.2, NaCl 3 M) proporcionado por el fabricante; una vez adicionados los reactivos anteriores, el tubo de reacción se sacó del heatblock y se permitió enfriar a temperatura ambiente.

6.6.2 Lavado de las partículas paramagnéticas de estreptavidina (SA-PMPs)

Previamente, el tubo que contenía las esferas SA-PMPs fue resuspendido mediante ligeras inversiones, sin agitar, hasta que fuesen completamente dispersadas. Se capturaron las SA-PMPs colocando el tubo en la base magnética, incluido en el sistema. Se removió el sobrenadante cuidadosamente (sin centrifugar las partículas). Se lavaron las SA-PMPs tres veces cada una con 300 ul de SSC 0.5X, (Citrato de sodio 8.5 mM, pH 7.2, NaCl 75 mM), esta última preparada con SSC 20X. Tras cada lavado se capturaron las SA-PMPs utilizando la base magnética y se retiró el sobrenadante teniendo cuidado de no resuspender las SA-PMPs. Finalmente, éstas se resuspendieron en 100 ul de SSC 0.5 X.

6.6.3 Captura y lavado del mRNA

Se agregó todo el contenido de la reacción de alineación al tubo con las SA-PMPs lavadas. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos mezclando suavemente por inversión cada 2 minutos. Se capturaron las SA-PMPs con la base, cuidadosamente se retiró el sobrenadante con pipeta. Se lavaron las partículas 4 veces con 300 ul de SSC 0.1X (Citrato de sodio 1.75 mM, pH7.2, NaCl 15 mM), ésta última preparada con SSC 20X. Tras el último lavado, se eliminó todo el sobrenadante posible.

6.6.4 Elución del mRNA

Las esferas paramagnéticas (SA-PMPs) se resuspendieron, por inversión, en 100 ul de agua tratada con DECP y se capturaron magnéticamente. El sobrenadante, conteniendo al mRNA, se transfirió a un tubo de 1.5 ml, estéril. Se repitió la resuspensión y captura magnética de las esferas paramagnéticas

recolectando el sobrenadante en el mismo tubo de mRNA hasta llegar a un volumen final de 250 ul.

6.6 5 Precipitación del mRNA

Debido al volumen utilizado para la elución exhaustiva del mRNA de las esferas paramagnéticas, la concentración de este polímero quedó muy diluida, por lo que se decidió concentrarlo por el método de acetato de amonio. El mRNA se precipitó con 3 ul de glucógeno (Roche), 1/3 de volumen de acetato de amonio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto; se guardó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

La pastilla se lavó con etanol al 75 % y se secó a temperatura ambiente. La pastilla de mRNA se resuspendió en 20 ul de agua tratada con DECP.

6.7 RT-PCR de dos pasos

6.7.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA, mediante la Transcriptasa Reversa

En un tubo de 200 ul libre de RNAasas, previamente enfriado en hielo, se adicionaron 5 ul de mRNA ó de 5 a 50 ug de RNA total según sea el caso. Posteriormente se le adicionó 1 ul de Oligo (dT) 12-18 (500 µg/ml, Invitrogen), 1 ul de dNTPs (10 mM cada uno, Invitrogen) y agua-DEPC c.b.p. 12 ul; la reacción se incubó a 65°C durante 5 minutos en termociclador (Gene Amp PCR System 9700) y se colocó en hielo inmediatamente, durante 5 min. El contenido fue colectado en el fondo del tubo dando un pulso en microcentrífuga a 4°C. Se agregaron 4 ul de amortiguador First Strand 5X (Invitrogen, Tris-HCl 250 mM, pH 8.3 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 2 ul de ditiotretitol (0.1 M, Invitrogen) y 1 ul de agua-DEPC, ésta reacción se incubó a 42°C durante 2 minutos en el termociclador. Transcurrido el tiempo, se añadió 1 ul (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa (SuperScript™II,

Invitrogen). Se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó a 42°C por espacio de 50 minutos en el termociclador. Transcurrido los 50 min, la reacción se incubó, para inactivar a la transcriptasa reversa, por 15 minutos a 70°C. Como paso adicional, para evitar que el mRNA interfiera en los pasos subsecuentes, se adicionó 1 ul (2 UI) de RNAsa H (Invitrogen) y se incubó por 20 minutos a 37°C.

6.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

6.7.2.1 Amplificación del fragmento de 200 pb del transcrito codificante de la proteína constitutiva actina

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación del transcrito de actina se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos , empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos de 200 pb y 500 pb del transcrito de actina

Secuencia	pb	%GC	Tm (°C)
Oligonucleótido en sentido(Fw1A) 5' TCCCAGGTATCGCTGACCGT	20	60	65.0°
Oligonucleótido en sentido inverso(Rv1A) 5' CTTCTGTGGACGATCGCTG	20	60	64.0°
Oligonucleótido en sentido (Fw 2A) 5' TCCCAGGTATCGCTGACCGT	20	60	63.0°
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv 2A) 5' CTTCTGTGGACGATCGCTG	20	60	59.1°

Las condiciones para la amplificación del transcrito de actina, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR, para la amplificación de los fragmentos de 200pb y 500 pb del transcrito de actina

Etapa	T (°C)	t (min)
Pre-desnaturalización	94	5
Desnaturalización	94	0.30
Alineamiento	63	0.30
Elongación	72	1.0
Final	72	10.0
Almacenamiento	4	α

Los ciclos de desnaturalización-alineamiento- elongación fueron variados.

Los componentes de la reacción de PCR para el amplificado de 200 pb del transcrito de actina se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR (20 ul)
Para la amplificación del fragmento de 200 pb del transcrito de actina.

Reactivo	1 Reacción (20 ul)
Buffer de PCR (10 x; 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)	2 ul
MgCl ₂ (50 mM)	0.6 ul
dNTPs mix (10 mM)	0.4 ul
Oligonucleótido (Fw) 10 uM	0.4 ul
Oligonucleótido (Rv) 10 uM	0.4 ul
cDNA	150 ng
Taq Polimerasa Platinum (5 U/ul)	1U (0.2 ul)
H ₂ O-estéril	c.b.p 20 ul

6.7.2.2 Amplificación de los transcritos de Hv RRP-6 y 14-3-3 isoforma A

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para los transcritos de las proteínas *Hv RRP-6* y *14-3-3 A*

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)	pb amplícón
Oligonucleótido en sentido (Fw 14-3-3) 5'TTCCAGGCGGCGGACCGC	18	77.8	65.5°	1000
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv 14-3-3) 5' TACCACTTCGGTCACGGTCAA	21	52.4	57.6°	1000
Oligonucleótido en sentido (Fw 1RRP-6) 5'ATGTCTACCGCTGAGGCAACC	21	77.8	65.5°	252
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv 1 RRP-6) 5'ACGCTTCGCATAGCACCATCCTACC	25	52.4	67.7°	252
Oligonucleótido en sentido (Fw 2 RPP-6) 5'GTCCCCGTGATCGAGAGAGCAC	22	63.6	62.3°	750
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv 2 RRP-6) 5'ACGCTTCGCATAGCACCATCCTACC	25	52.4	67.7°	750

Las condiciones para la amplificación del transcrito de *Hv RRP-6* y de *14-3-3 A* se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR, para la amplificación de los transcritos *Hv RRP-6* y *14-3-3 A*

Etapa	T (°C)	t (min)
Predesnaturalización	94	5
Desnaturalización	94	0.30
Alineamiento	60	0.30
Elongación	72	1.0
Final	72	10.0
Almacenamiento	4	α

Los ciclos de desnaturalización-alineamiento- elongación fueron variados

Los componentes de la reacción de PCR para la amplificación del fragmento de 1000 pb del transcrito de *14-3-3 A* y del fragmento de 252 pb del transcrito de *Hv RRP-6* son descritos en la Tabla 7. Los componentes de la reacción de PCR para la amplificación del fragmento de 750 pb del transcrito de *Hv RRP-6*, son detallados en la Tabla 8.

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR (20 ul) para la amplificación del fragmento de 1000 pb del transcrito de 14-3- y del fragmento de 252 pb del transcrito de *Hv RRP-6*

Reactivo	1 Reacción
Buffer de PCR (10x; Tris-HCl pH 8.4, KCl)	2 ul
MgCl ₂ (50mM)	0.6 ul
dNTPs mix (10mM)	0.4 ul
Oligonucleótido (Fw1 RRP6) 10uM	0.4ul
Oligonucleótido (Rv1 RRP6) 10uM	0.4 ul
cDNA	150 ng
Taq Polimerasa Platinum (5U/ul)	1U (0.2 ul)
H ₂ O-estéril	c.b.p 20 ul

Tabla 8. Componentes de la reacción de PCR (20 ul) para la amplificación del fragmento de 750 pb del transcrito de *Hv RRP-6*

Reactivo	1 Reacción
Buffer de PCR (10X; Tris-HCl pH 8.4, KCl)	2 ul
MgCl ₂ ()	0.6 ul
dNTPs mix ()	0.4 ul
Oligonucleótido (Fw2 RRP6) 10 uM	0.4 ul
Oligonucleótido (Rv2 RRP6) 10 uM	0.4 ul
cDNA	150 ng
Taq Polimerasa Platinum (5 U/ul)	1U (0.2 ul)
DMSO (J.T Baker)	0.4 ul
H ₂ O-estéril	c.b.p 20 ul

6.8 Síntesis de la primera cadena de cDNA, mediante la transcriptasa reversa y Reacción en Cadena de la DNA-polimerasa. Reacción de un paso

6.8.1 RT-PCR de un paso para el transcrito *Hv RRP-6* y el transcrito *14-3-3 A*

El sistema empleado para la reacción RT-PCR de un paso es diseñado por Invitrogen (Super Script III One step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase). Este sistema empleó mRNA como templado, ya que es una mezcla de las enzimas Transcriptasa Inversa termoestable y Taq DNA Polimerasa, generando

cDNA específico del transcrito en análisis y amplificando subsecuentemente las cadenas de cDNA sintetizadas sin detener la incubación.

Este sistema fue empleado para definir los patrones de transcripción de los genes *14-3-3 A* y *Hv RRP-6*. Los oligonucleótidos empleados fueron los que permiten la amplificación del amplicón de 1000 pb del transcrito de *14-3-3 A* y la amplificación del fragmento de 750 pb del transcrito de *Hv RRP-6*, detallados en la Tabla 5, así mismo las condiciones para efectuar la reacción de RT-PCR en un solo paso son detalladas en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de la reacción de RT-PCR en un paso, para la amplificación de los transcritos de 14-3-, *Hv RRP-6* y actina.

Etapa	T (°C)	t (min)
Síntesis cDNA	60	30
Predesnaturalización	94	2.0
Desnaturalización	94	0.5
Alineamiento	63	0.5
Elongación	68	1.0
Final	68	10.0
Almacenamiento	4	α
40 ciclos de desnaturalización-alineamiento- elongación		

Tabla 10. Componentes de la reacción de RT-PCR de un paso (20 ul)

Reactivo	1 Reacción
Amortiguador de PCR Reaction	2 ul
Mix (2X) con dNTP's	
Oligonucleótido en sentido	0.4 ul
(Fw) 10 uM	
Oligonucleótido en antisentido	0.4 ul
(Rv) 10 uM	
mRNA	5 ul
RT/ Platinum® <i>Taq</i> Mix	0.4 ul
DMSO (J.T Baker)	0.4 ul
H ₂ O-estéril	c.b.p 20 ul

Los reactivos y enzimas empleados para la reacción de RT-PCR en un paso son detallados en la Tabla 10. De la misma forma que para la síntesis de la primera cadena de cDNA, se emplearon 5 ul de mRNA, debido a que no fue posible cuantificar el templado.

6.9 Reacción de síntesis de primera cadena de cDNA Amplificación Rápida de Secuencias Terminales 3' (RT-PCR RACE3')

Para la obtención de la secuencia del transcrito codificante de *Hv RRP-6* y de la proteína *14-3-3 A* hacia la región 3', se empleó el sistema 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen), el cual proporciona la enzima Super Script II para la síntesis de la primera cadena de cDNA, empleando el oligonucleótido Adapter Primer(AP), cuya secuencia se alinea en la región de poli deoxiadenuilación de los mRNA, y que contiene una secuencia adicional donde se alinea un segundo oligonucleótido denominado Universal Amplification Primer(UAP). Para la reacción de amplificación se utiliza el primer UAP, que funciona como el primer en contra sentido y un oligonucleótido en sentido, diseñado en la secuencia conocida del transcrito analizado. Esto tiene como finalidad la de amplificar desde la región conocida hasta la región de poli deoxiadenuilación en el extremo 3' del mRNA.

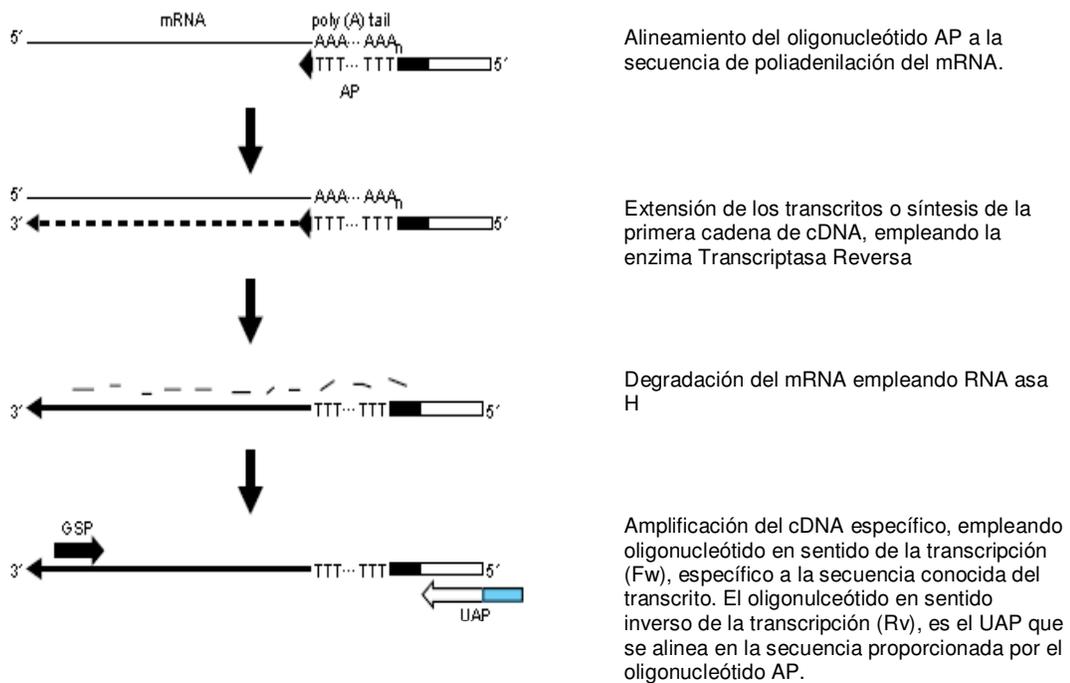


Figura 1. Diagrama de la reacción de RT-PCR RACE 3'.

La síntesis de la primera cadena de cDNA de ésta reacción, se realizó bajo las siguientes condiciones: en un tubo eppendorf de 200 ul libre de RNAasas, se adicionaron 5 ul, de mRNA, 1 ul de Oligonucleótido AP (10 uM), 5 ul de agua DECP mezclando por pipeteo; se incubó en el termociclador a 70°C por 10 minutos, transcurrido el tiempo se incubó en hielo por 1 minuto. Transcurrido el tiempo se adicionaron 2 ul de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 ul de dNTPs (10 mM cada uno), 2 ul de MgCl₂ (25 mM), 2 ul de ditiotreitól (0.1 M). Se incubó la mezcla anterior en el termociclador a 45°C por 2 minutos, para añadir 1 ul (200 UI) de transcriptasa reversa (SuperScript™II); se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó a 42°C por espacio de 50 minutos en el termociclador. Transcurrido ese tiempo, para inactivar a la transcriptasa reversa se incubó 15 min a 70°C. Como paso adicional, para evitar que el mRNA interfiriera en los pasos subsecuentes, se adicionó 1 ul (2 unidades) de RNAsa H (Invitrogen) se incubó 30 minutos a 37°C. Para el caso específico de la reacción de PCR RACE 3' del transcrito codificante de la proteína Hv RRP-6, se empleó el oligonucleótido en sentido (Fw) que se usó para la amplificación del fragmento de 252 pb (Tabla 5), y que para este sistema fue denominado GSP1a (Gene Specific Primer 1).

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región 3' del transcrito Hv RRP-6 y del transcrito 14-3-3 A

Secuencia	pb	%GC	Tm (°C)
Oligonucleótido en sentido para transcrito de Hv RRP-6 (GSP1) 5' TTCCAGGCGGCGGACCGC	18	77.8	65.5°
Oligonucleótido en sentido para el transcrito de 14-3-3 A (GSP1a) 5' ATGTCTACCGCTGAGGCAACC	18	77.8	65.5°
Oligonucleótido en sentido inverso UAP (Invitrogen, proporcionado por el Kit) para ambos casos. 5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTGACTAGTAC	32	53	67°

El oligonucleótido correspondiente al transcrito codificante de la proteína 14-3-3 A, fue el oligonucleótido en sentido (Fw) empleado para amplificar el fragmento específico de 1183 pb del sistema RT-PCR one step, denominado GSP1 para éste caso. La reacción fue conformada por los reactivos descritos en la Tabla 12, para cada una de las reacciones según el mRNA empleado.

Tabla 12. Componentes de la reacción de PCR RACE 3' (50 ul), para la amplificación de la región 3' del transcrito Hv RRP-6

Reactivo	1 Reacción (20 ul)
Buffer de PCR (10X; 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)	5 ul
MgCl ₂ (25 mM)	3 ul
dNTPs mix (10 mM)	1 ul
Oligonucleótido (Fw) 10uM	1 ul
Oligonucleótido (Rv) 10uM	1 ul
cDNA	5 ul
Taq Polimerasa Platinum (5 U/ul)	5U (1 ul)
H ₂ O-estéril	c.b.p 50 ul

Las condiciones de la reacción de PCR programadas en el termociclador para la amplificación de la región 3' de los transcritos en estudio, son descritas en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de la reacción de PCR-RACE 3', para la amplificación del transcrito Hv RRP-6

Etapa	T (°C)	t (min)
Predesnaturalización	94	3.0
Desnaturalización	94	0.5
Alineamiento	63	0.5
Elongación	72	1.5
Final	72	10.0
Almacenamiento	4	α
35 ciclos de desnaturalización-alineamiento- elongación		

Los productos de la reacción fueron extraídos con 50 ul de cloroformo, y centrifugados a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa fue recuperada en un tubo de 200 ul estéril. Posteriormente, el DNA amplificado fue corrido en gel de agarosa al 1% con Bromuro de etidio a 110V.

6.10 Reacción de síntesis de primera cadena de cDNA y Amplificación Rápida de Secuencias Terminales 5' (RT-PCR RACE 5') para el transcrito codificante de la proteína Hv RRP-6

La primera reacción de RT-PCR RACE 5' empleada para la secuenciación de la región 5' del transcrito de Hv RRP-6 fue seguida según el protocolo del sistema 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen), el cual consta de tres fases descritas a continuación.

6.10.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA empleando un oligonucleótido en antisentido específico del transcrito.

En un tubo de 200 ul libre de RNAsas, se adicionaron 5 ul de mRNA, 1 ul (10 mM) de oligonucleótido Rv RRP-6-RT (Tabla 21), c.b.p 15.5 ul de agua DECP, los cuales fueron mezclados por pipeteo; se incubó en el termociclador a 70 °C por 10 minutos, transcurrido el tiempo se incubó en hielo por 1 minuto. Se adicionaron 2.5 ul de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 ul de dNTPs (10 mM cada uno), 2.5 ul de MgCl₂ (20 mM), 2 ul de DTT (0.1 M). Se incubó la mezcla anterior en el termociclador a 45 °C por 2 minutos, para añadir 1 ul (200 UI) transcriptasa reversa (SuperScript™II), se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó a 42 °C por espacio de 50 minutos en el termociclador. Transcurrido los 50 min, para inactivar a la transcriptasa reversa se incubó 15 min a 70 °C. Como paso adicional, para evitar que el mRNA interfiera en los pasos subsecuentes, se adicionó 1 ul (2 U.I.) de RNasa H (Invitrogen) se incubó 30 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se congeló a -20 °C hasta su uso.

6.10.2 Purificación del cDNA a través de columnas S.N.A.P

Para la purificación del cDNA, se añadieron al tubo de reacción donde se sintetizó el cDNA, 120 ul de una disolución 6 M de yoduro de sodio. La mezcla anterior se transfirió a una columna S.N.A.P y ésta fue colocada en un tubo de 1.5 ml. La columna dispuesta de esta forma se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto. La disolución filtrada a través de la columna se descartó y la columna fue lavada con 400 ul de la disolución denominada "Disolución de lavado", proporcionada por el sistema. La columna se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto. La columna S.N.A.P. con el cDNA unido, fue colocada en un tubo de 1.5 ul. Para eluir el cDNA se añadió a la columna 30 ul de agua estéril previamente calentada a 65°C. Se permitió incubar por dos minutos y posteriormente se centrifugó la columna a 13000 rpm por un minuto. El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.10.3 Adición de secuencia de poli deoxicitidina al cDNA en el extremo 5´.

El sistema empleado para obtener la secuencia de la región 5´ del transcrito en estudio, requiere la adición de una secuencia de poli deoxicitosina con la finalidad de contar con una secuencia donde sea posible alinear un oligonucleótido para la reacción posterior de PCR. Para esto fue empleada la enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa (Invitrogen), la cual incorpora en el extremo 5´ del cDNA secuencias homopoliméricas de deoxinucleótidos. Para ello se tomaron 5 ul del cDNA purificado y se mezclaron los reactivos descritos en la Tabla 14. La mezcla de reacción se incubó durante 3 minutos a 94°C en el termociclador. Transcurrido el tiempo se incubó en hielo un minuto y se añadió 1 ul de enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa (5 UI). Posteriormente, se incubó la reacción por 10 minutos a 37°C. Finalmente se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos. El producto de reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tabla 14. Componentes de la reacción de polimerización de citosina en la región 5' del cDNA de Hv RRP-6

Reactivo	1 Reacción (20ul)
Amortiguador Tailing 5x; (50 mM Tris-HCl (pH 8.4), 125 mM KCl, 7.5 mM MgCl ₂)	5 ul
dCTP mix (2mM)	1 ul
cDNA purificado	5 ul
H ₂ O-estéril	c.b.p 24 ul

6.10.4 Reacción de PCR RACE 5'

El cDNA con la secuencia de poli deoxicitosina, fue empleado como templado de la reacción de PCR. En donde fue empleado el oligonucleótido en antisentido Hv RRP-6 detallado en la Tabla 5. El oligonucleótido en sentido denominado Abridge Anchor Primer para la reacción de PCR, es proporcionado por el fabricante del sistema, el cual se alinea en la secuencia de poli deoxicitidina del cDNA. Los componentes de la reacción de PCR se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15. Componentes de la reacción de PCR RACE 5' (50ul)

Reactivo	1 Reacción
Buffer de PCR (10x; 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)	5 ul
MgCl ₂ (25mM)	3 ul
dNTPs mix (10mM)	1 ul
Oligonucleótido (Fw) 10uM	2ul
Oligonucleótido (GSP2) 10uM	2 ul
cDNA poli citosina	5 ul
Taq Polimerasa Platinum (5U/ul)	5U (1 ul)
H ₂ O-estéril	c.b.p 50 ul

Las condiciones de la reacción de PCR programadas en el termociclador para la esta reacción de PCR son detalladas en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de la reacción de PCR RACE 5', para la amplificación de la región 5' del transcrito Hv RRP-6

Etapa	T (°C)	t (min)
Predesnaturalización	94	3.0
Desnaturalización	94	0.5
Alineamiento	63	0.5
Elongación	72	1.5
Final	72	10.0
Almacenamiento	4	α
35 ciclos de desnaturalización-alineamiento- elongación		

El producto de la reacción fue corrido en electroforesis y la banda electroforética detectada se purificó y se ligó al plásmido correspondiente.

6.11 Purificación de bandas electroforéticas de un gel de agarosa con bromuro de etidio

La purificación de las bandas electroforéticas de geles de agarosa fueron realizadas empleando el sistema Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Para ello la banda correspondiente al amplicón de la reacción de PCR o RT, fue cortada con un bisturí estéril, tras su visualización en el transiluminador UV, reduciendo al máximo la exposición.

Previamente, un tubo estéril de 1.5 ml fue pesado, y fue en éste tubo donde se colocó la banda recortada del gel de agarosa. Por diferencia de pesos, se determinó el peso del gel de agarosa que contenía la banda. Por cada 10 mg de gel de agarosa, se añadieron 10 μ l de amortiguador de captura (contiene acetatos y caotropos, desestabilizante de proteínas). El tubo con la mezcla anterior se colocó en el heat block a 65°C, resuspendiendo por inversión cada dos minutos hasta que la agarosa estaba totalmente disuelta, vista como una disolución translúcida

homogénea. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm por un minuto. El sobrenadante fue transferido a una columna GFX (proporcionadas por el kit y que están preempaquetadas con una matriz de fibra de vidrio) previamente colocada dentro de un tubo colector y fue incubada a temperatura ambiente durante un minuto. Se centrifugó la muestra a 14 000 rpm por 30 segundos y el volumen recuperado fue descartado vaciando el tubo colector. Se colocó la columna nuevamente dentro del tubo colector y fueron agregados 500 ul del amortiguador de lavado con etanol (Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM y EtOH 80% v/v) a la columna. Se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 2 minutos y se desechó el volumen obtenido. La columna fue colocada en un tubo eppendorf nuevo y estéril. Se agregaron 20 ul de agua estéril, directamente sobre el centro de la columna, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó a máxima velocidad por un minuto. Se comprobó la pureza corriendo 4 ul del amplificado purificado en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X.

6.12 Reacción de ligación: plásmido-producto de PCR

Los productos de PCR que fueron enviados a secuenciar a los laboratorios Macrogen (Corea), se ligaron al plásmido pGEM-T Easy vector (Promega), el cual viene linearizado y en los extremos donde es ligado el DNA de interés se encuentran secuencias de deoxitimina, que son complementarias a secuencias de deoxiadenina que particularmente incorpora la enzima Taq Polimerasa.

Para efectuar la reacción de ligación, se incorporaron los reactivos detallados en la Tabla 17 en un tubo estéril de 200 ul.

La cantidad de DNA que se añadía a la reacción fue calculada empleando la siguiente relación, previa cuantificación espectrofotométrica del DNA como se describe para el RNA total:

$$((50 \text{ ng vector})(\text{pb del DNA a ligar}) / (3.0 \text{ kB vector})) \times (3) = \text{ng del DNA a ligar}$$

Tabla 17. Componentes de la reacción de ligación del transcrito al vector pGem T easy

Reactivo	Reacción
Buffer de ligación rápida 2X para T4 DNA ligasa	5 ul
Vector pGEM-T Easy (50 ng)	1 ul
Producto de PCR	X ul
DNA T4 ligasa (3 UI/ ul)	1 ul
H2O-estéril	c.b.p 10 ul

La reacción se mezcló por pipeteo. Una vez preparada la reacción, se incubó a 4°C durante la noche.

6.13 Transformación de células competentes

6.13.1 Reacción de transformación

Se descongeló en hielo un tubo que contenía células competentes. Este proceso se tarda aproximadamente 30 minutos. En condiciones asépticas se agregaron 5 ul de la reacción estándar por duplicado, y se agregaron 2 ul de control positivo respectivamente a los tubos de células competentes, se mezclaron muy suavemente y se incubaron durante 20 minutos. Pasada la incubación se aplicó un choque térmico por 45-50 segundos a exactamente 42°C e inmediatamente se incubaron en hielo durante 2 minutos. A cada una de las reacciones de transformación se le agregaron 900 ul de medio SOC a temperatura ambiente y se incubaron durante 1.5 h a 37°C. con agitación (orbital a 250 rpm).

Para la reacción estándar, se plaquearon 50 ul de la incubación anterior en una caja Petri con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal (para su preparación ver el anexo de soluciones y medios de cultivo). El sobrante de la reacción de transformación fue centrifugada, a 13000 rpm en una microcentrífuga y se resuspendió en 100 ul de

medio SOC a temperatura ambiente y se plaqueó en otra caja con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal.

En el caso del control positivo se plaquearon, en cajas Petri con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal, 50 ul de la reacción de transformación y 50 ul de una dilución 1:10 de la misma reacción con medio SOC a temperatura ambiente. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.13.3 Selección de células probablemente transformadas con el plásmido recombinante

Se seleccionaron algunas colonias aisladas blancas de las cajas de reacción estándar y se picó cada una con palillos estériles y se sembraron en 5 ml de medio LB líquido incubando toda la noche a 37°C con agitación orbital a 250 rpm. Se procedió a purificar el DNA plasmídico, con la finalidad de realizar las pruebas que permiten denotar la presencia del DNA ligado al vector. Para ello se realizó una reacción de PCR con 150 ng de vector transgénico y los oligonucleótidos que permitieran la amplificación de un fragmento específico del DNA ligado.

6.14 Purificación del DNA plasmídico: Miniprep

El DNA plasmídico de cada colonia seleccionada fue purificado utilizando el kit Rapid Plasmid Miniprep de Marligen Biosciences, de acuerdo al protocolo del fabricante.

Antes de comenzar se verificó que la RNasa A se adicionó al amortiguador de suspensión G1 a una concentración final de 20 mg/ml. También se verificó que la solución de lisis celular, G2, no estuvieran precipitada. Se precalentó una alícuota de TE de 65 a 70°C y se añadió etanol absoluto al buffer de lavado, G4, de acuerdo al protocolo del fabricante.

6.14.1 Concentración de las células

Las células de un cultivo con células transformadas, se concentraron en un tubo de 1.5 ml, los 4 ml de cultivo restantes, centrifugando a 13000 rpm durante 1 minuto y desechando el sobrenadante cada vez hasta juntar todo el cultivo en una sola pastilla.

6.14.2 Resuspensión de las células

Se agregaron 250 ul del buffer de suspensión con RNasa A, G1 (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 20 mg/ml). Se mezcló suavemente hasta homogenizar.

6.14.3 Lisis de las células

Luego se añadieron 250 ul de solución de lisis, G2 (NaOH 200 mM, SDS 1% p/v), mezclando suavemente por inversión 5 veces e incubando a temperatura ambiente por 5 minutos.

6.14.4 Neutralización

Posteriormente se adicionaron 350 ul de buffer de neutralización, M3 (contiene acetato y guanidina-HCl), y se mezcló inmediatamente por inversión 5 veces. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos.

6.14.5 Carga de la muestra en columna

El sobrenadante fue transferido a una columna colocada dentro de un tubo de lavado de 2 ml, incluidos en el kit, y luego se centrifugaron a 12000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y la columna fue colocada nuevamente en el tubo de lavado.

6.14.6 Lavado en columna

Se agregaron 700 ul de buffer de lavado, G4 (contiene NaCl, EDTA y Tris-HCl pH 8.0), previamente preparado con etanol, y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones para eliminar el buffer residual.

6.14.7 Elución del plásmido

Nuevamente se desechó el sobrenadante y la columna fue colocada en un tubo colector de 1.5 ml para eluir el plásmido con 75 ul de buffer TE (Tris-HCl 10 mM a pH 8.0, EDTA 0.1 mM) precalentado entre 65 a 70°C. El buffer TE se colocó directamente en el centro de la columna. Luego se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. El DNA plasmídico fue guardado a -20°C hasta su uso.

6.15 Aislamiento de la fracción microsomal de aleurona de cebada

Las capas de aleuronas aisladas y tratadas con AG₃ durante 5 h, y aleuronas frescas fueron empleadas para el aislamiento de fracción microsomal. Para ello 100 capas de aleuronas fueron homogenizadas en un mortero enfriado en hielo con amortiguador de homogenización (Sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH7.8, beta mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, KCl 1 mM, PVP 0.6%, BSA 0.2% y cocktail de inhibidores de proteasa Complete® de Roche®) en una relación 3:1 (v/v). Se homogenizó hasta obtener una mezcla espesa y homogénea.

El homogenado fue filtrado a través de 4 capas de gasa estéril humedecida previamente con agua estéril. El filtrado se recuperó en tubos de policarbonato de 5 ml. El filtrado se centrifugó en una ultracentrífuga (Beckman Optima TLX) a 1000X g

a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó en tubos nuevos de policarbonato. La pastilla se descartó. El sobrenadante se procedió a centrifugar a

112 000 X g durante una hora, a 4°C. La pastilla fue resuspendida en 50 ul de amortiguador de resuspensión de botón microsomal (Sorbitol 620 mM, KH₂PO₄ 5mM, pH 7.8, DTT 1mM y EDTA 0.1 mM, con cocktail de inhibidores de proteasas Complete® de Roche®).

6.16 Determinación de la cantidad de proteína por el método de Lowry

La determinación de proteína se efectuó por el método de Lowry. Para ello, se tomaron 10 ul de fracción microsomal y se adicionaron 900 ul de agua desionizada estéril, homogenizando por pipeteo la muestra. Posteriormente se añadieron 100 ul de desoxicolato de sodio 0.15%(p/v), y 100 ul de TCA (72% p/v). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm (Microcentrífuga Eppendorf, 5414 C, refrigerada a 4°C) durante 15 minutos. La pastilla se recuperó y resuspendió en 1 ml del reactivo A que contiene en partes iguales: NaOH 0.8 M, SDS 10%(p/v), CTC (Na₂CO₃ 10%, (p/v), CuSO₄ 0.1%(p/v), Na₂K₂C₂H₄O₆ 0.2%(p/v) y 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu /Agua desionizada (1:5). Se permitió desarrollar color durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu Uv-1601) a una longitud de onda de 750 nm.

Para determinar la concentración de proteína en la muestra se preparó una curva estándar de proteína con una solución de albúmina sérica bovina (100mg/ml), en un intervalo de proteína de 10 ug a 60 ug.

6.17 Determinación de la actividad de ATPasa

La determinación de actividad de ATPasa en la fracción microsomal aislada, se determinó mediante un ensayo colorimétrico, en el cual el fósforo inorgánico liberado por la enzima, reacciona con un complejo de fosfomolibdato en medio ácido.

Consecutivamente este complejo es reducido en un medio alcalino, generando un complejo colorido, cuya absorbancia en solución puede ser determinada (González-Romo et al, 1992). Debido a la sensibilidad de la reacción, es importante haber eliminado en su totalidad del material de vidrio empleado los fosfatos presentes, mediante su lavado con ácido sulfúrico al 10%(v/v) durante toda la noche y enjuagado con agua desionizada (los tubos de plástico de 1.5 ml, presentaron grandes cantidades de fosfatos, aún cuando nuevos).

Para efectuar el ensayo, se añadieron en un tubo de ensayo libre de fósforo, 10 ug de proteína de fracción microsomal, el cual contenía 150 ul de amortiguador de reacción (Sacarosa 250 mM, PIPES 20 mM, pH 6, ATP 10 mM ajustado a pH6 con PIPES, MgCl₂ 10 mM y Carbonilcianida-m-clorofenilhidrazona (CCCP) 7uM). Con la finalidad de determinar la actividad específica de las diferentes ATPasa, se adicionaron a ésta reacción inhibidores específicos de actividad de ATPasa, los cuales son descritos en la Tabla 18. La mezcla de reacción se homogenizó por pipeteo. El tubo de reacción se incubó a 30°C durante una hora. Transcurrido el tiempo se añadieron 300 ul de solución BC que contenía en una relación 1:1, solución de ácido ascórbico al 12% (p/v) en HCl 1N, y solución de molibdato de amonio al 2% (p/v) en HCl 1N. El tubo de reacción se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Posteriormente se añadieron 450 ul del reactivo D (citrate de sodio al 2%(p/v) y meta-arsenito de sodio al 2%(p/v) en ácido acético al 2%(v/v). La reacción se agitó en vórtex y se determinó la absorbancia a 850 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV 1601).

En paralelo se realizó una curva estándar de fósforo inorgánico con K₂HPO₄, cuya solución estándar se preparó a una concentración 1mM. La curva estándar de fosfato se preparó en un intervalo de 10 a 60 nmol.

Tabla 18. Inhibidores específicos de ATPasas y de fosfatasa ácida y las concentraciones utilizadas en el ensayo de actividad

Reactivo	Concentración inhibitoria
Tris-NO ₃ Inhibidor de ATPasa de tonoplasto	200 mM
Na ₃ VO ₄ Inhibidor de ATPasa de membrana plasmática	200 μM
NaN ₃ Inhibidor de ATPasa mitocondrial	2 mM
NaMoO ₄ Inhibidor de fosfatasas ácidas	0.5 mM

Capítulo 7

Resultados

7.1 Evaluación de integridad y pureza del RNA total aislado del tejido de aleurona

La integridad de cada lote de RNA total aislado del tejido de aleurona, fue evaluada por electroforesis (Fig. 2). Para los experimentos desarrollados en este trabajo sólo se utilizaron las preparaciones de RNA total que en los geles mostraron dos veces más intensidad o amplitud de la banda de 28 s respecto de la 18 s (Mc Pherson et al, 2001).

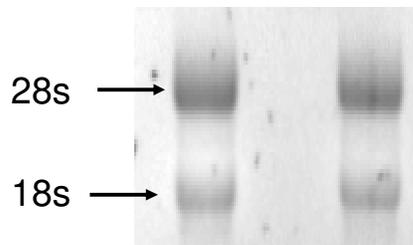


Figura 2. Gel de agarosa de RNA total. La integridad de las bandas de RNA ribosomal es un indicador indirecto de la calidad del RNA total.

La pureza y cuantificación del RNA se determinó por espectroscopía, considerando que la pureza del RNA total era aceptable, si la relación de absorbancia 260 nm /280 nm era de 1.9 a 2.0. En este rango de pureza se consideró que 1.0 U.D.O.de absorbancia a 260 nm era equivalente a 40 ug de RNA.

7.2 Aislamiento y secuenciación de los transcritos de Hv RRP-6 y 14-3-3 A

En un proyecto de proteómica membranal, realizado previamente en el laboratorio, se identificaron fragmentos peptídicos de dos proteínas asociadas a microsomas y aislados de aleurona de cebada tratadas con AG₃. Una de estas proteínas, se denominó Hv RRP-6. Su secuencia mostró alta homología con proteínas que presentan dominios EF de unión a calcio (Fig. 3) y cuya función, en otros sistemas, es la de participar en señalización (Jia et al, 2009). La segunda proteína correspondía a la isoforma A de la proteína 14-3-3. Reportes en otros sistemas biológicos indican, que es una proteína reguladora de la actividad de la bomba primaria de H⁺-ATP vacuolar y de la membrana plasmática (Schoonheim et al, 2007). Lo anterior sugería que ambas proteínas podrían estar involucradas en la regulación de la respuesta de la aleurona al AG₃. Por lo que se decidió aislar el transcrito de cada una de estas proteínas y estudiar sus patrones de expresión. Para el logro de ambos objetivos se utilizó la reacción de PCR semicuantitativa.

7.2.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de Hv RRP-6.

Para emplear la reacción de PCR, se requiere diseñar dos oligonucleótidos específicos y complementarios a los transcritos que se estudiarán. Para ello se analizaron los fragmentos peptídicos que fueron reportados por Maya (2007), y Elías (2008). Para el caso de la proteína Hv RRP-6, se buscaron en bancos bioinformáticos públicos, proteínas que mostraran en su secuencia la de los fragmentos peptídicos (Fig. 3). Se identificaron dos secuencias proteicas, una de *Arabidopsis thaliana* (At5g04170) y la segunda de *Oryza sativa* (AB621877.1). Estas secuencias son

producto de la traducción teórica de ESTs. Estos ESTs fueron utilizados para la búsqueda de secuencias homólogas en *Hordeum vulgare*, en la que el proyecto de secuenciación del genoma se encuentra en desarrollo (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). Se identificó el EST TC193358, cuya traducción a proteína, considerando el marco de lectura 3+, arrojaba una secuencia proteica en donde se identificaban los fragmentos proteicos descritos previamente (Fig. 3); Maya (2007).

A)

```

1  ATGGCTGGCTACCCCCGCCCCCGGCTCCGGCTACCCCTACGGCGCTGCTGGCGGCTAC
1  M A G Y P P P P G S G Y P Y G A A G G Y
61  GGAGCCCCGCGCCCTCCGGCCAGAAGCCCCCAAGGAAGGCAAGACCTCTTCTCTTCC
21  G A P P P S G Q K P P K E G K T S S S S
121  GGCCCCGACCCCTACCACGGCGCCCCGCCCCGCAGCAGCCTTACGGCGGGGGCGGTGGC
41  G P D P Y H G A P P P Q Q P Y G G G G G
181  GGCGGCTACGGCGCCCCACCGTCCTACGGCCAGAAGCCCCCAAGGAAGGCAAGACCTCC
61  G G Y G A P P S Y G Q K P P K E G K T S
241  TACTCCTCCGGCTCCGACCCCTACCACGGTGCTCCGCCCCGCAGCAGCCTTACGGCGGG
81  Y S S G S D P Y H G A P P P Q Q P Y G G
301  GGCGGCGGAGGCGGCTACGGGCAGCAGCCCTACGGCGCCCAGCCGCTTCGTCCGCCGG
101  G G G G G Y G Q Q P Y G A Q P P S S A A
361  CCGTACGGGGGCCCACCCGCCGCGCAGCCCTACGCAGGAGGCGGCGCCGGCGGGTACGGT
121  P Y G G P P A A Q P Y A G G G A G G Y G
421  AGCCCGTTCCGCGCGCTGGTGCCGTCGACCTTCCCGCCGGGGACGGACCCGAACGTCGTG
141  S P F A A L V P S T F P P G T D P N V V
481  GCGTGCTTCCAGGCGGGCGGACCGCGACGGCAGCGGGATGATCGACGACAAGGAGCTGCAG
161  A C F Q A A D R D G S G M I D D K E L Q
541  TCCGCGTCTCTGGGTACAGCAGCCAGAGCTTCAGCCTCCGCACCGTCCACCTCCTCATG
181  S A L S G Y S S Q S F S L R T V H L L M
601  TACCTTTCACCAACTCCAACGTCCGCAAGATCGGGCCAAAGGAGTTCACTTCTGTGTTT
201  Y L F T N S N V R K I G P K E F T S V F
661  TACAGTCTTCAGAATTGGAGGGGCATATTTGAGAGGTTTGACCGTGACCGAAGTGGTAGA
221  Y S L Q N W R G I F E R F D R D R S G R
721  ATTGATGCAGCAGAACTGCGTGATGCTCTTCTAGATCTTGGATATTCGGTCTCTCCAAC
241  I D A A E L R D A L L D L G Y S V S P T
781  GTGCTAGACTTGCTTGTGTCTAAATTTGACAAGACTGGGGGCAAGAACAAGCGGTTGAA
261  V L D L L V S K F D K T G G K N K A V E
841  TATGACAACCTTCAATGAATGCTGCCTTACAGTGAAGGGCCTGACCGAGAAGTTCAAGGAG
281  Y D N F I E C C L T V K G L T E K F K E
901  AAGGACACGGCGTACTCGGGGTCTGCAACTTTTGCTACGAGGCGTTCATGCTAACCGTG
301  K D T A Y S G S A T F G Y E A F M L T V
961  CTCCTTTCCTCATCGCA
321  L P F L I A

```

B)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				N			L				
		N		S			V				D
D	X	D	X	D	G	X	I	X	X	X	E

Figura 3. Secuencia y traducción teórica (ORF 3+) del TC 193358 (A). Las secuencias en rojo corresponden a los fragmentos peptídicos identificados por EM para la proteína Hv RRP-6. La secuencia de nucleótidos en gris señalan la secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento de 252 pb. La secuencia subrayada corresponde a dominios de unión a calcio. B) Secuencias consenso de dominios de unión a calcio; X representa cualquier residuo de aminoácido.

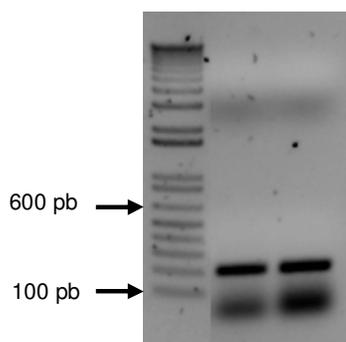
Considerando la secuencia TC193358, se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para la reacción de PCR, mostrados en la Tabla 19. Estos oligonucleótidos flaquean las secuencias codificantes de los fragmentos peptídicos conocidos (Fig. 3, secuencias en rojo).

Tabla 19. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para los transcritos de la proteína Hv RRP-6, amplicón de 252 pb.

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)
Oligonucleótido en sentido (Fw Hv) 5'ACCCGAACGTCGTGGCGTGC	22	64	64 °
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv Hv) 5'TACCACTTCGGTCACGGTCAA	21	52	64 °

El fragmento obtenido fue el esperado en cuanto al tamaño, 252 pb, mismo que se observa en la Figura 4. Este fragmento se clonó y se secuenció. Los resultados mostraron que este fragmento codificaba para la secuencia de aminoácidos previamente identificada (Fig.4B, secuencias en negritas).

A)



B)

ACCCGAACGTCGTGGCGTGCTTCCAGGCGGCGGACCGCGACGGCAGCGGGATGATCGA
 CGACAAGGAGCTGCAGTCCGCGCTCTCTGGGTACAGCAGCCAGAGCTTCAGCCTCCGCA
 CCGTCCACCTCCTCATGTACCTCTTACCAACTCCAACGTCCGCAAGATCGGGCCAAAGG
 AGTTCATTCTGTGTTTTACAGTCTTCAGAATTGGAGGGGCATATTTGAGAGGTTTGACCG
 TGACCGAAGTGGTA

Figura 4. Imagen electroforética y secuencia del amplicón de 252 pb, del transcrito de Hv RRP-6. A) Amplicón específico del transcrito de Hv RRP-6. Banda electroforética de 252 pb. B) Secuencia correspondiente del amplicón de 252 pb. Las secuencias en gris corresponden a la de los oligos empleados para su amplificación por PCR. Las secuencias en negritas corresponden a las codificantes de los péptidos identificados.

7.2.2 RT-PCR RACE 3' para el transcrito HvRRP-6

La obtención de la secuencia hacia el extremo 3' del transcrito en cuestión, fue posible tras la amplificación por PCR-RACE desde la región conocida hasta la secuencia de poli deoxiadenuilación del transcrito. Para este propósito se utilizaron el oligo en sentido empleado para generar el fragmento de 252 pb (Fw Hv) y el oligonucleótido en contra sentido (Reverse), fue proporcionado por el fabricante (Tabla 20).

Tabla 20. Secuencias de oligonucleótidos, empleados para la amplificación de la región 3' del transcrito Hv RRP-6

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)
Oligonucleótido en sentido (GSP1) 5'ACCCGAACGTCGTGGCGTGCTTCCAGGCGGCGGACCGCGACGGCAGCGGGATGATCGA	22	64	64 °
Oligonucleótido en sentido inverso UAP (Invitrogen) 5'-(CUA) ₄ GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC	32	53.0	67.0°

En estas condiciones se obtuvo un fragmento de aproximadamente 800 pb (Fig. 5A). Este fragmento se purificó, se ligó al vector pGem-Teasy, generando el plásmido recombinante pGem-RACE3'-6. Con este plásmido se transformaron bacterias. Este experimento se realizó con la finalidad de obtener suficiente número de copias que permitieran su secuenciación en los laboratorios de Macrogen (Corea). Previo al envío del plásmido para su secuenciación se procedió a corroborar la presencia del DNA ligado al plásmido, para lo cual se efectuó una reacción de PCR con los oligonucleótidos que amplificaban el fragmento de 252 pb (Tabla 20). El resultado de este experimento reveló el amplicón de 252 pb (Fig. 5B).

La secuencia del fragmento obtenido por PCR-RACE está detallado en la Figura 6. En donde la secuencia obtenida mostró la presencia de las dos secuencias de nucleótidos codificantes para los fragmentos proteicos conocidos, lo que corrobora la amplificación del transcrito en estudio.

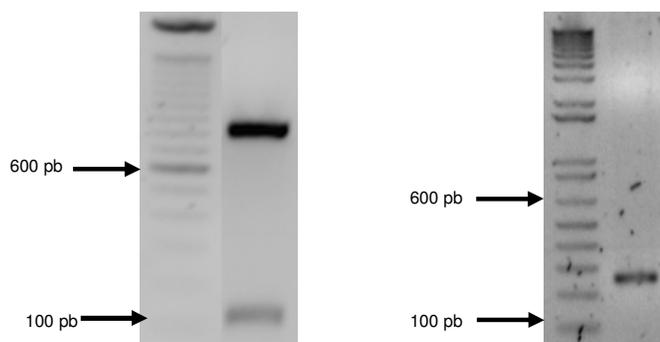


Figura 5. Imagen electroforética del producto de PCR-RACE 3'. A) Producto de RT-PCR RACE 3'. Banda electroforética de aproximadamente 800 pb del producto de RT-PCR RACE 3'. B) Amplicón de 252 pb de la proteína Hv RRP-6, empleando como templado pGem-RACE3'-6.

```

ACCCGAACGTCGTGGCGTGC TTC CAG GCC GCC GAC CGC GACGGCAGCGGGAC
                        F  Q  A  A  D  R
CATCGACGACAAGGAGCTGCAGTCCGCGCTCTCCGGCTACAACCAGAGCTTCAGCAT
CCGCACCGTCCACCTCCTCATGTACCTCTTCACCAACACCAACGTCCGCAGGATCGG
GCCAAGGAGT TT ACT TCT TCT GTT TTT TAC AGT CTT CAG AAT TGG AGGTCTA
                   F  T  S  V  F  Y  S  L  Q  N  W  R
TATTTGAGAGGTTTGACCGTGACCGAAGTGGTAAAATTGATGCATCGGAGCTGCGTGA
TGCTCTTCTCAGTCTGGGTTATTCAGTTTCTCCAAGTGTGCTAGACTTGCTCGTGTCTA
AATTCGACAAGACTGGGGGCATGAGCAAAGCAGTCGAATATGATAACTTTATTGAGTG
TCGCCTTACAGTCAAGGGTCTGACTGAGAAGTTCAAGGAGAAGGACACGGCTTACTC
CGGGTCTGCAACTTTTCAGTTACGAGGCATTTCATGTTGACTGTGCTCCCTTTCATCATTG
CATGATGGCTCCACAGTTCAAACAAAGACTGAGCTTCGATTGTGTTGTTCCCGACTT
GTTCGAAATGCTTTTCCAAGTGTAGTTGTTGTTGAATTTGAGTGATGTTGTTGC
GTTCTGATAATGTGATACCCTGGAGATTGAAACTGGTGTATGATAGAACCTGTGGA
TGGTTTGTACTCTGAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 6. Secuencia obtenida hacia el extremo 3' del mRNA codificante de la proteína Hv RRP-6, a través de PCR-RACE 3'. Las secuencias en gris señalan los nucleótidos codificantes de las secuencias peptídicas obtenidas a través de proteómica; secuencia subrayada señala el oligonucleótido empleado.

7.2.3 RTP-PCR RACE 5' del transcrito Hv RRP-6

Habiendo obtenido la secuencia del transcrito hacia la región 3' es posible diseñar el oligonucleótido para efectuar la reacción PCR-RACE 5' y obtener la secuencia hacia el extremo 5' del transcrito. El diseño de este oligonucleótido en antisentido (Reverse), requiere cumplir ciertas condiciones, ya que será utilizado para la síntesis de cDNA específico del transcrito en estudio y por ello se debe tener un T_m no mayor a 50°C , para mantener una temperatura de alineación a 42°C durante la síntesis del cDNA correspondiente. El cumplimiento de estas especificaciones en nuestro sistema resulta problemático, ya que el % de G-C en la secuencia conocida es del 70%, limitando la posibilidad de diseñar un oligonucleótido con un T_m como el indicado para la reacción de PCR. Por anterior, la única posibilidad era usar un oligonucleótido que poseía una calidad teórica del 70% y un T_m de 45°C . Esto admitía alineaciones específicas según el programa de diseño Fast PCR, y que su T_m era de 45°C (Tabla 4).

Tabla 21. Secuencia del oligonucleótido, empleado para la síntesis a 42°C del cDNA del fragmento 5' del transcrito Hv RRP-6.

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)
Oligonucleótido en sentido inverso para RT (Rv RRP-6 -RT) 5'GAAGCTCAGTCTTTGT	16	43.8	45.7°

Se siguió el protocolo detallado por el sistema empleado como se refiere en Materiales y Métodos, para la reacción de RT-PCR RACE 5'. El producto de la reacción fue ligado al vector pGem T easy, generando el vector pGem RACE5'-6a siguiendo la misma metodología que para el producto de la PCR RACE 3'. Una vez que se contaban con suficientes número de copias del plásmido, se confirmó la presencia del inserto en el plásmido a través una reacción de PCR, haciendo uso de los oligonucleótidos que amplificaban el fragmento de 252 pb, puesto que esta secuencia se encontraba dentro de la región a obtener. El resultado se muestra en la Figura 7.

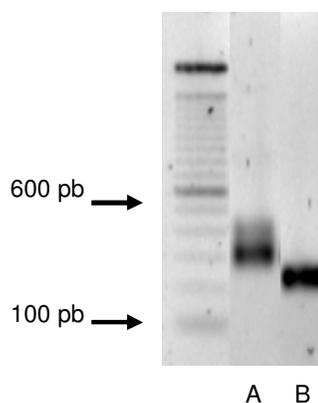


Figura 7. Imagen electroforética del producto de amplificación de la PCR-RACE 5'(RT- 42°C). A) Banda electroforética de amplificación del producto de PCR RACE 5'. Se observa una banda de aproximadamente 300 pb. B) Banda electroforética de la amplificación de 252 pb del fragmento del transcrito de Hv RRP-6, empleando como templado pGem RACE5'-6a.

Una vez realizado lo anterior se envió a secuenciar el plásmido recombinante pGem RACE 5'-6a, a los laboratorios Macrogen (Corea). La secuencia es detallada en la Figura 8.

CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCACCCGAACGTCGTGGCGTGCTTCCAGGCGGCG
GACCGCGACGGCAGCGGGATGATCGACGACAAGGAGCTGCAGTCCGCGCTCTG
 GTACAGCAGCCAGAGCTTCAGCCTCCGCACCGTCCACCTCCTCATGTACCTCTTAC
 CAACTCCAACGTCCGCAAGATCGGGCCAAAGGAGTT**CACTTCTGTGTTTTACAGTCTT**
CAGAATTGGAGGGGCATATTTGAGAGGTTTGACCGTGACCGAAGTGGTA

Figura 8. Producto obtenido de la secuenciación del inserto en el plásmido pGem RACE5'-6. La secuencia subrayada corresponde al oligonucleótido en antisentido (Rv) empleado en la reacción de PCR RACE 5. Se obtuvo un fragmento de la secuencia ya conocida.

La secuencia obtenida muestra la región correspondiente al oligonucleótido dentro de la secuencia conocida y la secuencia de poli deoxicitidina. Sin embargo al revisar la secuencia nos encontramos que ésta secuencia de nucleótidos correspondía a la región ya obtenida en la PCR-RACE 3', lo que nos sugería que la obtención de la primera cadena de cDNA era ineficiente, y la enzima Transcriptasa reversa por alguna razón detenía la transcripción y se separaba del templado. Esto podría deberse a estructuras secundarias estables del mRNA, que no se desnaturalizaron, lo cual puede ser resuelto aumentando la temperatura de reacción de RT, para la síntesis de la primera cadena de cDNA, así como añadiendo DMSO a la mezcla de reacción de la RT y a la de PCR.

Como una primera aproximación, se utilizó DMSO como desestabilizador de la estructura secundaria. Se obtuvo un amplificado de aproximadamente 300 pb (Figura 15). Lo que sugirió que sólo se habían copiado el fragmento ya secuenciado. Concluyendo que las condiciones de RT y PCR no eran adecuadas para desestabilizar la posible estructura secundaria del extremo 5' del transcrito.

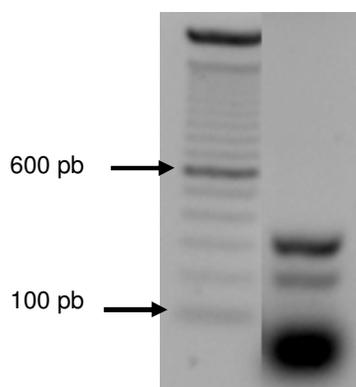


Figura 9. Producto de PCR RACE 5' utilizando DMSO en la reacción. Se observa una banda electroforética de 300 pb, así como algunas bandas inespecíficas.

Por lo anterior, se evaluó una segunda estrategia, se empleó una transcriptasa reversa termo estable, que sintetiza el cDNA a 60°C y el oligo de la Tabla 22, el cual fue empleada para la reacción de RT-PCR RACE 5', y para asegurar la desnaturalización del mRNA durante la síntesis del cDNA, también se adiciono DMSO.

Tabla 22. Secuencia del oligonucleótido empleado para la síntesis a 60° del cDNA del fragmento 5' del transcrito Hv RRP-6.

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)
Oligonucleótido en sentido inverso 5'TACCACTTCGGTCACGGTCAA	21	52	64 °

El producto de la reacción de aproximadamente 800 pb, fue ligado al vector pGem T easy vector, generando el plásmido recombinante pGem RACE5'-6b. Con este vector se transformaron bacterias. El plásmido fue enviado a secuenciar a los laboratorios Macrogen (Corea). La secuencia se muestra en la Figura 10. Nótese que la secuencia de poli deoxicitidina (secuencia en negritas) que adiciona el sistema de RACE 5' se encuentra presente, indicando que en las condiciones descritas, se copio y amplificó toda la región faltante del transcrito. Al comparar las secuencias obtenidas por la estrategia del 5' y 3' RACE con el EST TC193358, se encontró se encontró una homología del 85%.

Las diferencias podrían deberse a la dificultad que presenta la secuenciación de secuencias altamente repetidas como es el caso de este transcrito. Por lo que sobre el transcrito detallado en la Figura 10 se diseño un oligo que copiara el transcrito completo. El producto de amplificación se ligó al vector pGem Teasy, generando el plásmido recombinante pGem6-750 y de nuevo se clonó y envió a secuenciación (Fig. 11). Los resultados fueron similares a los ya obtenidos. Aparentemente, la secuenciación de fragmentos de DNA con secuencias tan repetidas de bases resulta problemático.

NNNCCCCCNCCCCNCCCCGACCNCGTGAGCGAGAGAGCATGACGTTTGCCCAAGCT
CAACCCCGACCNNGTGAGCGAGAGAGCATGACGTTTGCCCAAGCTCAACCCCATGGCGG
 GATACCCCGCCCAACGGCTCCGGCTACCCCTTGCGCGTGCTGGCGGGTACGAAAAG
 CCCATGCCCTCCGGCCAGAAGCCCCACGAGGAAGGTCAGACCTCTGCCTCTTCAGGGC
 CCGACCCCTACCACGGCGCCCCGCCCATCAGCAGCCTTACGGCGGGGGCCTGGTGGAA
 GCTACGGCGACGTTTCGTCTACTCCAGAAAGCCCAGGAAGGAAGGACAGACCTCCTACTC
 CGCCGGCTCCAACCGCTAGCACGGTGTTCGCCCCCGGCTGCGCCTTACGGGGGGGGC
 CGCGGAGGGCGCTACAGGAAGGAGGCTTACCGCGCCCAGCCTGCTTCGTCCGCCGCC
 GTACGGCCGACCACCCGCGGCTGCTGCCTACGCAGAACGCGGCGCCAGGGGTTACGAGT
 AGCGAGGAGTACGAGGTTTTGCCTTCGACCTTCCCTTCTGGACGGACCACGAACGTCGTG
 NCGTGCTTCCAGGCGGCGGACCGCGACAAGGCTGCTATGATCGACGGACAAGCCGCTGC
 AGTCCTCGCTCTCTGAATACAAAGAGCAGAGGTTTAGCCTGGGGACCGTCTACCTCCTCAT
 GTACCTCTTACCAACTCCAACGGCAGCAAGATCGGGGCAAACGAATTCACCTTCTGTGTGN
 TACAGCCTCCAGAATTGTGAACCTTTATTTAAGAGAGTTGACCGCTCACCGAAGTGC

Figura 10. Secuencia obtenida del inserto en el plásmido pGem RACE5´-

6b. La secuencia en gris corresponde al oligonucleótido en sentido inverso empleado para la reacción de PCR RACE 5´. La secuencia en negritas corresponde a la secuencia de poli deoxicitidina adicionada al transcrito, lo que señala el término del transcrito. La secuencia subrayada corresponde al oligo diseñado para determinar la regulación transcripcional de este gen.

NTGNGCNNGAGANNATGACGTTTGCCCNNGCTNNACCCCATGGCGGGATACCCCGCC
 CAACGGCTCCGGCTACCCCTTGCGCGTGCTGGCGGGTACGAAAAGCCCATGCCCTCC
 GGCCAGAAGCCCACGAGGAAGGTCAGACCTCTGCCTCTTCAGGGCCCGACCCCTACCA
 CGCGCCCCCGCCCATCAGCAGCCTTACGGCGGGGGCCTGGTGAAGCTACGGCGACG
 TTCGTCTACTCCAGAAAGCCCAGGAAGGAAGGACAGACCTCCTACTCCGCCGGCTCCAA
 CCGCTAGCACGGTGTTCGCCCCCGGCTGCGCCTTACGGGGGGGGCCGCGGAGGGCGC
 TACAGGAAGGAGGCTTACCGCGCCCAGCCTGCTTCGTCCGCCGCCGTACGGCCGACCA
 CCCGCGGCTGCTGCCTACGCAGAACGCGGCGCCAGGGGTTACGAGTAGCGAGGAGTACG
 AGGTTTTGCCTTCGACCTTCCCTTCTGGACGGACCACGAACGTCGTGNCGTGCTTCCAGG
 CGGCGGACCGCGACAAGGCTGCTATGATCGACGGACAAGCCGCTGCAGTCTCCTCGCTCTC
 TGAATACAAAGAGCAGAGGTTTAGCCTGGGGACCGTCTACCTCCTCATGTACCTCTTACC
 AACTCCAACGGCAGCAAGATCGGGGCAAACGAATTCACCTTCTGTGTGNTACAGCCTCCAG
 AATTGTGAACCTTTATTTAAGAGAGTTGACCGCTCACCGAAGTGC

Figura 11. Secuencia obtenida del inserto del pGem6-750.

Las secuencias subrayadas denotan los oligos empleados. La secuencia muestra identidad con la obtenida tras la reacción de RT-PCR RACE 5´ (Fig.10), lo que asegura la amplificación del transcrito en estudio.

Considerando la secuencia del transcrito de Hv RRP-6 obtenida tras las reacciones de RT-PCR 3´Y RT-PCR 5´, es posible definir la secuencia completa del transcrito en estudio (Fig. 12), así obtener la traducción teórica del transcrito. La proteína teórica puede ser analizada *in silico* para predecir posibles modificaciones post traduccionales.

```

1 ACCACGTGAGCGAGAGAGCATGACGTTTGCCCAAGCTCAACCCCATGGCGGGATACCCCC
1 W R D T P
61 CGCCCAACGGCTCCGGCTACCCCTTGCGCGTGTGGCGGGTACGAAAAGCCCCATGCC
6 R P T A P A T P C A L L A G T K S P M P
121 TCCGGCCAGAAGCCCCACGAGGAAGGTCAGACCTCTGCCTCTTCAGGGCCGACCCCTAC
26 S G Q K P H E E G Q T S A S S G P D P Y
181 CACGGCGCCCCGCCCATCAGCAGCCTTACGGCGGGGGCCTGGTGAAGCTACGGCGACG
46 H G A P P H Q Q P Y G G G L V E A T A T
241 TTCGTCCTACTCCCAGAAGCCCAGGAAGGAAGGACAGACCTCCTACTCCGCCGGCTCCAA
66 F V L L P E A Q E G R T D L L L R R L Q
301 CCGCTAGCACGGTGTTCGCCCCCGGCTGCGCCTTACGGGGGGGGCCGCGGAGGGCGCTA
86 P L A R C S A P G C A L R G G P R R A L
361 CAGGAAGGAGGCTTACCGCGCCAGCCTTTCGTCGCGCCCGCCGTACGGCCGACCACCC
106 Q E G G L P R P A C F V R R P Y G R P P
421 GCGGCTGCTGCCTACGCAGAACGCGCGCCAGGGGTTACGAGTAGCGAGGAGTACGAGGT
126 A A A A Y A E R G A R G Y E * R G V R G
481 TTTGCCTTCGACCTTCCCTTCTGGACGGACCACCCGAACGTCGTGGCGTGCTCCAGGCC
146 F A F D L P F W T D H P N V V A C F Q A
541 GCCGACCGCACGGCAGCGGGACCATCGACGACAAGGAGCTGCAGTCCGCGCTCTCCGGC
166 A D R D G S G T I D D K E L Q S A L S G
601 TACAACCAGAGCTTACGATCCGCACCGTCCACCTCCTCATGTACCTCTTACCAACACC
186 Y N Q S F S I R T V H L L M Y L F T N T
661 AACGTCCGCAGGATCGGGCCCAAGGAGTTTACTTCTGTTTTTACAGTCTTCAGAATTGG
206 N V R R I G P K E F T S V F Y S L Q N W
721 AGTCTATATTTGAGAGTTTGACCGTGACCGAAGTGGTAAAATTGATGCATCGGAGCTG
226 R S I F E R F D R D R S G K I D A S E L
781 CGTGATGCTCTTCTCAGTCTGGGTTATTCAGTTTCTCCAAGTGTGCTAGACTTGTCTCGT
246 R D A L L S L G Y S V S P T V L D L L V
841 TCTAAATTCGACAAGACTGGGGGCATGAGCAAAGCAGTCGAATATGATAACTTTATTGAG
266 S K F D K T G G M S K A V E Y D N F I E
901 TGTCGCCTTACAGTCAAGGGTCTGACTGAGAAGTTCAAGGAGAAGGACACGGCTTACTCC
252 C R L T V K G L T E K F K E K D T A Y S
961 GGGTCTGCAACTTTTACGTTACGAGGCATTTCATGTTGACTGTGCTCCCTTTCATCATTGCA
306 G S A T F S Y E A F M L T V L P F I I A
1021 TGATGGCTCCACAGTTCAAACAAGACTGAGCTTCGATTGTGTTGTTCCCGACTTGTGT
326 *
1081 CGAAATGCTTTTCCAAGTGTAGTTTGTGTTGAATTTGAGTGATGTTGTTGCGTTCC
1141 TGATAATGTGATACCCTGGAGATTGGAAGTGGTGTATGATAGAACCTGTGGATGGTTTG
1201 TTAAGTCTGAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 12. Secuencia del transcrito de Hv RRP-6 tras el empalme de las secuencias de los productos de RT-PCR RACE 3' y 5'. Se muestra la traducción teórica a proteína, considerando el ORF 2. Las secuencias subrayadas corresponden a las determinadas por EM. Las secuencias en rojo corresponden a un posible sitio de glicosilación. Las secuencia en azul posibles sitios de fosforilación por PKC. En verde, dominio de potencial miristoilación. Las cisteínas marcadas en rojo pueden generar entre sí enlaces disulfuro. Las secuencias en amarillo corresponden a los dominios EF de unión a calcio.

Como se observa en la Figura 12, en la estructura primaria se predicen algunas modificaciones postraduccionales que pueden sugerir el compartimiento celular de localización, y probablemente su función. La miristoilación (verde), se ha descrito en algunas proteínas con dominios EF de unión a calcio, en donde una vez que el calcio es ligado al dominio de unión, la proteína sufre la adición de un residuo de miristoílo. La proteína modificada se recluta a la membrana plasmática donde se asocia a los fosfolípidos a través del miristoílo. En caso de comprobarse este mecanismo podría permitir a la proteína Hv RRP-6 migrar a la membrana plasmática donde fue identificada. La fosforilación de proteínas se ha descrito como un mecanismo que activa su función, la cual en algunos casos induce la exposición de dominios de interacción con otras proteínas. Generalmente esta fosforilación se realiza por cinasas dependientes de calcio. En el caso particular de la HvRRP-6 presentó un sitio de fosforilación (azul) por PKC. Así mismo cabe recordar que esta proteína se identificó por la presencia de cisteínas sensibles a modificaciones en el potencial redox, lo que se confirma por las cisteínas vecinales identificadas en la traducción teórica (residuos de cisteína 90 y 95). Tras este análisis se confirma que el transcrito de Hv RRP-6 codifica para una proteína con posibles características de algunas proteínas sensoras de calcio.

El análisis de homología e identidad de los productos de traducción teórica de la secuencia obtenida del transcrito de *Hv RRP-6* y del EST TC193358, evidencia un 65% de identidad. Mientras que a nivel de mRNA, la homología es del 85%. Esto puede ser debido a los errores durante la secuenciación, ya que la mayor diferencia entre los mRNA se ubican en la región 5'UTR. O bien existen más de un transcrito homólogo al EST TC 1993358.

Empleando la proteína obtenida por la traducción teórica de la secuencia obtenida del transcrito de *Hv RRP-6*, se realizó una búsqueda de proteínas que presentaran homología con *Hv RRP-6* y en los que se hubiera reportado su función. Este análisis permitió identificar dos proteínas en diferentes tejidos vegetales, cuya función ha sido descrita. Ambas proteínas son descritas en la

Tabla 23. Es importante mencionar que las proteínas que muestran homología con *Hv RRP-6*, corresponden en identidad dentro de los dominios de unión a calcio.

Tabla 23. Proteínas que muestran homología con *Hv RRP-6*, cuya función ha sido descrita.

No. De Identificación	Nombre de la proteína	Homología	% de identidad de la secuencia	Expectancia
CAB63845.1	Proteasa de cisteína [<i>Pisum sativum</i>]	62.6	85 %	6e-09
XP_001829781.1	proteína 2 asociada a apoptosis [<i>Coprinopsis cinérea</i>]	85 %	38%	2e-04
<p>Dominio de homología de la proteína <i>Hv RRP-6</i> con la proteína CAB63845.1 (157-302 aa)</p> <pre> PSIVACFQVADQDGSGLIDDKELQRALSSYNQSFSLRTVHLLMYHFTNTSVK-IGPKEFT P++VACFQ AD+DGSG IDDKELQ ALS YNQSPS+RTVHLLMY FTNT+V+ IGPKEFT PNVVACFQAADRDGSGTIDDKELQSAISGYNQSF SIRTVHLLMYLFTNTNVRRI GPKEFT SLFYSLQSWRGIFERFDKDRSGQIDSNELRDALLSLGYAVSPTVLDLLVSKFDKTGGKHK S+FYSLQ+WR IFERFD+DRSG+ID++ELRDALLSLGY+VSPTVLDLLVSKFDKTGG K SVFYSLQNWR SIFERFDRDRSGKIDASELRDALLSLGYSVSPVLDLLVSKFDKTGMMSK AVEYDNFIECCLTVKGLTDKFKEKDT AVEYDNFIEC LTVKGLT+KFKEKDT AVEYDNFIECRLTVKGLTEKFKEKDT </pre>				

7.2.4 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de 14-3-3 isoforma A

Los fragmentos peptídicos obtenidos por espectroscopía de masas, se buscaron en proteínas de cebada, reportadas en Swiss Protein Knowledgebase (<http://www.uniprot.org/>). La proteína en la que se hallaban la secuencia de los fragmentos peptídicos correspondían a la proteína 14-3-3 isoforma A (P29305), por lo cual se buscó en European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>), el mRNA codificante de esta proteína (X62388.1). Se ha reportado que las secuencias de proteínas 14-3-3 son muy conservadas, por lo que para aislar sólo el transcrito de la isoforma A, para el diseño de los oligos necesitan emplearse las regiones más divergentes de los transcritos. Para localizarlas, las secuencias reportadas en A.

thaliana (banco de bioinformática Robert J. Ferl Laboratory, Universidad de Florida; <http://www.hos.ufl.edu>) de la familia de proteínas 14-3-3, se compararon entre sí. De

este análisis se concluyó que las secuencias divergentes son la secuencia que codifica para los 10 primeros aa y la región del 3' UTR (Fig. 13). Estas regiones se mantienen en las isoformas de cebada reportadas (NCBI).

```

1   CCCCACAGCCAGCGCCCACTCGCCCGAGATCCGCTGCCGAGGCCCGTGAGAACTCCGCCG
61  CGCCAGAGGAAAAGGCACTGAACTAGGTTGTAACAAGGAACAGGGAAGATGTCTACCGCT
1   M S T A
121 GAGGCAACCCGTGAGGAGAATGTGTACATGGCCAAGCTCGCTGAGCAGGCTGAGCGTTAC
5   E A T R E E N V Y M A K L A E Q A E R Y
181 GAGGAAATGGTCGAATTCATGGAGAAGGTTGCAAAGACCGCTGATGTCCGGTGAGCTCACT
25  E E M V E F M E K V A K T A D V G E L T
241 GTTGAGGAGCGCAACCTGCTGTCTGTGGCTTACAAGAATGTGATTGGTGCCCGGAGGGCA
45  V E E R N L L S V A Y K N V I G A R R A
301 TCCTGGAGGATCATCTCCTCCATTGAGCAGAAGGAGGAGAGCCGTGGGAACGAGGCCTAT
65  S W R I I S S I E Q K E E S R G N E A Y
361 GTCGCTTCGATCAAGGAGTACCGTACCAGGATTGAAACTGAGCTCAGCAAGATCTGCGAT
85  V A S I K E Y R T R I E T E L S K I C D
421 GGCATCCTCAAGCTTCTGGACTCCACCTCGTCCCCTCTGCCACTGCAGCAGAGTCCAAG
105 G I L K L L D S H L V P S A T A A E S K
481 GTGTTCTATCTGAAAATGAAGGGTGATTACCACAGGTACCTTGCGGAGTTCAAGGCCGGT
125 V F Y L K M K G D Y H R Y L A E F K A G
541 GCTGAGAGGAAAGAAGCAGCTGAGAACACTCTTGTTCGTACAAGTCAGCCCAGGACATT
145 A E R K E A A E N T L V A Y K S A Q D I
601 GCTCTTGCTGACTTGCCCTACCACTCACCCGATTAGGCTTGGGCTTGCACTCAACTTCTCA
165 A L A D L P T T H P I R L G L A L N F S
661 GTGTTCTACTATGAAATCCTGAACTCTCCAGACCGTGCTTGCAACCTTGCCAAGCAGGCA
185 V F Y Y E I L N S P D R A C N L A K Q A
721 TTTGATGAAGCTATTGCTGAGCTGGACTCCCTCGGCGAGGAATCCTACAAGGACAGCACC
205 F D E A I A E L D S L G E E S Y K D S T
781 TTGATCATGCAACTTCTTCGTGACAACCTTGACCCTCTGGACCTCCGATAACGCAGAGGAG
225 L I M Q L L R D N L T L W T S D N A E E
841 GGTGGTGATGAGATCAAGGAAGCTGCCTCAAAGCCTGAGGGAGAGGGGCACTGATTGGCC
261 G G D E I K E A A S K P E G E G H
901 CCAAGAGTGCCCAAGTTTATTTCTGAGTCCATTTACGCAGCTACCTGTATCATTCCG
961 ATCATAAGATGTACTAGGGTCGTTGCACTATGTGAATCATAAGATGTGGTAGGATGGTG
1021 CTATGCGAAGCGTGTCGAGCTGAAGTACCTAGTGGACTACAGTCATGAGGACGGTTCATGT

1081 GGACATCGTCGCTTCTTAGTTCATTAGCAGATTTCAAACCTATTTCTGTATTGCAGCACA
1141 TTATTAGTATTGCTGTATTAGCAATTTTCATGGCTTGTGATGATTGATCATACTTCGCG
1201 TAAGGCGCCCCAAAGCTTGTGCCTTTCTTATGAGGCAACAACCTGAGATTTTCTTGTCTA
1261 CTTCCCTCTCAAATAATTGAAGTTCTAGGATTCTCCCTTAGCTTAATTATGAAATGT
1321 ATTTTCTTATTATTATATCGATCCACATGTTCAACATCA

```

Figura 13. Secuencia de la proteína 14-3-3 A (P29305) y su mRNA (X62388.1). Las secuencias en rojo corresponden a los fragmentos peptídicos encontrados por EM. Las secuencias en gris corresponden a las secuencias consideradas para los oligonucleótidos de la PCR.

Por estas características, los oligonucleóticos, para la reacción de PCR se diseñaron sobre el mRNA de la proteína 14-3-3 A, en las regiones divergentes (Fig.13). Los oligonucleótidos así diseñados, amplifican un fragmento de 1000 pb, cuya secuencia corresponde al 100 % de identidad en el transcrito y en la proteína.

7.2.5 RT-PCR RACE 3' del transcrito 14-3-3-A

Con la finalidad de corroborar que el transcrito analizado correspondía con el transcrito de la proteína 14-3-3 A, se procedió a copiar y amplificar la secuencia del transcrito de 14-3-3 A hacia la región 3', haciendo uso de la reacción de RT-PCR RACE 3' de la misma forma como se describió para el transcrito de Hv RRP-6. Los oligonucleótidos empleados para esta reacción se detallan en la Tabla 23.

Tabla 24. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región 3' del transcrito 14-3-3 A

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)
Oligonucleótido en sentido para el transcrito de 14-3-3 A (GSP1a) 3' ATGTCTACCGCTGAGGCAACC	18	77.8	65.5°
Oligonucleótido en sentido inverso UAP (Invitrogen, proporcionado por el Kit) CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTCGACTAGTAC	32	53	67°

Siguiendo las mismas estrategias experimentales que las ya detalladas, fue posible obtener la secuencia del transcrito de 14-3-3 A hacia la región 3'. Nótese que en el experimento del 3'RACE se copió tanto el marco de lectura, como un fragmento del UTR 3', debido a los oligos utilizados (Tabla 23).

```

1 ACCGCTGAGGCAACCCGTGAGGAGAATGTGTACATGGCCAAGCTCGCTGAGCAGGCTGAG
1 M A K L A E Q A E
61 CGTTACGAGGAAATGGTCAATTCATGGAGAAGGTGGCAAAGACCGCTGATGTCGGTGAG
10 R Y E E M V E F M E K V A K T A D V G E
121 CTCACTGTTGAGGAGCGCAACCTGCTGTCTGTGGCTTACAAGAATGTGATTGGTGCCCGG
21 L T V E E R N L L S V A Y K N V I G A R
181 AGGGCATCCTGGAGGATCATCTCCTCCATTGGGCAGAAGGAGGAGAGCCGTGGGAACGAG
41 R A S W R I I S S I G Q K E E S R G N E
241 GCCTATGTCGCTTCGATCAAGGAGTACCGTACCAGGATTGAAACTGAGCTCAGCAAGATC
61 A Y V A S I K E Y R T R I E T E L S K I
301 TGCGATGGGATCCTCAAGCTTCTGGACTCCCACCTCGTCCCCTCTGCCACTGCAGCAGAG
81 C D G I L K L L D S H L V P S A T A A E
361 TCCAAGGTGTTCTATCTGAAAATGAAGGGTGATTACCACAGGTACCTTGCGGAGTTCAAG
101 S K V F Y L K M K G D Y H R Y L A E F K
421 GCCGGTGTGAGAGGAAAGAAGCAGCTGAGAACACTCTTGTTGCGTACAAGTCAGCCCAG
121 A G A E R K E A A E N T L V A Y K S A Q
481 GACATTGCTCTTGCTGACTTGCCTACCACTACCCGATTAGGCTTGGGCTTGCACTCAAC
141 D I A L A D L P T T H P I R L G L A L N
541 TTCTCAGTGTCTACTATGAAATCCTGAACTCTCCAGACCGTGCTTGCAACCTTGCCAAG
161 F S V F Y Y E I L N S P D R A C N L A K
601 CAGGCATTTGATGAAGCTATTGCTGAGCTGGACTCCCTCGGCGAGGAATCCTACAAGGAC
181 Q A F D E A I A E L D S L G E E S Y K D
661 AGCACCTTGATCATGCAACTTCTTCGTGACAACCTTGACCCTCTGGACCTCCGATAACGCA
201 S T L I M Q L L R D N L T L W T S D N A
721 GAGGAGGTGGTGATGAGATCAAGGAAGCTGCCTCAAAGCCTGAGGGAGAGGGGCACTGA
221 E E G G D E I K E A A S K P E G E G H *
781 TTGGCCCTCAGAGTGTGCCCAAGTTTATTTCTGAGTCCATTTACGCAGCTACCTGTATCA
841 TTCGGATCATAAGATGTACTNGNTCGAGGGTTCGGTTGCACTATGTGAATCATAAGATGTG
901 GTAGGATGGTGCTATGCGAAGCGTGTGAGCTGAAGTACCTAGTGGACTACAGTCATGAG
961 GACGGTCATGTGGACATCGTTCGCTTCTTAGTTTCATTAGCAGATTTCAA

```

Figura 14. Secuencia del transcrito 14-3-3 obtenida mediante la reacción de RT-PCR RACE 3', con su traducción teórica a proteína. Las secuencias en rojo corresponden a un posible sitio de glicosilación. Las secuencia en azul posibles sitios de fosforilación por PKC. En verde dominio de potencial miristoilación. La secuencia subrayada denota un sitio de fosforilación por cinasas dependientes de GMPc.

Como se ha detallado en la Figura 14, la traducción teórica de la secuencia del transcrito de 14-3-3 A, permite realizar una análisis *in silico* de las posibles modificaciones post traduccionales que puede sufrir la proteína. Al igual que la proteína teórica de Hv RRP-6, existen dominios de potencial miristoilación, que podría facilitar su asociación a fosfolípidos de membrana. Resulta de gran importancia identificar un sitio de fosforilación por cinasas dependientes de GMPc, lo que puede sugerir un mecanismo que module su actividad en los procesos de señalización del tejido de aleurona.

7.3 Determinación de los patrones de transcripción de los genes codificantes de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 isoforma A

Como se mencionó para estudiar los patrones de transcripción de los genes de interés, se utilizó la reacción de PCR semicuantitativa, es decir, la amplificación de un fragmento asociado al mRNA codificante de la proteína en estudio, permite obtener bandas electroforéticas en donde la intensidad de la banda puede asociarse a los niveles de expresión del gen, siempre y cuando la misma cantidad de templado sea utilizada en la reacción de PCR. Para ello, el sistema se valida a través de la amplificación de transcritos provenientes de genes de expresión constitutiva. En éste caso, se utilizó el gen de actina, en donde si en todos los tratamientos se utilizó la misma cantidad de cDNA, la intensidad de las bandas electroforéticas deben ser de la misma intensidad en todos los casos. En este contexto, también se requirió del diseño de un par de oligonucleótidos que amplificaran un fragmento del transcrito de actina.

```

1   GAATTCATTCTGTAGGAAATGGCTGACGGTGAGGACATCCAGCCCCTTGTCTGCGACAA
61  TGGAACCGGAATGGTCAAGGCTGGTTTCGCTGGAGATGATGCGCCAAGGGCTGTTTTCCC
121 TAGCATAGTTGGTCGCCCTCGGCACACTGGTGTTCATGGTAGGGATGGGGCAGAAGGATGC
181 TTATGTTGGTGATGAGGCGCAGTCCAAGAGAGGTATCCTCACGCTCAAGTACCCCATCGA
241 GCACGGTATCGTAAGCAACTGGGATGACATGGAGAAAATCTGGCATCACACTTTCTACAA
301 TGAGCTCCGTGTGGCACCCGAGGAGCACCCCTGTGTTGCTCACTGAGGCCCTTTGAACCC
361 AAAAGCCAACAGAGAGAAGATGACCCAGATTATGTTTGAGACTTTCAATGTTCTCGCCAT
421 GTACGTCGCTATTCAGGCCGTGCTTTCCCTCTATGCAAGTGGTCGTACTACTGGTATCGT
481 TCTCGACTCTGGTGATGGTGTACAGCCACACTGTGCCATTTATGAAGGATACGCGCTTCC
541 CCATGCCATTCTTTCGTTTGGATCTCGCTGGTTCGGGATCTCACGGACTCCCTTATGAAGAT
601 CCTCACCGAGAGAGGTTACTCCCTTACAACCTCAGCTGAGCGGAAATTGTAAGGGACAT
661 CAAGGAGAAGCTTGCGTACGTTGCCCTTGATTATGAACAGGAGCTGGAGACTGCCAAGAA
721 CAGCTCCTCAGTTGAGAAGAGCTACGAGCTTCCCTGATGGTCAGGTGATCACGATTGGCGC
781 AGAGAGGTTTCAGGTGCCCTGAGGTCTCTTCCAGCCATCCATGATCGGCATGGAGTCTTC
841 TGGAATCCACGAGACGACCTACAACCTCATCATGAAGTGTGACGTGGATATCAGGAAGGA
901 CTTGTATGGAAACATCGTGCTCAGTGGTGGCACAACTATGTTCCCAGGTATCGCTGACCG
961 TATGAGCAAGGAGATCACCGCCCTTGCTCCGAGCAGCATGAAGATCAAGGTGCTCGCTCC
1021 ACCTGAGAGGAAGTACAGTGTCTGGATCGGAGGGTCCATCCTAGCCTCACTCAGCACTTT
1081 CCAACAGATGTGGATATCCAAGGATGAGTACGACGAGTCTGGCCCAGCGATCGTCCACAG
1141 GAAGTGCTTCTGATCTCCACGAGCGCTCCACTGCTGTTATCATCTAGTCTTCGGTTATGT
1201 TTGGTTCATTCTTCTAGAAATGATTGCGTATTTGCAAGCTATGTTTTTTTCCAGACGTG
1261 ACGTGGGTACTCTTGGGATACGCCACCTATATACGTGGCGGCTCCATGGTGCAAGTGCAA
1321 GTACACTATCTATGTTTGTGCATTGTCAGTGTGTTTGTGGGATCAGTTGTCAAACCTGGG
1381 TTGGCTTGATTTGTTGTTGGGAATTGTCTGTAAAGGAAT

```

Figura 15. Secuencia del mRNA codificante de la proteína actina, reportada para cebada (AY145451.1). Las secuencias en doble subrayado, corresponden a la de los oligonucleótidos para la reacción de PCR, cuyo amplificado corresponde a 208 pb. Las secuencias subrayadas, corresponden al par de oligonucleótidos cuyo amplicón es de 500 pb.

El mRNA de esta proteína fue buscado en el banco de bioinformática NCBI, identificando la secuencia AY145451.1 de *Hordeum vulgare* (Fig.15), misma que se usó para el diseño de dos pares de oligonucleótidos, cuyos amplicones corresponden a 203 pb y 500 pb .

A este punto ya se han diseñado los oligos que nos permiten amplificar fragmentos específicos de los transcritos en estudio, mismos que se presentan en la tabla 24.

Tabla 25. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para los transcritos de las proteínas actina, 14-3-3 A y el fragmento de la Hv RRP-6..

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)	pb amplicón
Oligonucleótido en sentido (Fw 14-3-3) 5' TTCCAGGCGGCGGACCGC	18	77.8	65.5°	1000
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv 14-3-3) 5' TACCACTTCGGTCACGGTCAA	21	52.4	57.6°	1000
Oligonucleótido en sentido (Fw RRP-6) 5' ATGTCTACCGCTGAGGCAACC	21	77.8	65.5°	252
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv RRP-6) 5' ACGCTTCGCATAGCACCATCCTA CC	25	52.4	67.7°	252
Oligonucleótido en sentido (Fw Actina) 5' TCCCAGGTATCGCTGACCGT	20	60.0	60.8°	200
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv Actina) 5' CTCCTGTGGACGATCGCTG	20	60.0	59.1°	200
Oligonucleótido en sentido (Fw Actina2) 5' TCCCAGGTATCGCTGACCGT	20	60.0	63.0°	500
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv Actina2) 5' CTCCTGTGGACGATCGCTG	20	60.0	65.1°	500

Los oligos diseñados amplifican los fragmentos esperados (Fig.16). Sorprendentemente, los transcritos para actina sí amplificaron al utilizar RNA total, pero no los de HvRRP6 y 14-3-3, aun cuando oligos utilizados fueron los mismos que los empleados para sus respectivos transcritos, sugiriendo que la abundancia de estos últimos era menor que la de la actina (Fig. 16A y 16B) . Por lo cual se decidió realizar el aislamiento de mRNA.

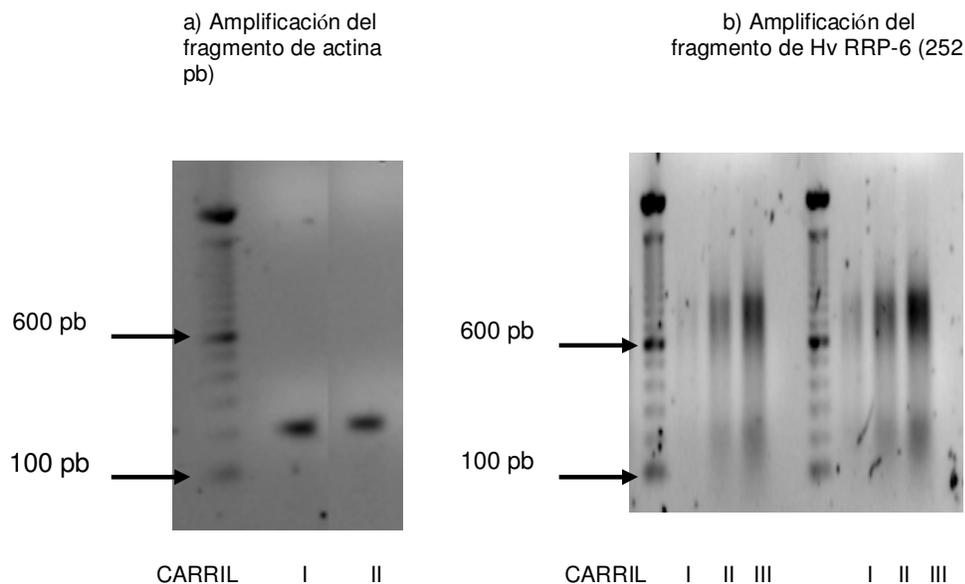


Figura 16. Imágenes electroforéticas de los productos de RT-PCR, empleando RNA total como templado. A) Amplificación del fragmento de 200 pb del transcrito de actina. B) Amplificación de los transcritos de 14-3-3 A y Hv RRP-6. No es posible amplificar los fragmentos específicos de los transcritos de estudio a partir de RNA total. Descripción de carriles: I, 5 ug; II, 25 ug; III, 50 ug, como templado.

El emplear mRNA como templado de la reacción de RT dificultó estandarizar la reacción de PCR, debido a que no fue posible cuantificar espectrofotométricamente el mRNA, por lo cual a través de experimentos exploratorios se determinó emplear 5 ul de mRNA para la síntesis de la primera cadena de cDNA. El cDNA sintetizado sí fue posible cuantificarlo por espectrofotometría, para ello se cuantificaron 5 ul de la reacción final de RT, lo que permitió estandarizar la cantidad de cDNA, que se emplearía en las reacciones de PCR, siendo 150 ng la cantidad de cDNA, que era útil para visualizar las bandas electroforéticas de amplificación de los transcritos específicos de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 A.

Una vez que la cantidad de cDNA empleado como templado en la reacción de PCR fue estandarizado, se corrieron las reacciones de RT-PCR, empleando 35 ciclos de PCR, para evidenciar la presencia del transcrito de la proteína Hv14-3-3 A y del fragmento que codifica para los dominios EF de la proteína Hv RRP-6. Los productos de esta amplificación y los de un fragmento de actina (200 pb) son mostrados en las Figuras 17 y 19. En ambos casos, se observa la amplificación del transcrito de actina de 200 pb (Figura 17-B y 19-B), lo que señala que el cDNA utilizado para las reacciones de PCR fue de calidad. En la Figura 17-A se detectó una banda difusa de baja intensidad que coincide con el fragmento de 1000pb esperado para el transcrito 14-3-3 A. El hecho de que la banda sea difusa sugiere que reacción debe de optimizarse.

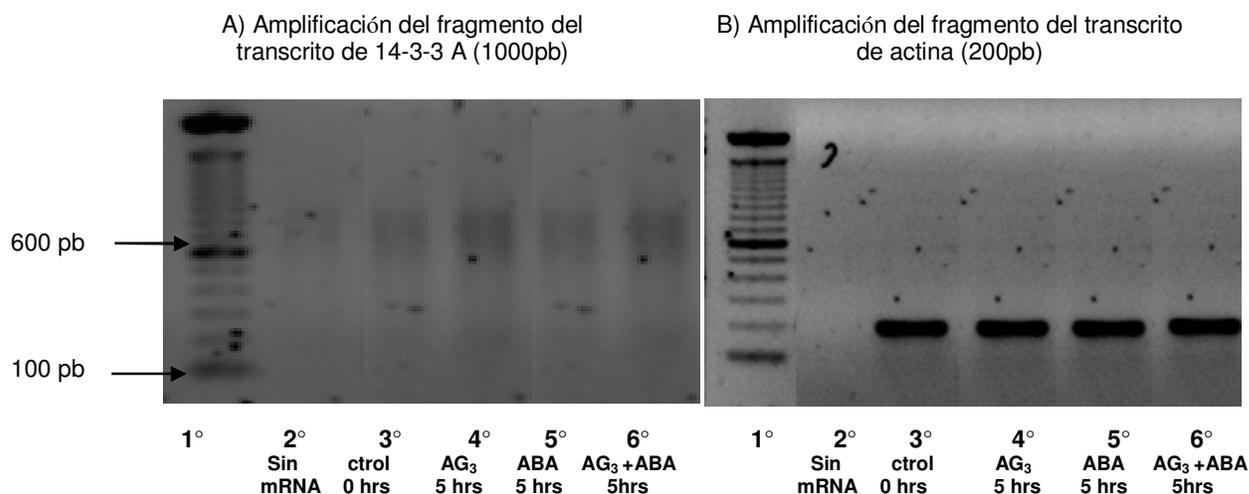


Figura 17. Amplificación del transcrito 14-3-3 A, utilizando cDNA como templado. No fue posible amplificar el fragmento del transcrito de la proteína 14-3-3 bajo las condiciones establecidas en la Tabla 6. A) Imágenes electroforéticas del producto de PCR para amplificación de fragmento del transcrito de la proteína 14-3-3A, no se observa banda de amplificación. B) Bandas electroforéticas asociadas al amplicón de 200 pb correspondiente al fragmento del transcrito de actina. Descripción de carriles: 1°: Marcador de peso molecular 100 pb; 2°: control negativo de PCR; 3°: sin tratamiento fitohormonal; 4°: +AG3 durante 5 horas; 5°: + ABA, durante 5 horas; 6°: +AG3 + ABA, durante 5 horas.

La ineficiencia de las condiciones de las reacciones de RT-PCR para el transcrito 14-3-3-A podría deberse a que los T_m de los oligos son muy diferentes

(Tabla 25) o a que el contenido de GC es del 50 %. Ésto hace posible que existan estructuras secundarias estables en el mRNA de este transcrito en particular, que interfieran con la síntesis del cDNA, lo que puede ser resuelto añadiendo a la reacción de RT y de PCR dimetilsulfóxido, para desestabilizar la formación de puentes de hidrógeno ó elevando la temperatura de síntesis de cDNA de 42°C a 60°C, haciendo uso de una enzima transcriptasa reversa termoestable, la cual se encuentra en una mezcla con la enzima Taq Polimerasa y efectúa la síntesis de cDNA específico del transcrito de estudio y amplifica en la misma reacción el fragmento del gen en estudio, haciendo la reacción de RT-PCR en un solo paso.

Estas condiciones fueron evaluadas por separado. Utilizando el dimetilsulfóxido al 4%, no fue posible obtener resultados positivos, por lo que utilizamos una Transcriptasa Reversa Termoestable, el resultado se muestra en la Figura 18.

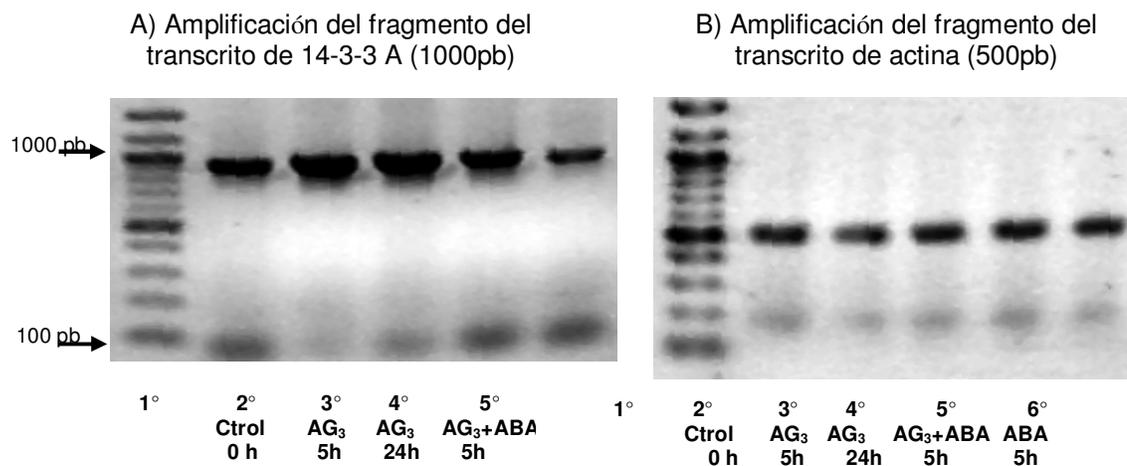


Figura 18. Patrón de transcripción del gen codificante de la proteína 14-3-3.
3. A) Bandas electroforéticas del amplicón de 1000 pb del transcrito de 14-3-3 A. Los niveles de transcripción son incrementados por efecto de AG₃ y reprimidos por ABA. B) Control de carga, amplicón de 500 pb correspondiente al gen constitutivo de actina.
 Descripción de carriles: 1°: Marcador de peso molecular 100 pb; 2°: sin tratamiento fitohormonal; 3°: +AG₃ durante 5 horas; 4°: +AG₃ durante 24 horas; 5°: +AG₃ + ABA, durante 5 horas; 6°: + ABA, durante 5 horas.

En esta imagen se detecta que los fitorreguladores regulan la expresión de la proteína 14-3-3 A. Esto se deduce porque la cantidad del transcrito se modifica por

efecto de la incubación de los tejidos en presencia de los diferentes fitorreguladores, habiendo utilizado la misma cantidad de cDNA. Lo cual se demostró por la intensidad similar que muestran las bandas de actina. Cabe señalar que en este experimento se amplificó un fragmento de mayor tamaño del transcrito de actina, haciendo uso de los oligonucleótidos actina 2 (Fig.18B).

Respecto al efecto de los fitorreguladores, sobre la expresión del gen *Hv RRP-6*, se utilizó tanto el fragmento de transcrito que codifica para los dominios de EF (252 pb) así como un fragmento de 750 pb (fig. 19-21). La intensidad de las bandas correspondientes al amplicón de 252 pb obtenidas tras 35 ciclos de amplificación (Fig. 19A), denotan la presencia del transcrito de *Hv RRP-6* desde la maduración de la semilla, es decir la transcripción del gene no se induce por efecto de AG_3 . No es posible definir si los niveles de transcripción se ven modificados por efecto de AG_3 o ABA en el tejido de aleurona; ya que las bandas electroforéticas obtenidas, correspondientes al amplicón de interés, son lo suficientemente oscuras que limitan la percepción de diferencias en intensidad asociadas a los niveles de transcrito.

Por lo anterior se evaluó si la reducción de número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR, podría permitir la identificación de cambios en los niveles de transcripción. Se evaluaron 15 y 20 ciclos de PCR. Al observar los patrones electroforéticos (Fig. 20 y 21) podemos deducir lo siguiente: 15 ciclos de amplificación de PCR, fueron insuficientes para obtener bandas visibles del transcrito de *Hv RRP-6*, pues sólo se observaron las bandas de actina de 200 pb. Lo que señala la presencia de cDNA como templado en las reacciones de RT-PCR.

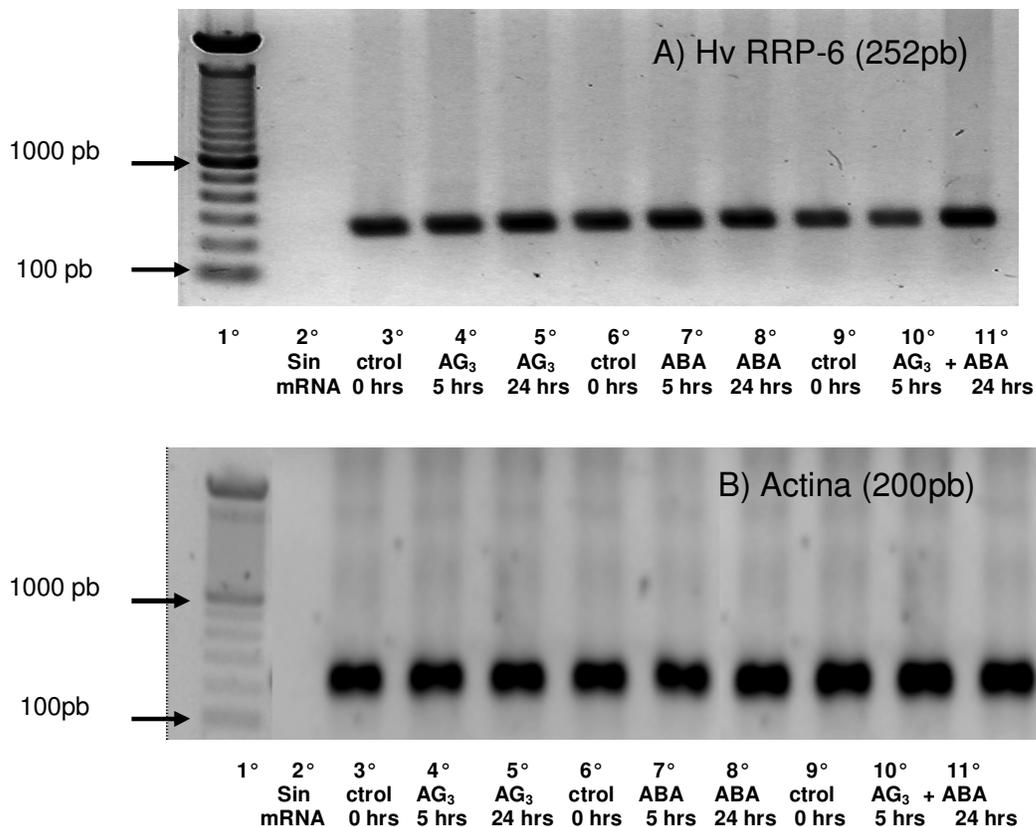


Figura 19. Imágenes electroforéticas del amplicón de 252 pb del transcrito de Hv RRP-6 tras 35 ciclos de PCR. A) Bandas electroforéticas asociadas al amplicón de 252 pb correspondiente al fragmento del transcrito de la proteína Hv RRP-6. B) Bandas electroforéticas asociadas al amplicón de actina de 200 pb. Tras 35 ciclos de amplificación de PCR, las bandas electroforéticas de ambos transcritos fueron muy intensas, sugiriendo un exceso de ciclos. Descripción de carriles: 1°: Marcador de peso molecular 100 pb; 2°: control negativo de PCR; 3°: Sin tratamiento fitohormonal; 4° y 5°: + AG₃, durante 5 y 24 horas respectivamente; 6°: Sin tratamiento fitohormonal; 7° y 8°: + ABA, durante 5 y 24 horas respectivamente; 9°: Sin tratamiento fitohormonal; 10° Y 11°: + AG₃ + ABA durante 5 y 24 horas respectivamente.

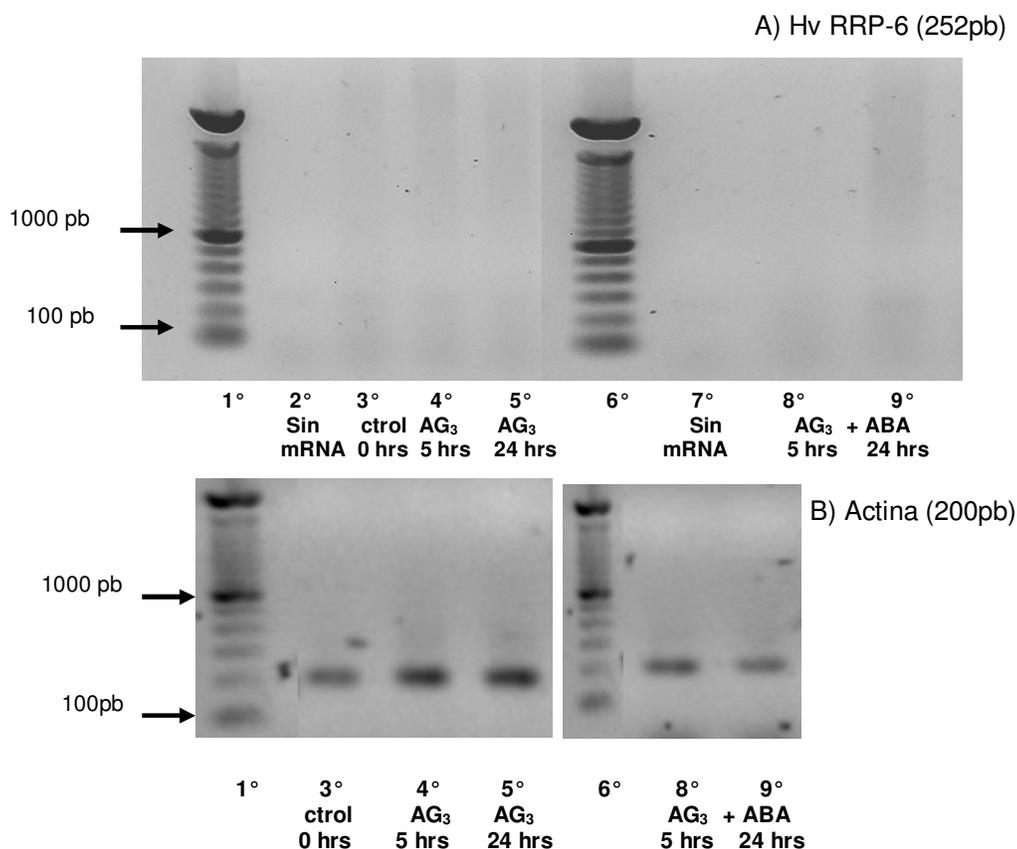


Figura 20. Imágenes electroforéticas del amplicón de 252 pb del transcrito de Hv RRP-6, tras 15 ciclos de amplificación (A). El número de ciclos son insuficientes para evidenciar los niveles de este transcrito, pero suficientes para el transcrito de actina (B). Descripción de carriles: 1°: Marcador de peso molecular 100 pb; 2°: control negativo de PCR; 3°: sin tratamiento fitohormonal; 4° y 5°: +AG₃, durante 5 y 24 horas respectivamente; 6°: Marcador de peso molecular de 100 pb; 7°: Tejido de aleurona sin tratamiento fitohormonal; 8° y 9°: + AG₃ + ABA por 5 y 24 hrs respectivamente.

Cuando son empleados 20 ciclos de PCR, se observaron las bandas electroforéticas correspondientes a la amplificación del fragmento del transcrito de Hv RRP-6 (Fig. 21). El transcrito fue detectado aún en el tejido fresco, sin denotar variaciones en los niveles de expresión por efecto de los fitorreguladores o su mezcla, ya que las bandas electroforéticas presentaron ligeras diferencias en intensidad. En la figura 22, se muestra la intensidad de las bandas electroforéticas para Hv RRP-6 y actina. En todos los casos se observa que la intensidad de las bandas de actina no presentó diferencias significativas, es decir en cada una de las reacciones de PCR se empleó la misma cantidad de cDNA como templado. La intensidad similar de las bandas electroforéticas de Hv RRP-6 a cualquiera de los

tratamientos permite concluir que no existen diferencias en los niveles de transcripción del gen.

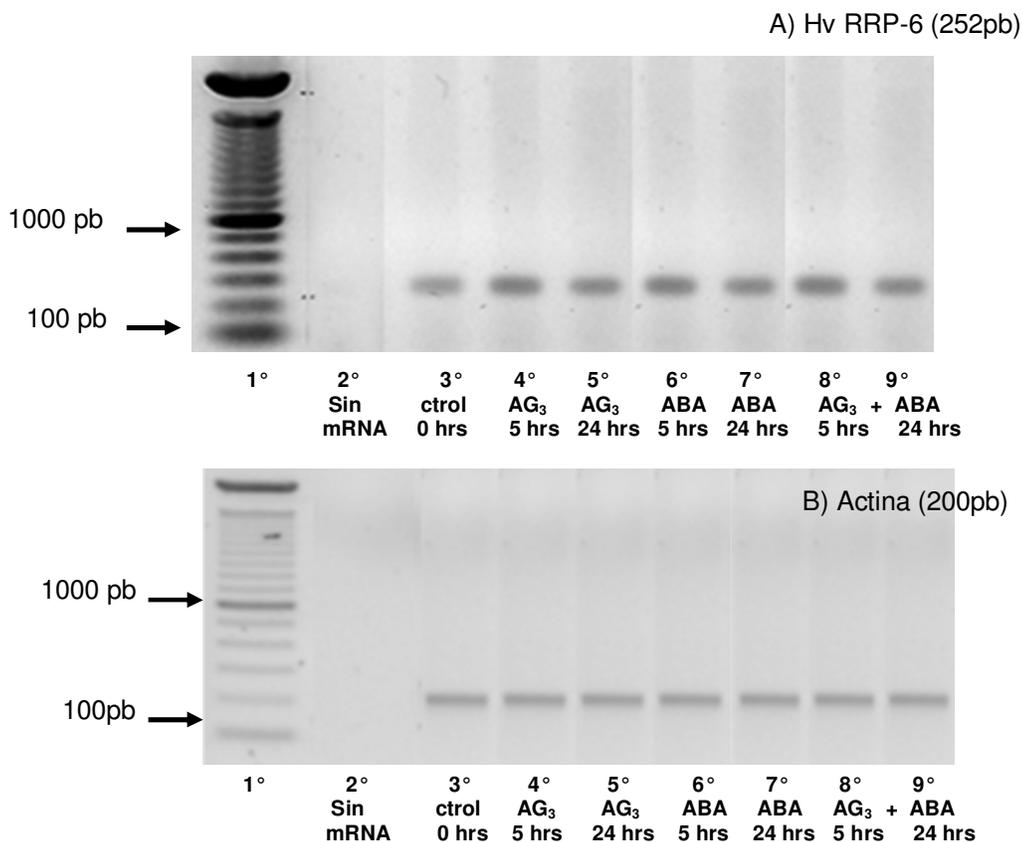


Figura 21. Patrón de transcripción del amplicón de 252 pb del transcrito de Hv RRP-6 tras 20 ciclos de amplificación. A) Bandas electroforéticas asociadas al amplicón de 252 pb correspondiente al fragmento del transcrito Hv RRP-6. Tras 20 ciclos de amplificación las bandas electroforéticas denotan un patrón de transcripción constitutivo. B) Bandas electroforéticas del amplicón de 200 pb del transcrito de actina. Las bandas muestran similar intensidad. Descripción de carriles: 1°: Marcador de peso molecular 100 pb; 2°: control negativo de PCR; 3°: sin tratamiento fitohormonal; 4° y 5°: +AG₃, durante 5 y 24 horas respectivamente; 6°: Marcador de peso molecular de 100 pb; 7°: Tejido de aleurona sin tratamiento fitohormonal; 8° y 9°: + AG₃ + ABA por 5 y 24 hrs respectivamente.

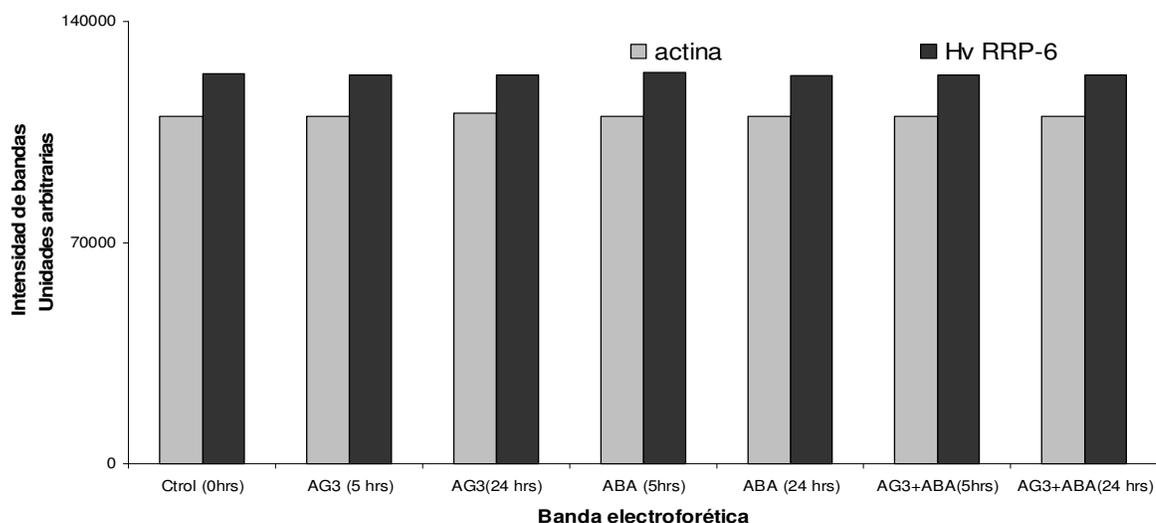


Figura 22. Cuantificación de la intensidad de las bandas en la Figura 21. En todas las bandas de actina se observa el mismo número de píxeles (barras grises). El número de píxeles en de las bandas electroforéticas correspondientes al amplicón de Hv RRP-6 no muestra variaciones significativas. Es decir bajo éste sistema de PCR semicuantitativo no se detectan variaciones en los niveles de transcripción.

Este resultado sugiere que los fitorreguladores no regulan la transcripción del gen HvRRP6 o bien que existen otras proteínas con dominios EF cuya transcripción no es regulada por AG₃ y ABA y que enmascaran el efecto. Para diferenciar entre estas dos posibilidades se diseñó un oligonucleótido en sentido sobre la región 5' del transcrito de *Hv RRP-6*, aquí identificado y como el oligonucleótido en antisentido el oligo denominado Rv Hv (Tabla 19), que en conjunto amplifican de un fragmento de 750 pb, fuera de las regiones conservadas de proteínas con dominios EF de unión a calcio; los oligonucleótidos son detallados en la Tabla 25. En este experimento se utilizó a la transcriptasa reversa termoestable a 60°C. Los resultados se muestran en la Figura 22.

Tabla 26. Secuencias de oligonucleótidos, empleados para la síntesis del amplicón de 750 pb del transcrito de Hv RRP-6

Secuencia	pb	%GC	Tm(°C)
Oligonucleótido en sentido (Fw2 RPP-6) 5'ACGTGAGCGAGAGAGCAT	18	63.6	62.3°
Oligonucleótido en sentido inverso (Rv RPP-6) 5'ACGCTTCGCATAGCACCATCCTACC	25	52.4	67.7°

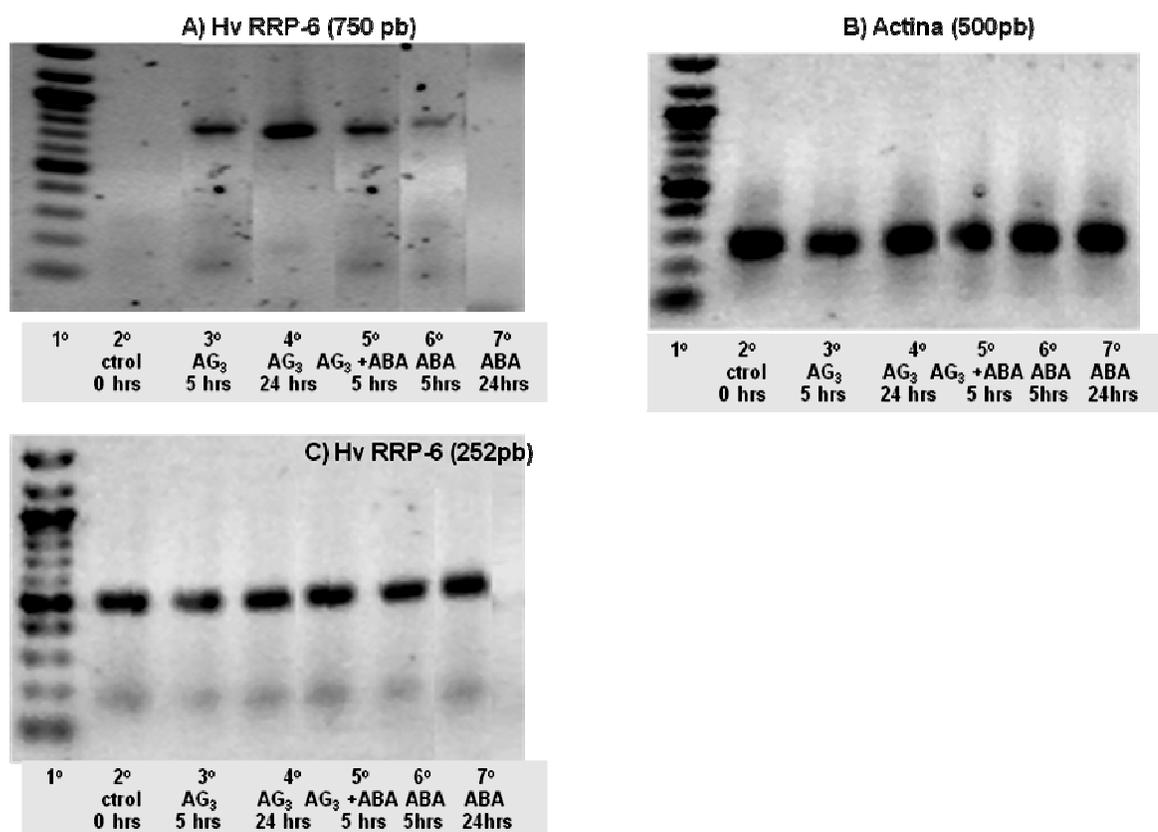


Figura 23. Patrón de transcripción del gen codificante de la proteína Hv RPP-6. A) Banda electroforética correspondiente al amplicón de 750 pb. La transcripción del gen es inducida por efecto del AG₃, y ABA no tiene efecto. B) Control de carga. Amplicón de 500 pb correspondiente al gen constitutivo de actina. C) Bandas electroforéticas asociadas al amplicón de 252 pb correspondiente a fragmento del transcrito codificante de la proteína Hv RRP-6, la expresión denota ser constitutiva debido a que la secuencia es un dominio conservado en la familia de proteínas de unión a Calcio.

Descripción de carriles: 1: Marcador de peso molecular 100 pb; 2: Sin tratamiento fitohormonal; 3 y 4: + AG₃, durante 5 y 24 horas respectivamente; 5: + AG₃ + ABA, durante 5 horas; 6 y 7: + ABA, durante 5 y 24 horas respectivamente.

7.4 Análisis de elementos cis ubicados en la región promotora del DNA genómico codificante de la proteína Hv RRP-6 y 14-3-3 A

Los resultados anteriores indican que la expresión de los genes codificantes de las proteínas HV RRP-6 y 14-3-3 A son modulados por efecto de AG₃ y ABA; y se ha reportado que en el promotor de este tipo de genes se encuentran elementos cis característicos. Por lo que se analizaron las secuencias promotoras ubicadas en el DNA genómico codificante de las proteínas en cuestión. Para ello, se buscaron en el

banco de bioinformática NCBI, secuencias homólogas que se encontraran ubicadas en el DNA genómico de cebada, sin embargo no se identificó alguna secuencia reportada, por lo que se buscó en el genoma de *Oryza sativa*, identificando las secuencia del transcrito dentro del DNA genómico del cromosoma 8 para una proteína homóloga a HvRRP-6 y en el cromosoma 11 para el transcrito de la proteína homóloga a 14-3-3 A, en donde además se reportan los productos de traducción, uno de los cuales muestra homología con nuestro producto teórico de traducción.

Las secuencias de DNA genómico, fueron analizadas en el programa disponible en la red Softberry (<http://linux1.softberry.com>), en el cual, se ubican las secuencias que corresponden a la caja TATA del gen y las secuencias promotoras que coinciden con las descritas para diversos sistemas vegetales. Este mismo procedimiento fue efectuado para el DNA genómico codificante de la alfa amilasa (locus Os08g0473600), en la semilla *Oryza Sativa*, con la finalidad de comparar las secuencias promotoras que pudieran compartir y de esta forma regular su expresión, siendo el gen de alfa amilasa, un gen de expresión específica de AG₃, en el que se han descrito las secuencias promotoras y los factores de transcripción que regulan su expresión (Fig. 24).

```
GTGATCGATCACCGAGAGAGACCGGACGACGAGTCGAGAGAGCTCGCGCGCGCCTC
GATCGGCGCGGCGGTGACTCGAGCAGGGCCTGAAGTAGCTGCACGGCTCAAGGCG
GCACTCCATCACCCGACACCGGGTCCAGACTACTCGTTTCCGTTGGAGAAATAACC
ACCTTTATCCATGTTGCTTATCCGTGAATTGCAACAGCATTGATTGTTCGCGTTTAATT
CGCTCGGCCATGTAACCTCCGACCTGATCCTCTTGGACACTATAAATAGAGGCCAG
TTCAGGCAATGCAAGAGCAGAGAAGCAGAGTACAGCAGGCAGCTCTTCTTCTTTG
CGAAGGTTGGCTACTTGGCCAGCCATTAGGAAACAAGTTAGTTTGGAGAAGAAGCAG
AGTTGAGACTGCATTTGCATTGCTCTGTAGCCATG
```

Figura 24. Secuencia de la región promotora del gen de la alfa-amilasa en *Oryza sativa*. Las secuencias en negritas-cursivas denotan los elementos cis que también se ubican en el gen de la proteína homóloga a Hv RRP-6 en *Oryza sativa*. La secuencia en gris denota la caja TATA. La secuencia subrayada es el codón de inicio de transcripción

Tabla 27. Secuencia y descripción de elementos cis presentes en los promotores de los genes de alfa-amilasa y de Hv RRP-6 (homólogo en *O. sativa*).

Secuencia del elemento cis	Denominación
NNTGCAC	Elemento de regulación de Amy-GAMYB
CGACG	Elemento de regulación del gen Amy 3d
CAACA	Elemento sin descripción
GGCGGC	Elemento sin descripción
TTTAA	Elemento de conformación espacial regulatorio de caja TATA,
NNNCATCANNNN	Elemento sin clara función

Para éste análisis se consideraron 430 pb de bases corriente arriba del codón de inicio de transcripción. En esta secuencia se ubicaron los elementos cis que se también se localizan en la región promotora del gen codificante de la proteína Hv RRP-6, estos elementos son descritos en la Tabla 26. La secuencia de DNA genómico en donde ubicamos el locus codificante de la proteína homóloga de Hv RRP-6 en arroz, es el Os12g0137100.

AACGCGTCCCCGATGCTTCGTGCTTATCCTTTGGTTGAAGAACGAACAATGAAACATG
CAGCGCAACGGTAAGCCACACACTCAATTGCGCGGCGGCCGCGCGGCCGTGCCGTC
 GCTGCCACGCGCATTACGCCCTTTCTTCTACCACCTTCGACCCAACGGTACGTGACA
 TATGTCCCGGTGTCCTCAAATACAAGGTATCGATCGACGTTTT**CAACT**CACGCGTAC
 ACCGTGTGTCCTCACCTCTTCAAGCCTGCAACTACCGCATCTACTTCC**CAGT**CATCA
 TCCTCTTCAATATATGAACCCGTACCGTACTCCACTGCTTTCTTCCATTTT**GAATTT**CG
 AAACACAC**AAAATAT**CAGAGGACGCAGACAGCTTGACTTTGACAATCCCCAAATTTCC
 CCAAGCTGCAGCTGCGCATCGCAACCTCCGCTCTCTCCTAAACCCCTCTCTCCAATG

Figura 25. Secuencia de la región promotora del gen de la proteína homóloga a Hv RRP-6 en *Oryza sativa*. Las secuencias en negritas-cursivas denotan los elementos cis que también se ubican en el gen de amilasa. La secuencia en gris denota la caja TATA. La secuencia subrayada es el codón de inicio de transcripción.

Este mismo análisis se realizó para el DNA genómico en donde se ubican algunas isoformas de la familia de proteínas 14-3-3 de *Oryza sativa*. El locus de ubicación en el cromosoma 11 es el identificado con el número Os11g0546900, detallado en la Figura 25.

TTCATTTAGACACATGTATGTGTCTAGATTCATTAACACCTATATGTATATGGGCAATGC
 TAGAAAGCCTTACATTGTGAAACGGATGGAGTATATTACAAGCACGCATGAAGAAAACA

TCCTACTATACATAATATAAAGTTTTATGGCCAATATTGCAATGGCGTTTTAAGACAATCA
CAACATAAATTACAACTCCACCAACATAAAAGTTGTTATAATTGTAGTGTTATAAAACAA
 CTTTTTAAAAAATATACATATACATTTGCACTAAATGAAAATCTAAAAACAGACTTCCAGC
 TAACCAGAACTACAATATTATCTTT **TTTTTAAAAAAG**GAGAGATAGCAAAAACCCCAAAT
 CACCAAAGAGCGCAAAAAAAAAAAAAACCTAAACCTATCTTTATCATACCCACACCGTC
 CACACACAGCAAACACCATTCCACCCACTAAAACCCCTCCACGTGTCCCCCCCGAAC
 CCAACCCATCTTCATCTAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNN
 NNNNNNTGGCGGTTTTGGCACGCCAGGTTACCACTTTGGCTCCGGCGTTTTATGTTGTG
 GGTCTTGTGCGGGTACCGTGTGCCACGGGATCCGTGTGGGCCAGGGTCCCCAAG
 AGGGGAAGGCTCTCGGTGCGTTTTTGGAGGTCTTGCTCACCATTTCTTTCTAATACCAT
 ACGTGGTCAAAATAGGTGAACCCCATGTCCAACGCCAATGTGAACCGTTCAAATGGTC
 CCCGGTGGGCCCGTATGGACTTGGGCCCGCAGCGCAAAGGGCCGCGCGGTTGC
 ATTGGCGGAACGGCCCGGTTGCCGTGGACCGCCAACGGGTCCGGGCGAGTGGACAT
 GCGGGGCACCAACCGGTCCAGCAACGGCGCTTCGTGTCGTGTCGTCAAAAGATTCCCC
 ACGTTCCCGTCCCACCAAAGCCGCGTTCGCATCCGCCACCACAACCGCAACCCGC
 CACCACAACCGCAACCCGCGCCGCGCCGACGCGGAGGAGAGGAGAGGAGGGAAG
 GCGAGAGGGAGGTAGGTAGGTAGCCAGTTAGT

Figura 26. Secuencia de la región promotora del gen de la proteína homóloga a 14-3-3 en *Oryza sativa*. Sólo se ubican un elemento cis en la región promotora que también se ubica en la secuencia promotora del gen de alfa amilasa o Hv RRP-6. La secuencia en gris denota la caja TATA. La secuencia subrayada es el codón de inicio de transcripción. Al existir secuencias indeterminadas(N), resulta dudoso poder predecir la ubicación de la caja TATA en la región promotora.

Las secuencias de los elementos cis que se ubicaron en las secuencias promotoras fueron analizadas, buscando información que pudiera sugerir su función durante la expresión génica inducida por AG₃. Sin embargo sólo uno de los elementos cis que se ubican en ambas regiones promotoras ha sido asociado a la expresión de alfa amilasa en *Oryza sativa*; deleciones o mutaciones en la secuencia CGACG impiden la expresión del gen, así mismo este elemento se encuentra asociado a la expresión de genes cuando comienza a limitarse la disposición de carbohidratos en el tejido (Hwang et al, 1998). Aún cuando no podamos precisar la función de cada una de los elementos cis de las secuencias promotoras, podemos deducir que se requiere la expresión concertada de varios genes bajo un mismo estímulo, o cuando el producto de expresión génica forma parte de redes de señalización o proteínas que participan en la reorientación del flujo metabólico. Es aquí, en donde los elementos cis juegan un papel de regulación temporal en la expresión génica, permitiendo una co-expresión de los genes que cuentan con los mismos elementos cis en su región promotora. Esto resulta en un mecanismo para modular la expresión de genes que se requieren un mismo proceso celular específico.

Aún cuando en la región promotora de la proteína homóloga a 14-3-3 A en *Oryza sativa* sólo se identificó un elemento cis que también se ubica en la región promotora del gen de alfa amilasa y de *Hv RRP-6* en *Oryza sativa*, es posible que la regulación de la expresión de 14-3-3 A por AG₃ sea mediante otros elementos cis no identificados.

7.5 Determinación del efecto de la incubación en AG₃ del tejido de aleurona sobre la actividad de ATPasa

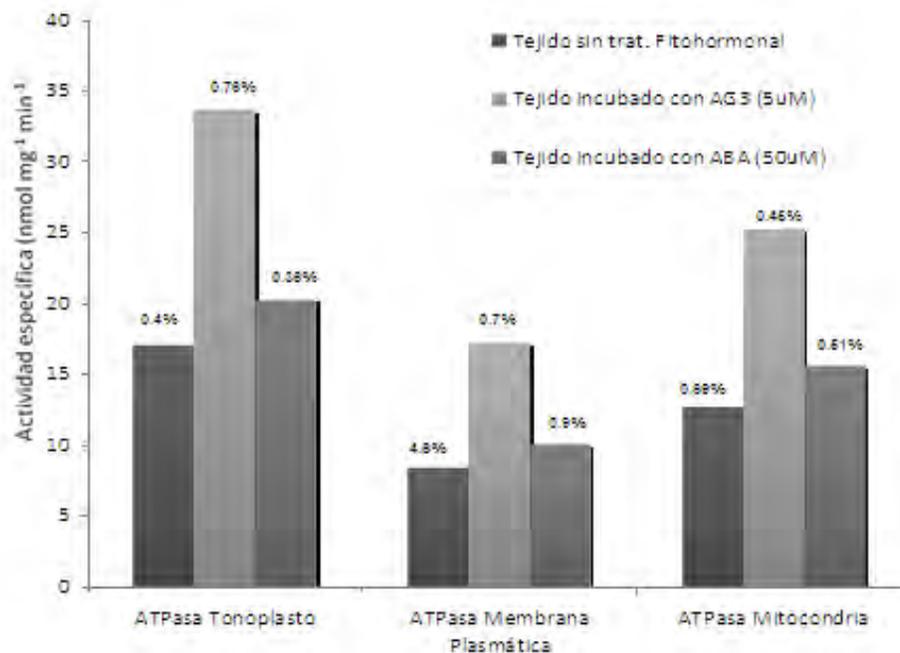
Como se ha mencionado, las isoformas de la familia de proteínas 14-3-3, regulan la actividad de numerosas proteínas involucradas en diversos procesos metabólicos celulares. En el caso de la aleurona, se ha evidenciado que algunas isoformas de las proteínas 14-3-3 interactúan con proteínas membranales, tras la percepción de AG₃.

Algunas de estas proteínas membranales, son bombas iónicas del tipo ATPasas, las cuales en el caso específico de la aleurona estimulada con AG₃, participan en el flujo de protones e iones calcio al lumen de vacuolas, del ER y al citoplasma celular. Por ésta razón, se determinó la actividad de ATPasa total y específica, en microsomas aislados de aleurona de cebada, que había sido incubada en presencia de AG₃ (5 uM) ó ABA (50 uM), contando con un control de actividad basal, cuyos microsomas se aislaron de tejido fresco (los valores de actividad de ATPasa específica y total determinados, se detallan en la tabla 1, en la sección de apéndice).

Como se observa en la figura 27, la incubación del tejido de aleurona con AG₃, no modifica la distribución de la actividad basal en las diferentes ATPasas. La actividad específica de ATPasa de tonoplasto y mitocondrial siguen siendo las de mayor contribución a la ATPasa total, aún en presencia de AG₃.

Sin embargo, el análisis de las actividades basales específicas de ATPasa, denotan un incremento hasta del doble cuando el tejido de aleurona es incubado en presencia de AG₃. Lo que sugiere, que algunos de los procesos celulares que son

reorientados en la aleurona por el AG₃ requieren de la participación de bombas de ATPasa. Este efecto de incremento en la actividad de ATPasas por AG₃, no ocurre cuando los microsomas se aislaron de aleuronas incubadas con ABA, en donde la actividad específica de ATPasa basal no muestra un incremento significativo.



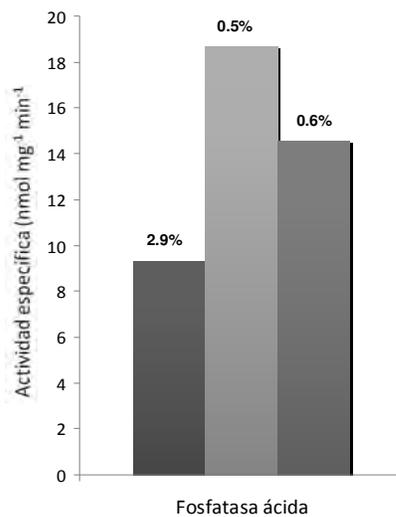


Figura 27. Actividad específica de ATPasa y de fosfatasa ácida de fracción microsomal de aleurona de cebada. La incubación del tejido con AG₃ induce un incremento hasta del 100% de la actividad basal. Mientras que ABA no modifica significativamente la actividad basal de ATPasa y fosfatasa ácida. Se muestra sobre las barras el valor de la desviación estándar expresado en %.

Capítulo 8

Discusión

La síntesis *de novo* y secreción de enzimas hidrolíticas por la capa de aleurona, está regulada por AG_3 . Cuando este fitorregulador se une a su receptor, presente en la membrana plasmática, se activan los mecanismos moleculares conducentes a estructurar las redes de señalización cuya función es la de traducir el estímulo percibido a un lenguaje comprensible y específico para la célula. Lo anterior resulta en una reorientación del metabolismo celular para orquestar la inducción y expresión génica, así como la secreción enzimática. En general, las redes o cascadas de señalización en los sistemas en donde el estímulo se percibe en el exterior de la membrana plasmática, como es el caso del AG_3 en la aleurona, consisten de un segmento general que comparten con diversos estímulos y un segmento específico donde participan elementos moleculares propios del estímulo en cuestión. En el caso de la aleurona, el segmento general en la cascada de señalización está constituido por flujos de calcio, los cuales se establecen con la participación de canales de calcio sensibles a voltaje y Ca-ATPasas, elementos

comunes a muchos estímulos que se perciben en la membrana, como es el caso del AG_3 . Mientras que de los elementos moleculares específicos, que en este caso estarían constituidos por moléculas sensoras de flujos de calcio, sólo se ha identificado a la calmodulina. En otros sistemas, además de la calmodulina se han descrito otras proteínas sensoras de calcio (Luan et al, 2002). Las proteínas sensoras de calcio son aquellas cuya actividad se manifiesta a través de unir calcio a sus dominios EF. Esta interacción proteína-calcio se facilita al establecerse los flujos de calcio (Ranty et al, 2006). La unión de calcio a la proteína sensora, induce un cambio conformacional en la misma, que expone regiones que actúan como andamiaje para otros elementos que participen en el segmento específico de la señalización. La traducción teórica del transcrito *HvRRP-6*, aislado y secuenciado en este trabajo, permitió establecer mediante un análisis *in silico* que esta proteína muestra características de una proteína sensora de calcio: muestra dos regiones de dominios EF, cuyas secuencias se han identificado en proteínas sensoras de calcio, presentes en otros sistemas (Ikura, 1996). Posee un presunto sitio de miristoilación, lo que le podría conferir la posibilidad de ser reclutada a las membranas, lo cual coincide con su presencia en microsomas de aleurona tratadas con AG_3 (Maya, 2007). Además, la región comprendida entre los aminoácidos 157-302 presentó homología del 85% ($1e-72$) con una proteasa de cisteína aislada de hoja senescente de chícharo, por lo que existe la posibilidad de que esta proteasa pudiera estar participando en la muerte celular de la aleurona. Proceso que se establece en paralelo a la síntesis y secreción de alfa-amilasa. La evidencia que apoya esta propuesta, la constituyen los presuntos mecanismos de regulación de la proteína Hv RRP-6, fosforilación por PKC, miristoilación, interacción con calcio, sensibilidad a cambios en el estado REDOX, pues presenta grupos vecinales de cisteínas y abundante transcripción de su mRNA a los tiempos en que está activa la muerte de la aleurona.

Si bien es cierto que las proteasas de cisteína también pueden participar en la movilización de proteínas de reserva (Bethke et al, 1996), la Hv RRP-6 no

parece tener esta función, puesto que la hidrólisis de las proteínas de reserva se realiza durante las primeras horas del tratamiento con AG₃, ya que los aminoácidos, resultado de esta proteólisis, son requeridos para la síntesis de la alfa-amilasa y a la fecha no se han reportado .proteasas de cisteína con dominios EF que participen en la hidrólisis de proteínas de reserva.

El otro objetivo de este trabajo fue estudiar la transcripción del gen codificante de la proteína 14-3-3 isoforma A, cuya actividad reportada en membranas, es modular la actividad de algunas bombas iónicas del tipo H⁺-ATPasa. Los patrones de transcripción indican que este gen es constitutivo, si bien su transcripción se incrementó con el tratamiento de AG₃. Ésto sugiere que la función de esta proteína es requerida en momentos tempranos de la señalización de AG₃, pues la expresión de algunos de los genes inducidos por AG₃ se inicia una hora después de la percepción de AG₃ (Bethke et al, 1997).

Un elemento que nos lleva a proponer un mecanismo de regulación de la actividad de la proteína 14-3-3 A, es que tras el análisis *in silico* de la proteína obtenida por traducción teórica del transcrito, se evidenció un sitio de fosforilación por cinasas dependientes de GMPc y los niveles citosólicos de este nucleótido se incrementan 45 minutos después de la percepción del AG₃. Una vez fosforilada la proteína 14-3-3 A podría interactuar con diversos sustratos entre los que se encuentran las H⁺-ATPasas. Esta interacción resultaría en un incremento de la actividad de estas bombas primarias, que podrían participar en los procesos tempranos de acidificación y que se ha demostrado forman parte de la señalización por AG₃. Estos eventos son la acidificación del citoplasma celular y del lumen de las vacuolas de reserva proteica. El primer evento es indispensable para la síntesis y secreción de a-amilasa y el segundo facilita la acción de proteasas que hidrolizan las proteínas de reserva para proporcionar los aminoácidos requeridos para la síntesis y secreción de las proteínas reguladas por AG₃. Efectivamente, en aleurona el AG₃ incrementó la actividad de H- ATPasas y

muy probablemente este incremento se debió a la interacción de las H-ATPasas con la proteína 14-3-3 A. Evidencia adicional para esta propuesta la constituyen los diversos reportes demostrando una interacción entre las diversas H-ATPasas con proteínas 14-3-3 (Alsterfjord et al, 2004; Finni et al, 2002; Kanczewska et al, 2005) , aunque sólo en uno de ellos establecen la isoforma de la proteína 14-3-3, con la cual se realiza la interacción, la cual es la isoforma A (Emi et al, 2001).

Las hipótesis aquí propuestas sobre la actividad de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 A requieren ser evaluadas. Para ello fue obtenida la secuencia de los transcritos de ambas proteínas, lo que permitirá generar herramientas de biología molecular, para sobreexpresar a las proteínas en estudio y con ello diseñar los experimentos que lleven a definir su función y los mecanismos de regulación propuestos para estas proteínas.

Capítulo 9

Conclusiones

La expresión génica de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 isoforma A, muestran regulación por AG₃. Este fitorregulador indujo la expresión del transcrito de la proteína HvRRP-6, mientras que el ABA no tuvo efecto.

El AG₃ muestra sólo un efecto positivo sobre los niveles de expresión de 14-3-3 A, siendo su expresión constitutiva. El ABA inhibió la transcripción constitutiva del gen 14-3-3-A.

El análisis *in silico* de las proteína teóricas Hv RRP-6 y 14-3-3-A mostraron un posible sitio de miristoilación cada una. Mientras que sólo la primera mostró un posible sitio de fosforilación por PKC.

La actividad de ATPasas se incrementó por efecto del AG₃. La distribución del total de esta actividad en las diversas ATPasas no fue modificada por AG₃, ni por ABA.

La determinación de actividad de ATPasa, señala que los procesos celulares encaminados a la síntesis y secreción enzimática, inducen un incremento de esta actividad hasta del 100% con respecto a los niveles basales. Se hipotetiza que este incremento en la actividad de ATPasa es regulado por la proteína 14-3-3 isoforma A, si bien, se requiere de confirmación.

La obtención de las secuencias de los transcritos codificantes de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 A, mediante la técnica de RT-PCR-RACE, representa una valiosa herramienta para la generación de plásmidos para sobreexpresión de ambas proteínas.

Capítulo 10

Perspectivas

1. Definir la función de las proteínas Hv RRP-6 y 14-3-3 A en la señalización del AG₃ en el sistema de aleurona.

Emplear las secuencias de los transcritos aquí estudiados, para la generación de iRNA's, con los cuales transformar la aleurona y estudiar el efecto del AG₃ en la síntesis y secreción de la alfa-amilasa.

Generar las construcciones que permitan la sobreexpresión de péptidos específicos de las proteínas 14-3-3 A y Hv RRP-6, para la producción de anticuerpos útiles para corroborar la localización de dichas proteínas.

2. Evaluar los posibles sitios de fosforilación en las proteínas estudiadas, con la finalidad de definir si su actividad o compartimentalización es modulada por este mecanismo.

3. Determinar la interacción de la proteína 14-3-3 A con la bomba primaria de tipo ATPasa, mediante ensayos de doble híbrido.

4. Estudiar y definir el papel de la proteína Hv RRP-6 en el flujo de calcio durante la señalización inducida por AG_3 en el tejido de aleurona, así como su función en membranas, donde fue identificada.

Capítulo 11

Apéndices

Preparación de reactivos

Para aislamiento de RNA

Acetato de amonio 10 M (50ml)

Calentar 38.54 g de acetato de amonio y disolverlo en la mínima cantidad de agua-DEPC. Calentar casi a ebullición para disolver. Esterilizar por filtración con material previamente esterilizado. Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Agua –DEPC (Dietilpirocarbonato)

Por cada 3 l de agua bidestilada adicionar 1.5 ml de dietilpirocarbonato (DEPC). Agitar toda la noche y esterilizar al día siguiente por 1 h. (0.2 ml de DEPC/100 ml de agua)

Para la determinación de la integridad del RNA total por electroforesis.

Amortiguador MAE 10X (200ml)

MOPS 0.4M, pH 7	18.494 g
Acetato de sodio 0.1 M	1.6407 g
EDTA 10mM, pH 8	10 ml
Agua-DEPC	c. b. p. 200 ml

Disolver en 80 ml de agua-DEPC los primeros dos reactivos y ajustar el pH a 7. Por separado, preparar el EDTA a 100 mM (0.9305 g) y ajustar el pH a 8. Adicionar 10 ml de la solución de EDTA a los 80 ml de la disolución inicial. Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Amortiguador MAE 1X (200ml)

Disolver 20 ml de la solución de MAE 10x en 180 ml de agua-DEPC.

Amortiguador de carga RLB (RNA loading buffer) desnaturalizante (4ml)

Glicerol 80%	0.4 ml
Formamida desionizada al 100%	2.2 ml
Formaldehído al 37%	0.8 ml
MAE 10X	0.5 ml
Azul de bromofenol al 1%	100 ul
Ciano-xileno FF al 1%	100 ul
Por cada 3 ul de muestra adicionar 1ul de amortiguador.	

Determinación de DNA en gel de agarosa al 1% por electroforesis.

Gel de agarosa	(30 ml)
Agarosa	0.30 g
Amortiguador TAE 1x	30 ml

Amortiguador TAE 50X (200ml)

Tris	121 g
Ácido acético glacial	22.55 ml
EDTA (0.5 M, pH 8)	50 ml (9.38 g)

Amortiguador TAE 1X (200ml)

En una probeta de 250 ml preparar la disolución agregando 4.4 ml del Amortiguador TAE 50x y adicionar agua bidestilada hasta aforar a 220 ml aprox. Tomar 30 ml para la preparación del gel.

Preparación de medios y reactivos para crecimiento y transformación de bacterias competentes

Solución stock de IPTG (100 mM) para 25 ml:

IPTG	0.6 g
H ₂ O bidestilada c.b.p.	25 ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C.

Solución stock X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa) (2 ml):

5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa 100 mg

Disolver en 2 ml de N,N'-dimetil-formamida. Cubrir con papel aluminio y almacenar a -20 °C.

Solución stock Ampicilina 100 mg/ml (1 ml):

Ampicilina de sodio	100 mg
H ₂ O bidestilada estéril	cbp 1 ml

Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C.

Medio LB líquido (1litro):

Peptona	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O	c.b.p. 1 l

Medio LB/Amp líquido (1litro):

Medio LB líquido	1 l
Ampicilina 100 mg / ml	1 ml

Esterilizar el medio LB por separado y agregar la ampicilina cuando el medio esté tibio o a T ambiente.

Medio LB sólido (1 litro):

Agar	15 g
Medio LB líquido	1 l

Esterilizar en autoclave, dejar enfriar a ~50°C. Vaciar de 30-35 ml de medio en cajas petri desechables de 85 mm. Permitir endurecer el contenido. Almacenar a 4°C.

Medio LB/Amp sólido (1litro):

Agar	15 g
Medio LB líquido	1 l

Esterilizar en autoclave, dejar enfriar a ~50°C antes de agregar la ampicilina a una concentración final de 100 µg / ml. Vaciar de 30-35 ml de medio en cajas petri desechables de 85 mm. Permitir la solidificación del contenido. Almacenar a 4°C hasta por un mes o a temperatura ambiente.

Medio LB/Amp/IPTG/X-Gal sólido:

Hacer las cajas de LB con ampicilina como se indica anteriormente. Suplementar con 100 ul de IPTG 100 mM y 20 ul de X-Gal 50mg / ml, extender sobre toda la superficie de la caja y permitir absorberlos por 30 minutos a 37°C antes de usarse.

Medio SOC (100 ml):

Medio LB líquido	60 ml
Glucosa 0.5 M	40 ml

Se prepara la glucosa por separado. Esterilizar por filtración.

Actividad específica de ATPasa y Fosfatasa ácida determinada

Tabla 1. Actividad enzimática determinada
(nmol mg⁻¹ min⁻¹)

	ATPasa de Tonoplasto	ATPasa de Membrana Plasmática	ATPasa de Mitocondria	Fosfatasa ácida
Control (Actividad basal)	17.04 ± 0.73	8.45 ± 0.36	12.67 ± 0.51	9.32±0.10
AG₃	33.64 ± 0.26	17.18 ± 0.13	25.19 ± 0.16	18.64 ± 0.13
ABA	20.24 ± 0.65	10.05 ± 0.16	15.58 ± 0.59	20.24 ± 0.19

Capítulo 12

Referencias Bibliográficas

Alsterfjord, M., Dehnke, P., Arkell, A., Larsson, H., Svennelid, F., Rosenquist, M. Ferl, R., Sommarin, M., Larsson, C. (2004). Plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase interaction. *Plant and Cell Physiology*. 45:1202-1210

Bethke, P., Hillmer, S., Jones, R.L . (1996). Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone identification of aspartic and cysteine proteases. *Plant Physiology*. 110: 521-529

Bethke, P., Schuurink, R., Jones, R. (1997). Hormonal signalling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany*. 48: 1337-1356

Brecraft, P. (2007). Aleurone cell development en Olsen, A., *Endosperm: development and Molecular Biology*.pp.45-56. Holanda. Ed. Springer

Chen, X. Chang, M., Wang, B., Wu, B. (1997). Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene and the role of cytosolic Ca in the gibberellin- dependent signaling pathway in aleurone cells. *The Plant Journal*. 11: 363–371.

Clapham, D. (2007). Calcium Signaling. *Cell*. 131: 1047-1058.

Dill, A., Jung H., Sun T. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Plant Biology*. 98:14162-14167.

Elías, P. (2007). Efecto del ABA en el proteoma membranal de la aleurona de cebada tratada con AG_3 . Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Emi, T., Kinoshita, T., Shimazaki, KI.(2001). Specific binding of vfl4-3-3a isoform to the plasma membrane H^+ -ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. *Plant Physiology*. 125:1115–1125

Fath, A., Bethke, P. (2000). Programmed cell death in cereal Aleurone. *Plant Molecular Biology*. 44: 255-266.

Finni, C., Andersen, CH., Borch, J., Gjetting, S., Christensen, AB., de Boer, AH., Thordal-Christensen, H., Collinge, DB. (2002). Do 14-3-3 proteins and plasma membrane H^+ -ATPases interact in the barley epidermis in response to the barley powdery mildew fungus?. *Plant of Molecular Biology*. 49(2):137-47.

Gilroy, S. (2001). Signal Transduction in barley aleurone protoplasts calcium dependent and independent *The Plant Cell*, 8: 2193-2209

Gilroy, S., Russell, J. (1992). Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Plant Biology*. 89: 3591-3595

González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S., Gavilanes-Ruíz, M.(1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Analytical Biochemistry*. 200:235-238.

Gouaux, E., Mackinnon, R. (2005). Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*. 310: 1461–1465.

Hartweck, L. (2006). Rice gibberellin insensitive DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *The Plant Cell*. 18: 278–282.

Heimovaara, S., Heistek, J., Wang, M. (1994). Counteractive effects of ABA and GA₃ on extracellular and intracellular pH and malate in barley aleurone. *Plant Physiology*. 106:359-365

Heizmann, C., Hunziker, W. (1991). Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends in Biochemical Sciences*. 16: 98-103.

Hwang, Y., Karrer, E., Thomas, B., Rodríguez, R. (1998). Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant Molecular Biology* 36: 331–341.

Hwang, Y., Bethke, P., Gubler, F., Jones, R. (2003). cPrG-HCl a potential H⁺/Cl⁻ symporter prevents acidification of storage vacuoles in aleurone cells and inhibits GA-dependent hydrolysis of storage protein and phytate. *Plant Journal*. 35:154-63.

Ikura, M.(1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends in Biochemical Sciences*.21:14-17.

Jia, X., He, L., Jing, R., Li, R. (2009). Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants. *Physiologia Plantarum*. 38: 127-138.

Kaneko, M., Itoh, H., Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2003). Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants?. *Plant Journal*. 35: 104-115.

Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J., Boutry, M. (2005). Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102: 11675–11680

Klychnokov, O., Li, K., Lill, H., De Boer, A. (2007). The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins *Journal of Experimental Botany*. 58: 1013–1023.

Lovegrove, A., Hooley, R. (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science*. 5:102-110 .

Luan, S., Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S., Grisse, W. (2002). Calmodulins and Calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *The plant cell. Suplemento* 1:389-400.

Maya, V. (2007) Identificación de proteínas de membrana de capa de aleurona cuyo estado redox se modifica por efecto del ácido giberélico. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. Posgrado, UNAM.

Mc Pherson, M., Hames, B., Taylor, G. (2001) cDNA cloning by RT-PCR en PCR 2, A practical approach. USA. Oxford University Press.

Meier, S., Gehring, C. (2006). Emerging roles in plant biotechnology for the second messenger GMPc - guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *African Journal of Biotechnology* 5 (19): 1687-1692.

Micaroni, M. (2008). The role of Ca in the regulation of intracellular transport. En Mironov, A. *The Golgi Apparatus*. pp. 143-160. Holanda. Ed. Springer –Verlag.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2004). Regulation of the cell death: The calcium apoptosis link. *Nature Reviews*. 4: 552-565.

Perfus-Barbeoch, L., Jones, A. M. and Assmann, S. M. (2004). Plant heterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:719-731

Ranty, B., Aldon, D., Galaud, J.P. (2006). Plant calmodulins and calmodulin-related proteins. Multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signaling and Behavior*. 1:96-104 .

Reddy, V., Anireddy S. (2004). Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry*. 65 : 1745–1776.

Richards, D., King, K. (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 52:67–88

Ritchie, S., Swanson, S., Gilroy, S. (2000). Physiology of the aleurone layer and starch endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research*. 10: 193–212

Simon P., Penson, A., Robert C., Schuurink, A. et al. (1996). GMPc required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *The Plant Cell*. 8: 2325-2333.

Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*. 11: 691–706.

Schoonheim, P., Veiga, H., Pereira, D., Friso, G., Van Wijk, K. (2007). A Comprehensive Analysis of the 14-3-3 Interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiology*. 143: 670–683.

Strehler, E.E., Treiman, M. (2004). Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Current Molecular Medicine*. 4: 323–335.

Sun, T., Gubler, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellins in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 197-223.

Referencias Bibliográficas

Swanson,S., Jones, R. (1996). Gibberellic Acid induces vacuolar acidification in barley aleurone. *The Plant Cell*. 8: 221 1-2221.

Tesmer, J. (2010). The quest to understand heterotrimeric G protein signaling. *Nature Structural and Molecular Biology*. 17:650–652

Tuteja, N.,Mahajan, S. (2007).Calcium signaling networks in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 2: 79-85

Woodger,F., Jacobsen,J., Gubler, F.(2007). Gibberellin action in germinated cereal grain. En Woodger, F. *Plant Hormones*. pp.221-240. Holanda. Springer.