



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Asociación de PCNA con
proteínas del ciclo celular
durante la germinación de maíz**

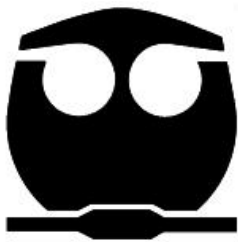
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ MATA



MÉXICO, D.F.

2011



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	Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos
VOCAL	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO	Dr. José Pedraza Chaverri
1er. SUPLENTE	Dra. María Elena Ibarra Rubio
2°. SUPLENTE	Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 114, Departamento de Bioquímica, Conjunto E.
Facultad de Química, UNAM.

ASESOR:

SUSTENTANTE:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Miguel Ángel Martínez Mata

*La consumación de este proyecto está dedicado a mi madre
y a mi padre quienes me convirtieron en
el hombre que ahora soy.*

AGRADECIMIENTOS

Faltan las palabras y sobran las personas a las que tengo que agradecer por haberme ayudado a llegar hasta este momento tan importante en mi vida. Juntos pudimos salir adelante, dando la cara de frente y enfrentando al mundo por más despiadado y bondadoso que este haya sido. No abdicamos a nuestros valores, aquellos que dan identidad y sentido a nuestra vida. Surgimos de las cenizas y nos levantamos juntos en armas contra la ignorancia y la injusticia. Dejamos de existir y volvimos a nacer, somos nuevos, llenos de esperanza y amor. Así es, eso somos, lo saben mis padres, hermanos, familiares, amigos, maestros y todos los que formaron parte de mi vida.

Sería cruel hacer una lista con nombres de personajes que participaron en mi formación personal, académica, espiritual, pero todos ustedes se reconocerían así mismo de manera inmediata. Hago una atención especial a mi universidad, mi alma mater, la que finalmente consumó mi formación profesional y por todo lo que ella representa en mi vida, un segundo hogar, mi pensamiento, mi libertad, mi identidad, me has dado las armas con las que conquistaré al mundo, que mas puedo pedir, eres única; en ti encontré grandes maestros, amigos, ideas, valores, amor, a ella, Diana.

Agradezco infinitamente a mi papá Rafael y a mi mamá Martha por inculcar en mi la esperanza, el amor, la humildad y cariño que todo hijo necesita. Gracias por alentarme a seguir adelante y conquistar mis sueños, gracias por darme la vida para conocer el universo. La familia es lo más importante, siempre estaremos unidos a pesar de todo. Hago una mención especial a mi tía Bertha, quien gracias a ella tuve un techo donde dormir y comer durante mi estancia en México, ha sido mi segunda madre.

En el laboratorio descubrí cosas maravillosas, la magia de la química me envolvió y caí rendido a sus pies. Agradezco al Dr. Jorge Vázquez por creer en mí y darme la oportunidad de desarrollar mi capacidad de pensamiento. De la misma manera, gracias a Pilo y a los compañeros del laboratorio por los grandes momentos compartidos.

A todos ustedes, muchas gracias.

Miguel Angel Martínez Mata

***“Cada hombre elige su destino,
no se gana ni se pierde, sólo se aprende”***

MAMM

INDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El maíz: símbolo de una cultura	1
1.1.1 Origen del maíz	1
1.1.2 Importancia del maíz	2
1.1.3 El maíz como modelo biológico	3
1.2 Germinación	5
1.3 Ciclo celular	7
1.3.1 Regulación del ciclo celular en plantas	9
1.3.1.1 CDKs de plantas	10
1.3.1.2 Ciclinas de plantas	11
1.3.1.3 Transición G1/S en plantas	11
1.4 PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular)	13
1.4.1 Estructura de PCNA	14
1.4.2 PCNA en el control del ciclo celular	16
1.5 Técnica de inmunoprecipitación de la cromatina	17
1.5.1 Entrecruzamiento	17
1.5.2 Fragmentación de la cromatina	18
1.5.3 Inmunoprecipitación de la cromatina	19
2. ANTECEDENTES	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo general	22
3.2 Objetivos particulares	22
4. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1 Material biológico	23
4.2 Métodos experimentales	24
4.2.1 Proceso de extracción de la cromatina	24
4.2.1.1 Obtención de ejes embrionarios de maíz	24
4.2.1.2 Germinación de ejes embrionarios de maíz	24
4.2.1.3 Entrecruzamiento	24
4.2.1.4 Arresto del entrecruzamiento	25
4.2.1.5 Extracción de la cromatina	25
4.2.1.6 Fragmentación de la cromatina	26

4.2.2	Determinación de la concentración de proteína y DNA	27
4.2.2.1	Cuantificación de proteínas	27
4.2.2.2	Cuantificación de DNA en la fracción de cromatina	28
4.2.3	Ensayos de inmunoprecipitación	29
4.2.3.1	Formación del complejo de inmunoprecipitación	29
4.2.3.2	Elusión del complejo de inmunoprecipitación	29
4.2.3.3	Reversión del entrecruzamiento de los complejos proteicos	30
4.2.4	Preparación de muestras para el SDS-PAGE	30
4.2.4.1	Muestras de inmunoprecipitado	30
4.2.4.2	Muestras de controles	31
4.2.5	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	31
4.2.5.1	Preparación de geles de poliacrilamida	32
4.2.5.2	Corrida electroforética	33
4.2.6	Western blot	34
4.2.6.1	Transferencia de proteínas a un soporte sólido	35
4.2.6.2	Tinción de proteínas inmovilizadas en la membrana	36
4.2.6.3	Inmunodetección de proteínas de interés	36
4.2.6.3.1	Bloqueo de la membrana	36
4.2.6.3.2	Unión del anticuerpo primario a su antígeno	37
4.2.6.3.3	Unión del anticuerpo secundario al anticuerpo primario	37
4.2.6.3.4	Revelado	38
4.2.6.3.5	Restauración de la membrana	39
4.2.7	Extracción e identificación de DNA	39
4.2.7.1	Proceso de extracción de DNA	39
4.2.7.2	Electroforesis en gel de Agarosa	40
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1	Etapa 1: Optimización del proceso de extracción de la cromatina	41
5.1.1	Eficiencia del entrecruzamiento en el extracto total	41
5.1.2	Eficiencia del entrecruzamiento en la cromatina fragmentada	42
5.1.3	Eficacia de la extracción de la cromatina	44
5.1.4	Eficiencia de la reversión del entrecruzamiento	45
5.1.5	Eficacia de la fragmentación de la cromatina	46
5.1.6	Análisis de PCNA en las fracciones celulares	48
5.2	Etapa 2: Ensayos de inmunoprecipitación	50
5.2.1	Inmunoprecipitación de la cromatina	51
5.2.1.1	Inmunodetección de las proteínas asociadas a PCNA	51
5.2.1.2	Detección de DNA asociado a PCNA	52
5.2.2	Inmunoprecipitación en la fracción citoplásmica	54
5.3	Condiciones experimentales óptimas de la metodología CHIP	55
5.4	Etapa 3: Inmunoprecipitación en las fracciones celulares durante la germinación de maíz	56
5.4.1	Proteínas del ciclo celular durante la germinación de maíz	56
5.4.1.1	PCNA durante la germinación de maíz	58
5.4.1.2	CDKA durante la germinación de maíz	60

5.4.1.3 Ciclina D4;2 durante la germinación de maíz	61
5.4.2 Interacción de proteínas reguladoras del ciclo celular con PCNA durante la germinación de maíz	63
5.4.2.1 PCNA, CDKA y ciclina D4;2 forman un complejo unido al DNA	65
5.4.2.2 La asociación PCNA/CDKA/ciclina D4;2 varía durante el proceso germinativo	68
6. CONCLUSIONES	72
7. PERSPECTIVAS	73
8. REFERENCIAS	74

ABREVIATURAS

CAPS	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CF	Cromatina fragmentada
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CI	Cromatina intacta purificada
CKS	Subunidad de CDK
CR6	Factor de interacción 6
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA Pol δ	DNA polimerasa delta
DNA Pol ϵ	DNA polimerasa épsilon
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamin tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil) tetraacético
ET	Extracto total
F1	Fracción organelar
F2	Fracción de cromatina
Fc	Fracción cristalizable de un anticuerpo
GADD45	Proteína 45 inducible por daño al DNA y arresto de crecimiento

ICK	Inhibidor de CDK
IDCL	Asa conectora de interdominios
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Inmunoprecipitación
K₂HPO₄	Fosfato monoácido de potasio
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Fosfato diácido de potasio
KRP	Proteína relacionada con Kip
MDM2	Doble minuto 2 murino
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MYD118	Factor 118 de diferenciación mieloide
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP	Motivo de interacción de proteínas con PCNA

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polivinil difluoruro
RBR	Proteína relacionada al retinoblastoma
S1	Fracción citoplásmica
S2	Fracción intraorganelar soluble
S3	Proteína inespecífica a cromatina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
Solución TBE	Solución de Tris, ácido bórico y EDTA
Solución TE	Solución de Tris-HCl y EDTA
Tag	Péptido de reconocimiento o purificación
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tritón X-100	Octilfenilpoli(etilenglicoleter) ₁₀
Tween 20	Polietilenglicol sorbitán monolaurato

RESUMEN

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante de México. En el maíz se deposita nuestra seguridad alimentaria y el campo dedica buena parte de la tierra cultivable a este cereal. Ante este panorama, surge la necesidad de utilizar a esta planta como modelo biológico para estudiar procesos celulares como la germinación de las semillas, que permitan el mejoramiento del maíz. El estudio de la fase G1 del ciclo celular y su relación con la entrada a la fase S es importante para conocer el proceso molecular mediante el cual se lleva a cabo la germinación de las semillas de maíz.

En este trabajo se estudió la asociación de proteínas de la fase G1 del ciclo celular, ciclina D4;2 y CDKA, con una proteína fundamental de la fase S, PCNA. Para estudiar tal asociación, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en ejes embrionarios de maíz y se optimizó el proceso de extracción de la cromatina y los ensayos de inmunoprecipitación. Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se aplicó la metodología ChIP tanto en la cromatina como en el citoplasma a diferentes tiempos de la germinación de maíz.

Los resultados obtenidos demuestran que durante la progresión del proceso germinativo, los niveles de las proteínas PCNA, CDKA y ciclina D4;2 varían tanto en la cromatina como en el citoplasma, indicando que estas proteínas son transportadas entre estos compartimentos subcelulares. Además, estas proteínas forman un complejo unido al DNA en la fracción de cromatina, pero no se asocian en la fracción de citoplasma. Finalmente, se demostró que el nivel de asociación del complejo PCNA/CDKA/ciclina D4;2 varía durante el proceso fisiológico estudiado. Lo anterior, sugiere que la proteína PCNA funciona como una plataforma deslizante sobre el DNA que acarrea a los complejos CDKA/ciclina D hasta sus proteínas blanco, lo que indicaría una nueva función para PCNA nunca antes descrita.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El maíz: símbolo de una cultura

El maíz es una planta humana porque no existe sin la intervención inteligente y oportuna de la mano del hombre. Al cultivar el maíz, el hombre también se cultivó. Las grandes civilizaciones del pasado y la vida misma de millones de mexicanos de hoy, tienen como raíz y fundamento al generoso maíz. Maíz, sociedad, cultura e historia son inseparables. Nuestro pasado y nuestro presente tienen su fundamento en el maíz. Nuestra vida está basada en el maíz, somos gente de maíz (*SEP, 1987*).

1.1.1 Origen del maíz

Hasta el momento no se sabe con precisión la época y lugar exacto de la aparición del maíz. Todo indica que el maíz es originario del continente americano, seguramente de Mesoamérica, aunque su domesticación pudo realizarse de modo simultáneo en otros lugares del continente. Sin embargo, evidencias arqueológicas señalan a México como el centro de origen del maíz. Su migración posterior explica la gran diversidad de razas, variedades, colores y tamaños del maíz, así como de su capacidad para adaptarse a diferentes climas y condiciones.

El consumo del maíz como principal alimento ha sido constante a partir del momento en que se inició la sedentarización de lo que hoy es México hace más de 6 mil años y que las migraciones humanas lo llevaron a Sudamérica. De México se dispersó hacia el norte del continente y posteriormente hacia Europa y Asia. De esta manera, se puede decir que el maíz ha hecho posible la sobrevivencia y reproducción biológica de la sociedad mexicana (*Reyes-Castañeda, 1990*).

1.1.2 Importancia del maíz

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante de México; es por eso que su trascendencia abarca aspectos alimentarios, económicos, políticos, históricos y sociales. En el maíz depositamos buena parte de nuestra seguridad alimentaria y el campo dedica buena parte de la tierra cultivable a este cereal.

El maíz tiene tres aplicaciones posibles: alimento, forraje y materia prima para la industria. Como alimento, se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede elaborar con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios, como por ejemplo, sémola de partículas de diferentes tamaños, sémola en escamas, harina fina, que a su vez tienen un gran número de aplicaciones en una amplia variedad de alimentos; se debe notar que el maíz cultivado en la agricultura de subsistencia continúa siendo utilizado como cultivo alimentario básico. Se estiman más de 800 artículos que utiliza la humanidad, en los cuales interviene el maíz (*FAO, 1993*).

A pesar de ser una buena fuente de nutrientes para el ser humano, el principal uso del maíz a nivel mundial es la elaboración de alimento para consumo animal. Hasta el ciclo comercial 2000-2001, la fabricación de alimento animal representaba 70% del consumo mundial del grano. El restante 30% se destinaba a la obtención de almidones, alta fructuosa, dextrosa, cereales y en menor medida alcoholes como el etanol. Cabe hacer notar que el consumo humano directo es poco significativo a nivel mundial. Por ejemplo, en Estados Unidos el consumo de maíz como cereal, botana y tortillas significó sólo un 1.7% del volumen total de consumo durante el ciclo 2009-2010. Sin embargo, para México el consumo alimentario humano de este grano resulta de vital importancia (*SIAP, 2009; FIRA, 2010*).

En 2008 se cosecharon 7.3 millones de hectáreas de maíz que abarcaron 35.8% de la superficie cosechada total del país. En cuanto a su importancia económica, en 2008 el valor de la producción de maíz superó los 68.7 mil millones de pesos por lo que es la actividad agropecuaria de mayor importancia económica. Dado lo anterior, el maíz es el cultivo de mayor impacto social y económico del país (*FIRA, 2010*).

1.1.3. El maíz como modelo biológico

El maíz es un cereal y tiene múltiples clasificaciones, por ejemplo, es una planta monoica, con flores unisexuales y alógama.

El fruto de la planta del maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es una cariósida y agrícolamente se le conoce como semilla. Biológicamente, el fruto es el ovario desarrollado y la semilla es el óvulo fecundado, desarrollado y maduro formando un solo cotiledón. En el maíz, el ovario se desarrolla al igual que el óvulo hasta tener una sola estructura.

Como se señala en la **figura 1.1**, las principales partes de una semilla de maíz son las siguientes:

Pericarpio: Forma la cubierta de la semilla o testa. Son las paredes del ovario. Equivale al 6% del peso del grano.

Endospermo: Es el tejido de reserva de la semilla que alimenta al embrión durante la germinación. Es la parte de mayor volumen de la semilla (82%), formado principalmente de almidón.

Embrión: Son los rudimentos de los órganos que formarán la plántula. Está constituido por la plúmula o brote embrionario que formará las hojas, y la radícula que dará origen a la raíz. Contiene la mayor cantidad de ácidos grasos y proteína de la semilla. Equivale al 12% del peso del grano.

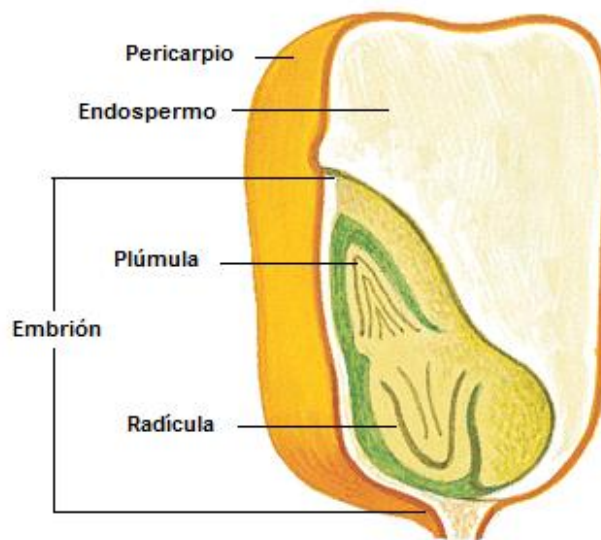


Figura 1.1 Partes de la semilla de maíz.
(Tomado de la Enciclopedia Estudiantil Hallazgos, 2001)

Dada la importancia que tiene el maíz para el mundo, en especial para México, su estudio ha surgido más allá de las áreas de la botánica y agronomía para centrarse en una nueva era del conocimiento, la genómica y la proteómica. Pocas son las plantas como el maíz que se han utilizado como modelo de estudio en la genética mendeliana del siglo XX. Es este nuevo siglo, el maíz continúa siendo un sistema botánico ideal para analizar transposones, visualización de cromosomas durante la meiosis y mapeo de fenotipos (Paterson et al., 2005). Entre muchos otros estudios que se han llevado a cabo en maíz, resalta el análisis de genes y proteínas que intervienen en el control del ciclo celular; esto con el fin de comprender claramente los mecanismos moleculares que participan en la germinación de las semillas (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

1.2 Germinación

La germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula son pasos cruciales en la producción de cereales como el maíz. En la agricultura, estos procesos determinan la uniformidad y densidad de cultivo; así como la eficiencia del uso de nutrientes y agua disponibles para la planta, que finalmente afectan el rendimiento, calidad y valor económico del producto agrícola.

La germinación de la semilla es importante para iniciar el ciclo de vida de una planta y perpetuar su especie. Este proceso empieza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente con la emergencia de la radícula. El proceso incluye: hidratación de proteínas, reparación de membranas y DNA, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular. El resultado combinado es la conversión de un embrión deshidratado con un metabolismo casi nulo, en un embrión con un metabolismo activo y vigoroso. El orden de esta serie de procesos celulares puede ocurrir simultáneamente o bien serialmente, pero tienen que ser mantenidos para asegurar su culminación y permitir el crecimiento irreversible de la planta (**figura 1.2**) (*Bewley & Black, 1994*).

Bioquímicamente, la germinación involucra la culminación exitosa de una serie de procesos moleculares que anteceden a la primera ronda de división celular, la cual es esencial para que las células proliferen y puedan establecer la plántula (*Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003*). Lo anterior, sustenta la idea de que la protrusión de la radícula ocurre por expansión celular debido al potencial hídrico del medio y no necesariamente por división celular durante la germinación de la semilla (*Bewley, 1997*). Semillas como la zanahoria y el apio tienen embriones que crecen hasta 3 veces, por una combinación de división celular y expansión celular antes de que ocurra la emergencia de la radícula. Por contraste, existen semillas cuya radícula emerge debido al potencial hídrico del medio, a pesar de que las células del embrión no han completado mitosis (*Benech-Arnold & Sánchez, 2004*).

Por lo tanto, se plantea la necesidad de investigar los procesos moleculares inherentes a la imbibición de la semilla para tratar de entender claramente el concepto de germinación. El ciclo celular en plantas es, sin duda, un excelente sistema para estudiar a la germinación de la semilla. El conocimiento de los mecanismos moleculares en los cuales participan las proteínas relacionadas al ciclo celular en plantas, nos dará una idea de la importancia que éste tiene para la germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula.

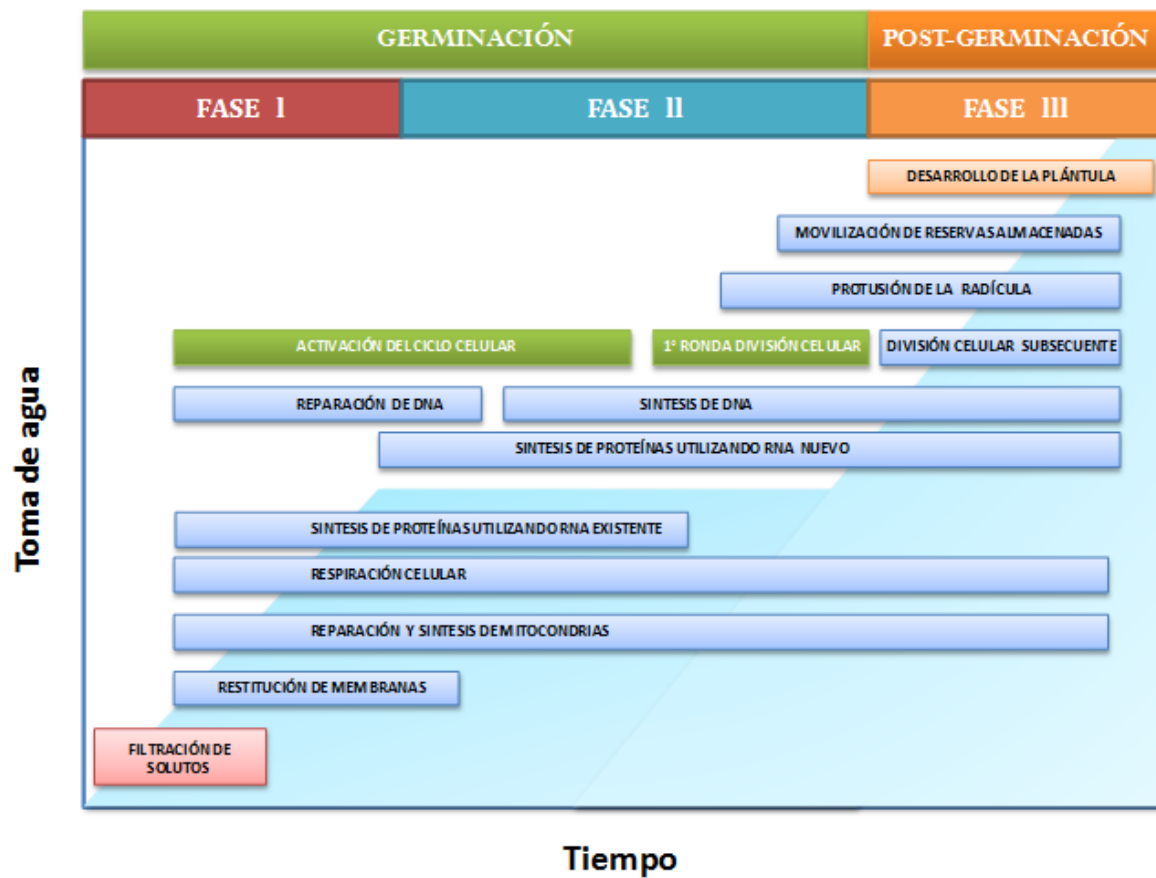


Figura 1.2 Procesos celulares llevados a cabo durante la germinación de las semillas (Modificado de Black et al., 2006).

1.3 Ciclo celular

El ciclo celular es una serie de eventos moleculares coordinados de manera temporal y espacial que permiten a las células duplicar y segregar sus cromosomas para formar nuevas células. El ciclo celular permite a la célula proliferar de forma ordenada. Tradicionalmente, el ciclo celular se ha dividido en 4 fases: G1, S, G2 y M; una quinta etapa sería el proceso por el cual las células se separan físicamente formando dos células nuevas, denominado citocinesis. Al ciclo celular se le puede dividir también en dos etapas: interfase y mitosis; la primera corresponde a las fases G1, S y G2. Las fases G1 y G2 separan a la fase de replicación del DNA (fase S) de la fase de segregación de cromosomas (fase M). La fase G1 intercede entre la mitosis previa y la entrada a la siguiente fase S, mientras que la fase G2 separa a la fase S de la subsecuente fase M. Las fases G1 y G2 permiten la operación de controles para que las otras fases puedan ser completadas. No es de sorprenderse que la mayoría de los puntos regulatorios del ciclo celular operan en las transiciones G1/S y G2/M, los cuales corresponden a puntos potenciales de arresto del ciclo celular como una consecuencia de la evaluación de las condiciones internas y externas de la célula (*Dewitte & Murray, 2003*).

Las fases del ciclo celular son las siguientes:

Fase G1. Las células ocupan la mayor parte del tiempo en esta fase, iniciando una etapa de crecimiento celular y de metabolismo activo. Durante esta fase, las células perciben las condiciones del medio ambiente, integrando señales relevantes antes de tomar la decisión de duplicar el DNA.

Fase S. Una vez que se dan las condiciones adecuadas para la proliferación, la célula entra a la fase de síntesis del material genético (replicación del DNA), para duplicar el material hereditario que posteriormente será repartido entre las células hijas.

Fase G2. La célula se asegura que el DNA se duplicó correctamente y que existen las condiciones adecuadas para la distribución de los cromosomas.

Fase M. En esta fase los cromosomas son separados y la célula se divide en dos células hijas, cada una conteniendo información genética idéntica.

Dado que es un ciclo, después de completar la fase M las células se encontrarán nuevamente en G1. Si las condiciones ambientales son óptimas, una nueva ronda de eventos celulares darán origen a un nuevo ciclo celular, promoviendo así la proliferación celular (*Vázquez-Ramos, 2006; Black et al., 2006*).

El ciclo celular ha sido uno de los procesos biológicos más estudiados. La investigación en una amplia diversidad de organismos modelo, levaduras, mamíferos y plantas, han contribuido a dilucidar como la evolución ha modificado la maquinaria básica del ciclo celular para que cada organismo enfrente los cambios de su ambiente y de su propio desarrollo. Se ha demostrado que los mecanismos fundamentales que controlan el ciclo celular en plantas y animales son sorprendentemente semejantes, tanto en las proteínas que participan como en los mecanismos de acción, lo que implica que estos procesos se han conservado a lo largo de la evolución. Esto a pesar de que existen claras diferencias en la forma en que se estructuran estos organismos (*Inzé & De Veylder, 2006*).

En contraste con los animales, el desarrollo de las plantas es completamente post-embrionario, con la capacidad de producir nuevos órganos, raíces, hojas, tallos, flores, mediante grupos celulares particulares que proliferan y eventualmente siguen un programa de diferenciación específico. Estos patrones organogénicos pueden permanecer latentes y activables durante el periodo de vida de la planta. El desarrollo de la planta es además único, porque la migración celular es prevenida por las paredes celulares rígidas. Todos estos aspectos convierten al análisis del ciclo celular de plantas en un campo de fundamental interés (*Inzé, 2003 & 2005; Jager et al., 2005*).

1.3.1 Regulación del ciclo celular en plantas

La regulación del ciclo celular es importante para el crecimiento y desarrollo de la planta. El control del ciclo celular en plantas, al igual que en todos los modelos eucarióticos, involucra la activación de una clase especial de proteínas cinasas de serina y treonina, cuya actividad funcional depende de la unión de proteínas reguladoras conocidas como ciclinas, y por lo tanto denominadas cinasas dependientes de ciclina (CDKs: cyclin-dependent kinases). Diferentes complejos ciclina/CDK fosforilan una gran número de sustratos durante las transiciones G1/S y G2/M permitiendo que se lleven a cabo procesos como la replicación del DNA y la mitosis, respectivamente (**figura 1.3**).

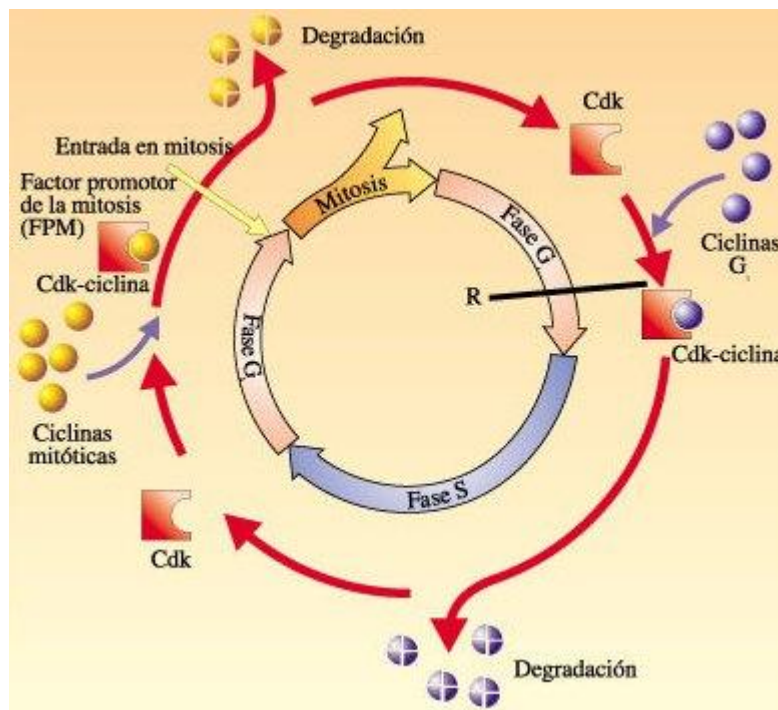


Figura 1.3 La formación de complejos Ciclina/CDK conducen a la célula a través de las fases del ciclo celular (Tomado de PUC, 2011)

La asociación de CDKs con distintas ciclinas da lugar a diferente especificidad de sustrato y actividad de cinasa. La duración de estos procesos durante el ciclo celular es controlada por la asociación de las ciclinas; estas proteínas son sintetizadas durante ventanas específicas de tiempo y son altamente inestables, por lo que su destrucción es controlada por el avance en el ciclo celular. La actividad de los complejos ciclina/CDK también se altera por modificaciones post-traduccionales (fosforilación/desfosforilación) y por la asociación de proteínas regulatorias (KRP, ICK, CKS) (*Huntley & Murray, 1999; Oakenfull et al., 2002; Harashima et al., 2007*).

En plantas existen varios tipos de CDKs y ciclinas; sin embargo, únicamente las CDKs tipo A y B se involucran en la regulación del ciclo celular, siendo esta última única de plantas; mientras que solamente las ciclinas tipos A, B y D interactúan con estos tipos de CDKs formando complejos durante las diferentes fases del ciclo celular (*De Veylder et al., 2007*).

1.3.1.1 CDKs de plantas

Las CDKs tipo A presentan el motivo de unión a ciclina PSTAIRE. Sus niveles de transcrito y abundancia de proteína son constantes a través del ciclo celular, y se asocian principalmente con las ciclinas tipos A y D. Sin embargo, su actividad de cinasa se incrementa durante las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular (*Joubes et al., 2000*).

Las CDKs tipo B presentan el motivo de unión a ciclina PPTALRE o PPTTLRE, reflejando la existencia de dos subgrupos, CDKB1 y CDKB2, los cuales presentan diferencias en los tiempos de expresión de sus transcritos. Los transcritos de CDKB1 se acumulan durante las fases S, G2 y M, y la proteína se asocia con ciclinas A, B y D; mientras que la expresión de transcritos de CDKB2 es específica de las fases G2 y M, en tanto que la proteína interacciona con ciclinas tipo B. Se ha demostrado que la actividad asociada a CDKB tiene un pico máximo durante la mitosis (*Van Leene et al., 2010a*).

1.3.1.2 Ciclinas de plantas

Se ha observado que las plantas contienen una mayor cantidad de ciclinas que las previamente descritas en otros organismos (*Wang et al., 2004*). Sin embargo, poco se sabe de la interacción de todas estas ciclinas con las CDKs y de su función específica durante el ciclo celular. Las ciclinas mejor descritas en plantas corresponden a los tipos A, B y D.

Las ciclinas tipo A son importantes en el control del ciclo celular desde la fase S, en donde se unen con CDKA; y durante la transición G2/M, cuando se asocian con CDKB1. Las ciclinas tipo B interactúan con proteínas CDKB1 y CDKB2 también en la transición G2/M y durante la fase M (*Van Leene, 2010b*).

Las ciclinas tipo D forman complejos con la proteína CDKA, regulando la transición G1/S del ciclo celular a través de la fosforilación de la proteína RBR. Se ha demostrado que la expresión de este tipo de ciclinas es modulada por diversos factores de crecimiento como hormonas y sacarosa, lo que influye en la decisión de las células de la planta para dividirse y proliferar (*Oakenfull et al., 2002*). Además, se ha observado que estas ciclinas se expresan de manera diferencial en ciertos tejidos y etapas del desarrollo de la planta (*Jager et al., 2005*). Por ejemplo, en maíz se ha evidenciado la expresión diferencial de las ciclinas D2, D4 y D5 durante la germinación; además, se ha comprobado la asociación de este tipo de ciclinas con proteínas como CDKA, KRP y PCNA en este proceso fisiológico (*Vázquez-Ramos & Lara-Núñez, 2008*).

1.3.1.3 Transición G1/S en plantas

La activación de la transición de la fase G1 hacia la fase S está controlada por un mecanismo que involucra la activación del factor transcripcional E2F, mediante la fosforilación de RBR (RBR: retinoblastoma-related-protein) dirigida por complejos ciclina D/CDKA (*Francis, 2007*).

La transcripción de ciclinas D es activada por señales extracelulares, permitiendo la formación de complejos ciclina D/CDKA con actividad de cinasa. Estas ciclinas D contienen el motivo LxCxE que interactúa con RBR y, por lo tanto, al formar el complejo ciclina D/CDKA exhiben actividad de cinasa sobre RBR. Por otra parte, RBR en estado hipofosforilado se encuentra secuestrando al factor transcripcional E2F, reprimiendo su actividad. Por lo tanto, la hiperfosforilación de RBR por el complejo ciclina D/CDKA libera a E2F, permitiendo que se transcriban genes involucrados en la fase S y la consecuente progresión del ciclo celular (**figura 1.4**) (Stals & Inzé, 2001; De Veylder et al., 2003; Berckmans & De Veylder, 2009).

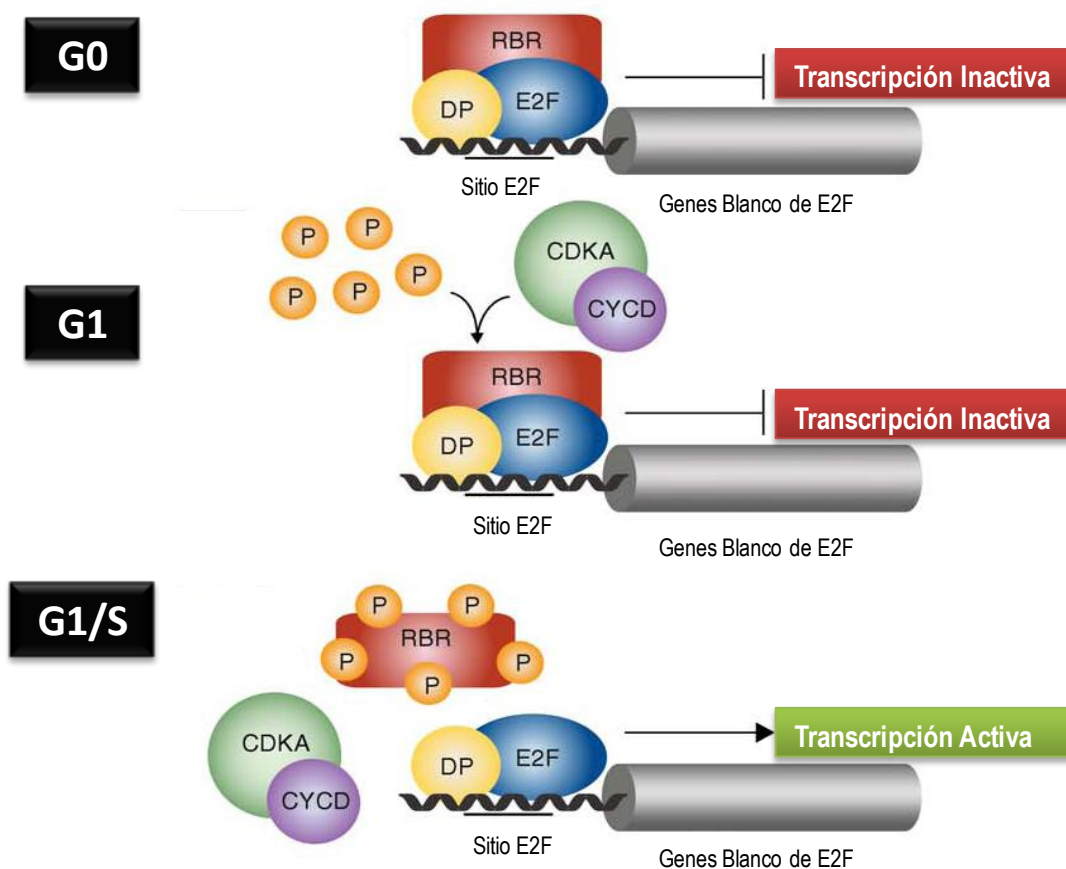


Figura 1.4 Mecanismo molecular propuesto para la transición G1/S en plantas. (Modificado de Berckmans & De Veylder, 2009)

1.4 PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular)

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA: proliferating cell nuclear antigen) es una proteína fundamental, responsable de decisiones que involucran la vida y muerte de la célula. Inicialmente se identificó como un antígeno en pacientes con *lupus eritomatoso sistémico*, una enfermedad autoinmune, al cual nombraron PCNA porque la proteína se encontraba en el núcleo de las células en división (Kelman, 1997).

La proteína PCNA se ha conservado a través de la evolución y se encuentra en todas las especies eucariotas, desde levaduras hasta plantas y animales, así como también en arqueobacterias (Stoimenov & Helleday, 2009).

La proteína PCNA es capaz de interactuar con proteínas de distintos procesos metabólicos, los cuales son vitales para la célula. Esta proteína participa en el metabolismo del DNA como un componente esencial de la maquinaria de replicación, funcionando como una proteína accesoria para las DNA polimerasas δ (DNA Pol δ) y ϵ (DNA Pol ϵ), requeridas para la síntesis del DNA cromosómico. Asimismo, se ha implicado en otros procesos celulares vitales, tales como la reparación del DNA, el remodelado de la cromatina, la cohesión de cromátides hermanas y la replicación por bypass (Kelman, 1997).

Por otra parte, la proteína PCNA interactúa con proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Asimismo, cuando ésta no se encuentra implicada en la replicación de DNA, compromete a las células a un arresto en el ciclo celular y a la reparación del DNA dañado, o cuando la reparación no es posible, la ausencia o bajos niveles de PCNA pueden conducir a las células a apoptosis (Paunesku et al., 2001). Adicionalmente, esta proteína puede sufrir modificaciones post-traduccionales involucradas en la regulación de los procesos celulares ya mencionados (Ulrich, 2009).

1.4.1 Estructura de PCNA

La proteína PCNA en eucariotes es homólogo a la subunidad β de la DNA polimerasa III en *Escherichia coli*, y ambos actúan como una pinza deslizante necesaria para incrementar la procesividad de la DNA polimerasa durante la replicación del DNA. Tanto la procariota como la eucariota son proteínas circulares y en forma anillada con 6 dominios. La proteína PCNA forma un trímero de aproximadamente 780 aminoácidos con 2 dominios por subunidad, mientras que la proteína procariota es de aproximadamente 730 aminoácidos y es un dímero con tres dominios por subunidad (Indiani & O'Donnell, 2006).

En estudios de cristalografía se ha demostrado que cada monómero de PCNA se asocia en un trímero, formando un anillo hexagonal con una cavidad central con un diámetro de 34Å. Cada monómero tiene dos dominios similares enlazados por una asa conectora de interdominios (IDCL: inter-domain connecting loop). El anillo resultante presenta dos tipos de superficies: la superficie externa formada por laminas beta, en donde existe un fuerte potencial electrostático negativo; y la superficie interna formada por hélices alfa ricas en residuos básicos, los cuales presentan un potencial electrostático positivo en la cavidad central, permitiendo a ésta la interacción con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA de doble cadena (Kelman, 1997; Bowman et al., 2004; Strzalka & Ziemienowicz, 2010).

La proteína PCNA presenta diversos sitios de unión para un gran número de proteínas (figura 1.5). Uno de los principales sitios de interacción es IDCL, el cual es reconocido por proteínas como DNA pol δ , p21, Fen1, DNA ligasa 1 y DNA citosin-metiltransferasa. Otras importantes regiones están localizadas en la región N-terminal, en donde se ha encontrado la interacción de las hélices alfa de PCNA con la ciclina D; mientras que la región C-terminal está involucrada en la interacción con proteínas como DNA pol ϵ , RFC, CDK2 y GADD45 (Maga & Hübscher, 2003). Existen motivos específicos de unión a PCNA como la caja PIP (PCNA-interaction protein), en donde distintas proteínas pueden competir por este sitio para dirigir sus procesos celulares (Cox, 1997; Warbrick, 2000).

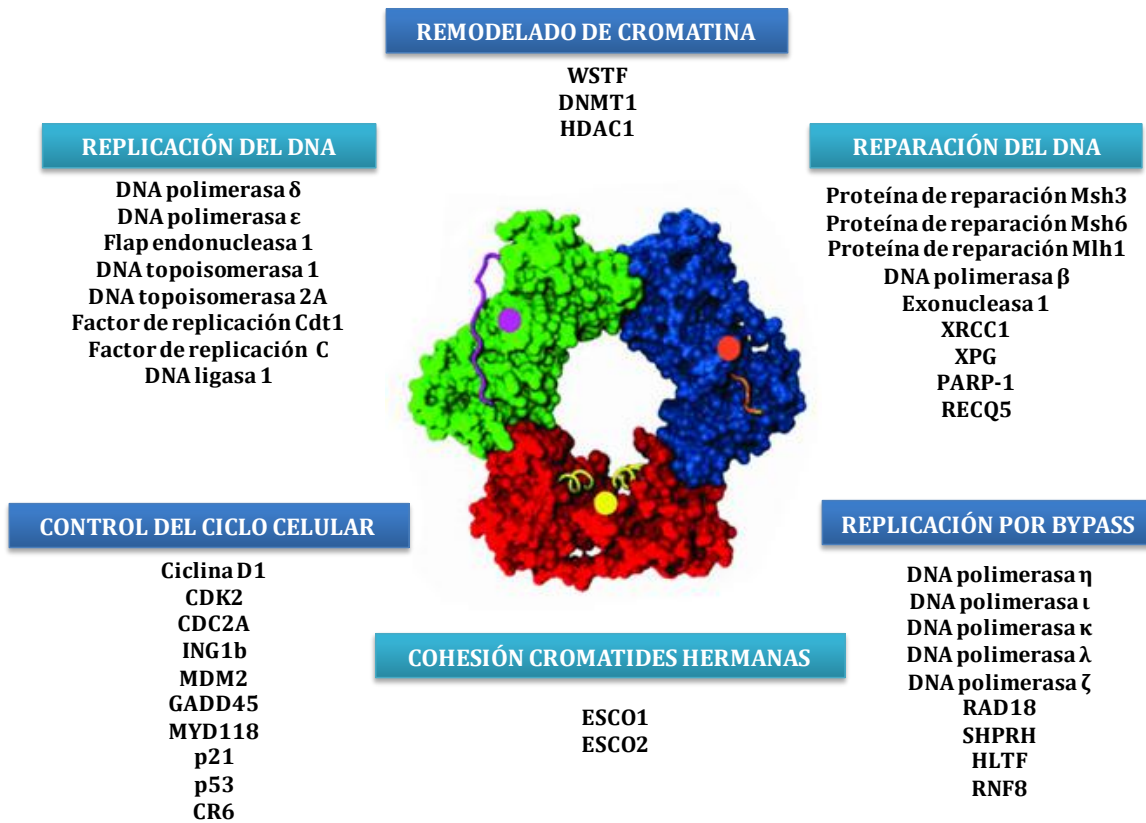


Figura 1.5 *Proteínas que interaccionan con PCNA*
 (Modificado de Staimenov & Helleday, 2009)

1.4.2 PCNA en el control del ciclo celular

La adecuada regulación del ciclo celular es un elemento clave en el control de la división celular. La proteína PCNA interactúa con varias proteínas del ciclo celular eucariótico; por ejemplo, se ha observado en unión con complejos ciclina/CDK y con inhibidores de CDK como p21, además de formar complejos cuaternarios entre estas proteínas.

En animales, la proteína PCNA interacciona con el complejo ciclina A/CDK2, sugiriendo que puede actuar como un enlace entre CDK2 y sus sustratos, como RFC y DNA ligasa 1, los cuales son fosforilados por esta cinasa. Esto representaría un importante mecanismo regulatorio para el reclutamiento de proteínas específicas hacia los sitios de replicación del DNA (*Moldovan et al., 2007*).

Las células que se han diferenciado o que han sufrido daño en el DNA expresan a la proteína p21, la cual bloquea la progresión hacia la fase S del ciclo celular. La proteína p21 se une a las CDKs mediante su región N-terminal y a PCNA a través de región C-terminal. Estudios “*in vitro*” sugieren que cuando la proteína PCNA se encuentra sobre el DNA, p21 bloquea la asociación de ésta con RFC y DNA pol δ , deteniendo la síntesis del DNA. En plantas no se han identificado homólogos de p21 pero se ha observado que PCNA de plantas puede interactuar con la proteína humana p21, sugiriendo que existen proteínas similares en función a p21 involucradas en la regulación de esta interacción (*Strzalka & Ziemienowicz, 2010*).

Otro proceso relacionado con el control del ciclo celular es la apoptosis. La proteína PCNA participa activamente en la regulación de la apoptosis inducida por daño celular mediante la estimulación de proteínas inhibitoras de crecimiento como ING1b o suprimiendo proteínas anti-apoptóticas como GADD45, MYD118 y CR6 (*Stoimenov & Helleday, 2009*). Por otra parte, se ha descrito que el supresor tumoral p53 y su regulador negativo MDM2 contienen cajas PIP que interactúan con PCNA, lo que sugiere que PCNA pudiera contribuir directamente sobre la estabilidad de p53 (*Moldovan et al., 2007*).

1.5 Técnica de inmunoprecipitación de la cromatina

La técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP: chromatin immunoprecipitation) es un poderoso método utilizado para analizar interacciones proteína-DNA “*in vivo*”. Este método se ha utilizado en un amplio rango de organismos y en diferentes tipos celulares, incluyendo levaduras, células de mosca, ratón y humano (Orlando, 2000), además de plantas como arábidopsis, arroz y maíz (Cloix & Jenkins, 2008; Lee et al., 2005; Wang et al., 2002; Haring et al., 2007).

El método ChIP provee de información valiosa sobre procesos asociados a cromatina. Estos procesos incluyen remodelado de cromatina, modificaciones post-traduccionales de histonas, localización de sitios de unión de factores transcripcionales y otras proteínas que interactúan con el DNA. El establecimiento de interacciones proteína-DNA “*in vivo*” permite conocer más acerca de la regulación de importantes procesos celulares como la transcripción de genes, replicación y reparación del DNA, segregación y estabilidad cromosomal, control epigenético y progresión del ciclo celular (Kuo & Allis, 1999; Bowler et al., 2004).

El método ChIP involucra tres pasos básicos: entrecruzamiento con formaldehído “*in vivo*” sobre células intactas, obtención y fragmentación de cromatina e inmunoprecipitación selectiva de complejos proteína-DNA sobre la cromatina (**figura 1.6**) (Ciccone et al., 2004).

1.5.1 Entrecruzamiento

El estudio de las interacciones proteína-DNA es difícil porque algunas de éstas son transitorias y las proteínas que se unen al DNA pueden perderse durante los fraccionamientos bioquímicos.

Para evitar esto y otros potenciales artefactos, se han desarrollado métodos para unir covalentemente proteínas al DNA “*in vivo*”, tratando células vivas con agentes entrecruzantes como el formaldehído (Kuo & Allis, 1999; Dedon et al., 1991).

Los grupos amino de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) y de bases nitrogenadas reaccionan con el formaldehído, logrando la formación de bases de Schiff. Estos intermediarios son altamente reactivos y pueden formar aductos con grupos funcionales de proteínas o nucleótidos adyacentes para la obtención de complejos proteína-proteína y proteína-DNA “*in vivo*”. La ventaja del uso del formaldehído como agente entrecruzante en el método CHIP es que los enlaces formados son fácilmente reversibles, permitiendo el análisis de proteínas y DNA asociados. Tanto el tiempo óptimo de entrecruzamiento como el de reversión deben ser determinados experimentalmente (*Orlando, 2000*).

1.5.2 Fragmentación de la cromatina

La resolución obtenida por el método CHIP está determinada por el tamaño de los fragmentos de cromatina. En general, la obtención de fragmentos de DNA menores a 1000 pb facilitará la obtención de complejos proteína-DNA durante la etapa de inmunoprecipitación. Existen dos métodos para fragmentar a la cromatina: sonicación y digestión enzimática con nucleasa micrococcal (*Haring et al., 2007*).

La digestión enzimática con nucleasa micrococcal es más dirigida que la sonicación, logrando obtener fragmentos tan pequeños como 146 pb. Esta enzima preferentemente corta DNA localizado en las regiones de unión entre nucleosomas. Mediante la variación en la concentración de enzima es posible generar muestras en las cuales varía el tamaño del DNA. Para alcanzar una fragmentación óptima se deben evaluar varias condiciones experimentales sobre la cromatina, seguido de la extracción del DNA y la electroforesis en gel de agarosa (*Aparicio et al., 2004*).

1.5.3 Inmunoprecipitación de la cromatina

La inmunoprecipitación de la cromatina es la etapa más importante en el procedimiento ChIP. El anticuerpo se une a la proteína de interés y posteriormente el complejo proteína-DNA es precipitado, revertido y cada uno de sus componentes es aislado e identificado.

Para determinar si el anticuerpo utilizado es adecuado para el método ChIP, se debe evaluar la habilidad de éste para unirse al material entrecruzado bajo las condiciones experimentales establecidas. Los anticuerpos policlonales son preferidos sobre los anticuerpos monoclonales debido a que los primeros pueden reconocer varios epítopes del antígeno, incrementando la capacidad del método para detectar las asociaciones proteína-DNA. El DNA aislado desde la cromatina inmunoprecipitada tiene que ser analizado para determinar que fragmentos de DNA están presentes. Los métodos para analizar estos fragmentos de DNA incluyen PCR, PCR tiempo real, Southern-Blot y técnicas de microarreglos. Por otra parte, para poder analizar interacciones proteína-proteína sobre la cromatina se han utilizado métodos como el western blot (*Das et al., 2004; Negre et al., 2006*).

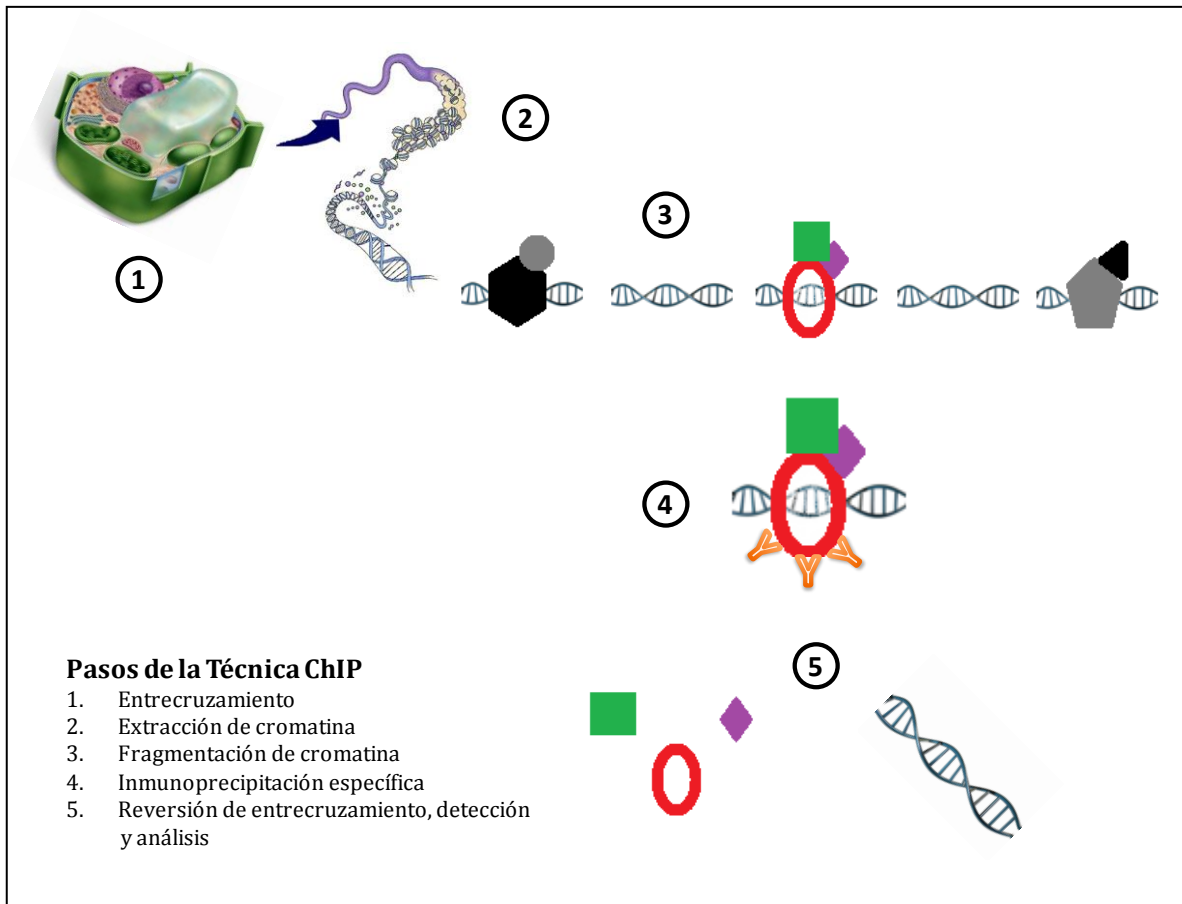


Figura 1.6 Pasos de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

2. ANTECEDENTES

Debido a que el maíz es el cultivo agrícola más importante de México, en el laboratorio se ha utilizado a esta planta como modelo biológico para estudiar procesos fisiológicos importantes como la germinación de las semillas. Se ha decidido estudiar el proceso de germinación desde el punto de vista molecular, enfocándose principalmente en las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, específicamente en aquellas que tienen que ver con la transición G1/S. El estudio de proteínas de la fase G1 como CDKA y ciclinas tipo D, y de proteínas de la fase S tales como PCNA, ha sido punto medular en la comprensión de los mecanismos por los cuales las células embrionarias de las semillas activan sus procesos metabólicos para lograr el establecimiento de la plántula.

En maíz, se ha observado la asociación de PCNA con proteínas de la fase G1 durante la germinación, estableciendo un enlace entre la fase G1 y la fase S del ciclo celular. Se ha observado que inmunoprecipitados de PCNA co-inmunoprecipitan con proteínas tipo CDKA (*Sánchez et al., 2002; Gómez-Roig & Vázquez-Ramos, 2003*), y que éstos presentan actividad de cinasa sobre la proteína RBR, la cual es importante para la transición G1/S (*Sánchez et al., 2004*); además, se ha demostrado la asociación de PCNA con las ciclinas D2, D4 y D5 (*Gutiérrez et al., 2005; Lara-Núñez et al., 2008*). Los experimentos mencionados se realizaron en extractos totales de semillas de maíz; sin embargo, se desconoce si estos complejos se forman en la fracción de citoplasma “*in vivo*”, o bien cuando PCNA está asociado al DNA en la fracción de cromatina. Lo anterior, significaría que PCNA funciona como una plataforma reclutadora de complejos ciclina/CDK anclada al DNA capaz de fosforilar a sus proteínas blanco localizadas sobre el material genético, lo que indicaría una nueva función para PCNA.

Para obtener complejos proteicos asociados al DNA se ha utilizado la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Recientemente, se utilizó este método en el laboratorio aplicado a embriones de elote (*Becerril, 2007*); sin embargo, para estudiar estos complejos proteicos durante la germinación será necesario implementar esta metodología en ejes embrionarios de semillas de maíz.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si la asociación de PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular (CDKA y ciclina D4;2) se presenta en el compartimento citoplásmico, o bien, formando un complejo unido al DNA, durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays*) mediante el empleo de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

3.2 Objetivos particulares

1. Optimizar el proceso de extracción de la cromatina.
2. Establecer las condiciones óptimas de inmunoprecipitación en las fracciones celulares (cromatina y citoplasma).
3. Determinar el nivel de proteína de PCNA, ciclina D4;2 y CDKA en las fracciones celulares durante la germinación de maíz
4. Evaluar la asociación de las proteínas co-inmunoprecipitadas (PCNA, ciclina D4;2 y CDKA) en las fracciones celulares durante la germinación de maíz.
5. Determinar la presencia del DNA en los complejos estudiados durante la germinación de maíz.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de este proyecto se realizó en varias etapas. La etapa 1 se enfocó en la optimización del proceso de extracción de la cromatina; esta etapa incluyó la determinación del tiempo óptimo de entrecruzamiento y reversión, así como la eficacia de la extracción y fragmentación de la cromatina. Una vez establecidas las condiciones experimentales, se procedió a iniciar la etapa 2, en la cual se implementaron los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-PCNA. En ambas etapas se intentará demostrar la eficacia de la metodología ChIP para detectar asociaciones proteína-proteína y proteína-DNA en las fracciones celulares obtenidas (cromatina y citoplasma). Para desarrollar las etapas 1 y 2 se utilizaron ejes embrionarios de maíz con 24 horas de germinación, pues se ha reportado que a este tiempo de la germinación se obtiene un pico máximo de expresión para PCNA, lo que incrementa la posibilidad de encontrar a esta proteína durante los ensayos posteriores (Herrera *et al.*, 2000). Finalmente, en la etapa 3 de este proyecto se aplicó la metodología ChIP optimizada para definir el nivel de asociación de los complejos inmunoprecipitados (PCNA, CDKA y ciclina D4;2) en las respectivas fracciones celulares, así como la interacción de PCNA con el DNA, durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

4.1 Material biológico

Se utilizaron ejes embrionarios de semillas de maíz *Zea mays* variedad Chalqueño obtenidas de la cosecha 2009.

4.2 Métodos experimentales

4.2.1 Proceso de extracción de la cromatina

4.2.1.1 Obtención de ejes embrionarios de maíz

Con la ayuda de una navaja filosa, se extrajo con extremo cuidado el eje embrionario de la semilla de maíz. Tratando de no dañar el eje embrionario, se retiraron los restos de endospermo alrededor de éste. Los ejes embrionarios se almacenaron temporalmente en un desecador a 4° C.

4.2.1.2 Germinación de ejes embrionarios de maíz

Se utilizaron 100 ejes embrionarios de maíz por cada tratamiento. El material biológico se colocó en un tubo Falcon de 50 ml para ser desinfectado utilizando 10 ml de solución de NaClO 0.1%. Posteriormente, se lavó tres veces con agua estéril y se secó con papel absorbente.

Los ejes embrionarios se colocaron en una caja Petri con papel filtro y se embebieron con 5 ml de solución de imbibición (*Tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y sacarosa 2%*). La caja se selló con Parafilm y se incubó a una temperatura de 25°C durante el tiempo de germinación establecido.

4.2.1.3 Entrecruzamiento

Una vez que los ejes embrionarios germinaron, se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml para lavarse tres veces con agua estéril y secarse con papel absorbente. En el mismo tubo, se agregaron 36 ml de agua destilada y 1 ml de formaldehído 37%, hasta alcanzar una concentración final de formaldehído 1 %.

Los tubos se colocaron en una cámara de vacío durante el tiempo establecido de entrecruzamiento. Se evitó la formación de burbujas agitando ocasionalmente el tubo para mantener los ejes embrionarios sumergidos en el mismo.

4.2.1.4 Arresto del entrecruzamiento

En el mismo tubo donde se llevó a cabo el entrecruzamiento, se adicionaron 4 ml de glicina 2 M hasta alcanzar una concentración final de 0.2 M. Se encendió la cámara de vacío durante 15 minutos para favorecer el arresto del entrecruzamiento. Posteriormente, los ejes embrionarios se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron con papel absorbente.

4.2.1.5 Extracción de la cromatina

Los ejes embrionarios germinados y entrecruzados se colocaron en un mortero previamente enfriado a -70°C . Se agregó nitrógeno líquido para moler y triturar el material biológico hasta obtener un polvo fino. En la misma operación unitaria se agregó una tableta de inhibidor de proteasas (Complete protease inhibitor cocktail tablets, ROCHE). Además, se adicionaron 20 ml de solución de extracción 1 (*sacarosa 0.4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoetanol 5 mM y PMSF 1 mM*) y se continuó mezclando. La mezcla se pasó a un tubo Falcon de 50 ml para centrifugarlo a 800 g durante 3 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una gasa y exprimiendo se hizo pasar a otro tubo Falcon de 50 ml para retener el material grueso. La muestra obtenida corresponde al extracto total (ET).

El extracto total se centrifugó a una velocidad de 3 000 g durante 30 minutos. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplásmica (S1), mientras que en el pellet está presente la fracción organelar (F1). En ésta última fracción se añadió 1 ml de solución de extracción 2 (*sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM, Tritón X-100 2%, β -mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas*), un amortiguador con alta concentración de detergente que permite disociar las membranas de organelos como el núcleo. Por centrifugación a 20 000 g durante 30 minutos, se obtiene en el pellet la fracción intraorganelar no soluble (F2) que contiene a la cromatina, mientras que en el sobrenadante (S2) se encuentran restos celulares solubles.

La fracción F2 se resuspendió en 0.5 ml de solución de extracción 3 (*sacarosa 1.7 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl₂ 2 mM, Tritón X-100 0.15%, β-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas*). Posteriormente, esta suspensión se transfirió cuidadosamente a otro tubo Eppendorf que ya contenía 0.75 ml de la misma solución de extracción. Este amortiguador contiene una alta concentración de sacarosa, su alta viscosidad permite retirar a las proteínas que se encuentran unidas inespecíficamente a la cromatina. Por centrifugación a 20 000 g durante 1.5 h, se obtuvo la fracción soluble inespecífica a cromatina (S3), y finalmente, la fracción de cromatina purificada (F3).

La fracción F3 se resuspendió en 0.5 ml de solución de fragmentación (*Tris-HCl 50 mM pH 8, Tritón X-100 0.15%, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas*) para conformar la muestra de cromatina intacta (CI), previo al proceso de fragmentación de cromatina.

En todo momento las muestras se mantuvieron en hielo y se centrifugaron a una temperatura de 4°C para evitar la degradación de proteínas por parte de las proteasas.

4.2.1.6 Fragmentación de la cromatina

La fragmentación de la cromatina se realizó por el método enzimático utilizando nucleasa micrococcal de *Staphylococcus aureus* (SIGMA).

Se adicionaron 5 Unidades de enzima a la muestra de cromatina intacta (CI) y en seguida se incorporó CaCl₂ hasta una concentración final de 2.5 mM para favorecer la reacción. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos con agitación constante. Posteriormente, la reacción enzimática se detuvo agregando EGTA hasta una concentración final de 5 mM, además de EDTA y PMSF hasta una concentración final de 1 mM. La muestra resultante se etiquetó como la fracción de cromatina fragmentada (CF).

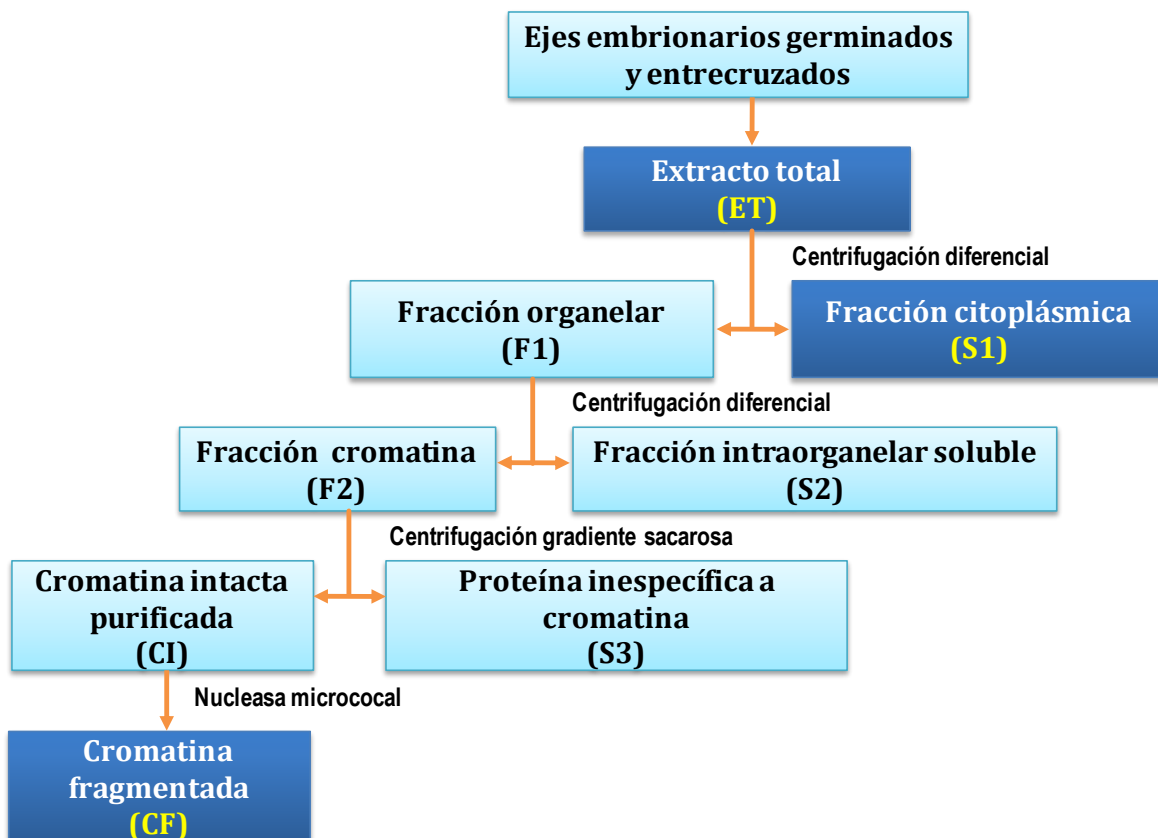


Figura 4.1 Proceso de extracción de la cromatina

4.2.2 Determinación de la concentración de proteína y DNA

4.2.2.1 Cuantificación de las proteínas

La cuantificación de proteínas presentes en cada una de las fracciones recolectadas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

En este método se emplea un colorante hidrofóbico, azul de Coomasie, cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente a una longitud de onda de 595 nm.

Para determinar la concentración de proteína total presente en la muestra, se preparó una curva de calibrado empleando albúmina sérica bovina (SIGMA) como proteína patrón. En la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de albúmina en un medio que contenía el azul de Coomassie y se determinó la absorbancia. Aplicando la ecuación de la recta se obtuvo la ecuación lineal correspondiente.

Se tomaron volúmenes de 1-5 μL de muestra, 900 μL de azul de Coomassie y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 1000 μL en la celda de plástico correspondiente. A continuación se efectuaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro. La concentración de proteína de la muestra analizada se determinó utilizando la ecuación lineal de la curva de calibración.

4.2.2.2 Cuantificación de DNA en la fracción de cromatina

La determinación de DNA se realizó utilizando un método espectrofotométrico. La cuantificación se llevó a cabo en las longitudes de onda de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una OD de 1 corresponde a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble hebra.

Se utilizaron volúmenes de 2 μL de muestra de cromatina y se aforó a 2 mL en la celda de cuarzo correspondiente. Se determinó la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro. Para realizar el cálculo de la concentración de DNA en la muestra problema, se descontó el valor de la lectura de absorbancia registrado para la muestra blanco que contenía a la solución de fragmentación.

4.2.3 Ensayos de inmunoprecipitación

4.2.3.1 Formación del complejo de inmunoprecipitación

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de proteína A-agarosa (ROCHE), 250 μ L de solución de inmunoprecipitado (*Solución IP: Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 2.5 mM y Tritón X-100 0.1%*) y 5 μ L de anticuerpo anti-PCNA de maíz o anti-ciclina D4;2 de maíz. Se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente manteniendo agitación constante en un roscicero. En este paso, el anticuerpo se une mediante su fracción Fc a la proteína A-agarosa debido a la gran afinidad que existe entre éstos.

Después de la incubación con el anticuerpo, se agregaron 200 μ g de proteína para ser inmunoprecipitada, ya sea de la fracción de cromatina fragmentada (CF) o de la fracción citoplásmica (S1). Enseguida se incorporó la solución IP hasta completar un volumen de 500 μ L. Se dejó incubar toda la noche a una temperatura de 4°C con agitación constante en un roscicero. En este paso se presenta la unión del antígeno con el anticuerpo. Posteriormente, los tubos se colocaron a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con 500 μ L de solución de lavado IP (*Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM y Tritón X-100 0.5 %*) en agitación con roscicero durante 5 minutos y posteriormente los tubos se centrifugaron en nanofuga durante 30 segundos. Se recuperó el pellet y se desechó el sobrenadante. El pellet contiene a los complejos proteicos que están asociados al antígeno, también se encuentran el anticuerpo y la proteína A.

4.2.3.2 Elución del complejo de inmunoprecipitación

El pellet se trató con 450 μ L de solución de reversión (*Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 2 mM y SDS 0.1%*) e inhibidor de proteasas. El sistema se colocó en un termoblock a una temperatura de 65°C durante 30 minutos. Enseguida, se centrifugó en nanofuga durante 1 minuto para recuperar sobrenadante.

El sobrenadante contiene a los complejos inmunes solubles, mientras que en el pellet se encuentra únicamente la proteína A-agarosa.

4.2.3.3 Reversión del entrecruzamiento de los complejos proteicos

Los complejos inmunes obtenidos se sometieron a una temperatura de 65°C durante 24 h. Este tiempo óptimo de reversión de entrecruzamiento se obtuvo experimentalmente. En este paso, la aplicación de energía calorífica estimula la reversión de los enlaces de Schiff producto del entrecruzamiento con formaldehído.

En esta muestra se han separado las proteínas unidas al antígeno; además, se encuentran los anticuerpos utilizados durante el proceso de inmunoprecipitación.

4.2.4 Preparación de muestras para SDS-PAGE

4.2.4.1 Muestras de inmunoprecipitado

Las muestras que contenían a las proteínas de los complejos inmunes revertidos se concentraron mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Para ello, se añadieron 125 µL de TCA 100% al volumen de muestra utilizado. Se incubó en hielo por un lapso de 15 minutos. A continuación, se centrifugó a una velocidad de 12 000 g durante 15 minutos. Al pellet resultante se le añadieron 20 µL de solución de cargado (*Tris-HCl 200 mM pH 6.8, DTT 400 mM, SDS 8%, glicerol 40% y azul de bromofenol*). Inmediatamente, se neutralizó el medio ácido mediante la adición de pequeños cristales de Tris-base hasta que el contenido del tubo adquirió una coloración azul. Las muestras se desnaturalizaron completamente cuando se calentaron a 92°C durante 10 minutos. Finalmente, las muestras obtenidas se cargaron en el gel de poliacrilamida y se corrieron por electroforesis.

4.2.4.2 Muestras de controles

Se utilizaron 100 µg de proteína de las muestras que no se sometieron a inmunoprecipitación (ET, CF o S1) para ser utilizadas como controles. Las muestras incluidas en reversión de entrecruzamiento, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se les añadió 500 µL de solución de reversión. En seguida, éstas se colocaron en un termoblock a una temperatura de 65°C durante 24 h, tiempo determinado experimentalmente.

Inmediatamente, las proteínas de estas muestras se inmunoprecipitaron con TCA tal y como se describió anteriormente hasta obtener el pellet deseado y por último se cargaron en el gel de poliacrilamida para realizar la electroforesis.

Las proteínas de las muestras de los controles no revertidas, únicamente se sometieron a precipitación con TCA y se cargaron en el gel de poliacrilamida para llevar a cabo la electroforesis.

4.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Esta técnica consiste en hacer pasar una mezcla de proteínas a través de un soporte sólido formado por una malla de moléculas de acrilamida entrecruzadas con bis-acrilamida y gelificadas con TEMED y persulfato de amonio. La energía que dirige a las proteínas por la malla es un campo eléctrico. En el caso de la electroforesis desnaturalizante, todas las proteínas están cargadas negativamente debido a que están en una solución con el detergente SDS, por lo que van a correr hacia el ánodo (polo positivo).

La distribución de las proteínas en este tipo de electroforesis será con base en su tamaño, ya que las moléculas están desnaturalizadas y cargadas de manera semejante. Las proteínas de menor peso molecular migrarán más rápido, mientras que las de alto peso lo harán más lentamente.

El gel se fragua entre dos vidrios y corre de manera vertical. El gel está constituido por dos partes: el gel separador, localizado en la parte inferior con un pH y concentración de acrilamida mayor que el gel apilador, el cual se localiza en la parte superior del sistema. Cuando las proteínas atraviesan el gel apilador, se encuentran con la resistencia ejercida por el gel separador, de manera que aquellas proteínas retardadas puedan alcanzar al resto y todas inicien la separación desde el mismo punto. El porcentaje de acrilamida en el sistema determina el intervalo en el que el gel es más eficiente para separar a las proteínas.

4.2.5.1 Preparación de los geles de poliacrilamida

En todos los experimentos se utilizaron geles de poliacrilamida a una concentración del 12%. Las cantidades de reactivos utilizados y la forma de prepararlos se presentan en la **tabla 4.1**.

Tabla 4.1 Soluciones para preparar un gel de poliacrilamida 12%

GEL SEPARADOR pH 8.8		GEL APILADOR pH 6.5	
Acrilamida:bis-acrilamida 29.1:0.8 %	3.2 ml	Acrilamida:bis-acrilamida (29.1:0.8)%	0.33 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.0 ml	Tris-HCl 0.75 M pH 6.8	0.5 ml
SDS 10%	80 µL	SDS 10%	20 µL
Persulfato de amonio 10%	75 µL	Persulfato de amonio 10%	20 µL
TEMED	5 µL	TEMED	2 µL
Agua c.b.p.	8 ml	Agua c.b.p.	2 ml

Para poder elaborar los geles de poliacrilamida, se alinearon los vidrios y se colocaron en un soporte para ensamblarlos. Los componentes de la reacción de polimerización se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml cada uno por separado. Al momento de agregar el TEMED comienza el periodo de polimerización. Primero se agregó la mezcla de reacción que contiene al gel separador y en seguida se adicionaron 200 μ L de alcohol isopropílico para evitar que el oxígeno retarde el proceso de polimerización. Una vez polimerizado el gel separador, se retiró el alcohol isopropílico y se añadió la mezcla de reacción que contiene al gel apilador; inmediatamente se colocó el peine que dará forma a los pozos donde se colocará la muestra. Ya que el gel había polimerizado completamente, se retiró el peine y se limpiaron los pozos con ayuda de una aguja. Los geles se colocaron temporalmente en agua hasta el momento de realizar la electroforesis.

4.2.5.2 Corrida electroforética

Las muestras se prepararon utilizando solución de cargado para desnaturalizar a las proteínas. Esta solución consiste en un agente reductor (β -mercaptoetanol), que se encarga de eliminar los puentes disulfuro que se forman entre los aminoácidos cisteína de las proteínas; contiene además SDS, el cual le aporta carga negativa a las proteínas; también se incluye azul de bromofenol, cuya función es marcar el frente de corrida; y finalmente glicerol, cuya viscosidad permite que las proteínas sean depositadas en los pozos del gel.

Los geles se colocaron en un soporte dentro de la cámara de electroforesis y las muestras se depositaron en los pozos correspondientes. Se incluyó también un estándar de peso molecular de proteínas en el primer carril. La cámara electroforética se abasteció utilizando solución de electrodo (*Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%*). Las muestras se sometieron a electroforesis aplicando un voltaje de 100 V durante 1.5 h hasta que el frente de corrida haya recorrido la mayor parte del gel.

Finalizada la corrida, los geles se extrajeron de la cámara electroforética. Se despegaron los vidrios que cubren el gel y con ayuda de una espátula se cortó la porción correspondiente al gel de apilamiento. Los geles se colocaron temporalmente en 20 ml de solución de transferencia (*CAPS 10 mM y metanol 20%*).

4.2.6. Western blot

La técnica del western blot hace referencia a la transferencia de proteínas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma utilizando un anticuerpo marcado.

El primer paso de todo western blot es la separación de las macromoléculas mediante electroforesis; las macromoléculas ya separadas en función de su peso molecular se transfieren a una segunda matriz, generalmente una membrana PVDF. Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés.

En el siguiente paso, se une la proteína transferida a un anticuerpo específico marcado con una enzima y finalmente, se añade un sustrato adecuado para dicha enzima con lo que se genera un producto detectable en la membrana. En la actualidad, los métodos más sensibles emplean sustratos quimioluminiscentes que, cuando se combinan con la enzima correspondiente producen luz como producto final, la cual puede detectarse mediante una película fotográfica. En todos los casos y sea cual sea el sustrato que se utilice, la intensidad de la señal se correlaciona con la cantidad del antígeno en la superficie de la membrana.

4.2.6.1 Transferencia de proteínas a un soporte sólido

Se utilizaron membranas PVDF de 0.45 μm de poro como soporte sólido. Estas membranas son de naturaleza hidrofóbica y presentan ventajas frente a las de nitrocelulosa, ya que retienen mayor cantidad de proteínas, son compatibles con la mayoría de los sistemas de detección, mecánicamente son más estables y presentan una gran resistencia química a los reactivos utilizados para la identificación de las proteínas.

Previo a su uso, las membranas PVDF se hidrataron utilizando metanol y posteriormente se sumergieron en solución de transferencia. Los geles de poliacrilamida que contienen a las proteínas se embebieron en la misma solución de transferencia; lo mismo ocurrió con los papeles filtro que se utilizaron. Las membranas PVDF y los papeles filtro se recortaron al tamaño del gel.

Para poder realizar la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida hasta el soporte sólido, fue necesario colocar a los componentes del sistema de transferencia a manera de sándwich. En la parte inferior se colocaron tres papeles filtro, enseguida la membrana PVDF, luego el gel de poliacrilamida y finalmente otros tres papeles filtro. Con ayuda de un rodillo se aplanó el sistema para evitar la formación de burbujas. El sistema se colocó entre placas de electrodo de grafito. La transferencia se llevó a cabo manteniendo una corriente de 75 mA por membrana durante un periodo de 2 h. Las proteínas quedaron unidas a la membrana de forma no covalente, mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

Finalizada la transferencia, se retiraron las membranas y se lavaron con 20 ml de solución de lavado (*NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Tween 0.1%*). Las membranas se pueden mantener en esta solución temporalmente o pueden dejarse secar hasta el momento en que se requieran.

4.2.6.2 Tinción de proteínas inmovilizadas en la membrana

Para proveer evidencia visual de la transferencia de proteínas al soporte sólido, se realizó una tinción con rojo de Ponceau. Este colorante es compatible con métodos inmunológicos de detección de proteínas, ya que la tinción es transitoria y no interfiere con la unión del anticuerpo al antígeno.

Primero se hidrató la membrana con metanol durante 5 minutos y posteriormente con solución de lavado 5 minutos más. En seguida se añadieron 10 ml de solución rojo de Ponceau (*rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 5%*) y se incubó durante 5 minutos. En el siguiente paso, se retiró el colorante y se realizaron tres lavados con solución de lavado.

En una transferencia exitosa se observan bandas teñidas de color rojo sobre la membrana. Si se desea continuar con la inmunodetección, es recomendable dejar a la membrana lavando por más tiempo para eliminar el colorante.

4.2.6.3 Inmunodetección de las proteínas de interés

4.2.6.3.1 Bloqueo de la membrana

La sensibilidad del western blot depende de la reducción de la señal de fondo debida a la unión inespecífica del anticuerpo sobre la membrana, para ello se utilizan proteínas irrelevantes que bloquean esos sitios potenciales.

Para bloquear a la membrana se utilizó leche en polvo sin grasa 5% (Nestlé Svelty). Esta solución es comúnmente utilizada en sistemas de detección inmunológica, además, es fácil de preparar.

Una vez que la membrana se hidrató, se procedió a realizar el bloqueo de la misma. La membrana se incubó con 10 ml de solución de bloqueo (*leche en polvo sin grasa 5%, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Tween 0.1%*) durante 15 minutos en agitación constante a temperatura ambiente.

4.2.6.3.2 Unión del anticuerpo primario a su antígeno

En este paso, el anticuerpo primario se une de manera específica al antígeno de interés. El anticuerpo es adicionado a la solución de bloqueo después de que se han saturado los sitios potenciales inespecíficos. La cantidad de anticuerpo utilizado es estandarizada, permitiendo elegir la dilución en la cual la señal correspondiente al antígeno se considera satisfactoria.

El sistema se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a una temperatura de 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados con 15 ml de solución de lavado, 10 minutos cada vez en agitación constante.

Tabla 4.2 Concentración de anticuerpo primario utilizado en el western blot

Anticuerpo primario	Concentración
Anti-PCNA de maíz	1:1 000
Anti-CDKA de maíz	1:1 000
Anti-ciclina D4;2 de maíz	1:1 000
Anti-histona H3 de humano <i>(Identidad del 97% respecto a la proteína de maíz; Becerril, 2007)</i>	1: 1 000

4.2.6.3.3 Unión del anticuerpo secundario al anticuerpo primario

Para poder identificar al antígeno sobre la membrana, se utilizó un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está acoplado a la enzima peroxidasa que emite luminiscencia cuando están presentes sus sustratos: luminol y peróxido de hidrógeno.

Toda vez que se unió el primer anticuerpo, la membrana se bloqueó nuevamente con 10 ml de solución de bloqueo durante 15 minutos. En seguida se agregó el segundo anticuerpo y se incubó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Posteriormente, esta membrana se lavó tres veces con 15 ml de solución de lavado, 10 minutos cada vez con agitación constante. Esta membrana está lista para el proceso de revelado.

Se utilizaron dos tipos de anticuerpos secundarios. El anticuerpo anti-IgG (SIGMA) se une a todos los fragmentos de anticuerpo (cadenas pesadas y ligeras, y fragmentos de éstas cadenas). Este anticuerpo se utilizó en una dilución 1:40 000 para identificar a los antígenos de aquellas membranas que no contenían muestras de inmunoprecipitado.

El anticuerpo anti-IgG nativo (Clean-Blot IP Detection Reagent, THERMO SCIENTIFIC) se une solamente a aquellos anticuerpos primarios que se encuentran en su forma nativa, por lo tanto, no podrá reconocer anticuerpos desnaturalizados. De esta manera se asegura que el anticuerpo secundario solo reconozca a los anticuerpos primarios unidos a su antígeno y no a los anticuerpos primarios desnaturalizados. Este anticuerpo se utilizó en una dilución 1:10 000 en las membranas que contenían a las muestras de inmunoprecipitados.

4.2.4.6.4 Revelado

Una vez que se unieron los anticuerpos primario y secundario sobre la membrana, se añadió el sustrato de la enzima peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. El sustrato de la enzima está conformado por luminol y peróxido de hidrógeno (Immobilon western, MILLIPORE), los cuales se añadieron en cantidades iguales.

La membrana se colocó entre dos acetatos y se expuso a una placa fotográfica durante un minuto. La presencia de quimioluminiscencia indica que el anticuerpo primario se unió a su antígeno.

4.2.6.3.5 Restauración de la membrana

La membrana se restauró utilizando solución de restauración A y B (Blot Restore Membrane Rejuvenation Kit, MILLIPORE). La membrana se colocó en solución A durante 10 minutos con agitación; posteriormente se retiró esta solución y se agregó la solución B durante 15 minutos. Inmediatamente, la membrana se lavó con solución de lavado, 15 mL durante 5 minutos. Después de lo anterior, la membrana estuvo lista para ser utilizada en la identificación de una nueva proteína.

4.2.7 Extracción e identificación de DNA

4.2.7.1 Proceso de extracción de DNA

La extracción e identificación de DNA se llevó a cabo a partir de 20 µg de DNA de las fracciones de cromatina intacta (CI) y cromatina fragmentada (CF), las cuales se utilizaron para comprobar la eficacia de la fragmentación de la cromatina por parte de la nucleasa micrococcal. Para evaluar la presencia de DNA en los inmunoprecipitados de CF, se utilizó el equivalente a 100 µg de DNA de esta fracción celular.

Las muestras control de la fracción CF se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se llevaron hasta un volumen de 500 µL con solución de reversión. El procedimiento de reversión del entrecruzamiento se realizó durante 24 h a una temperatura de 65°C. Para extraer el DNA asociado al inmunoprecipitado, se ejecutó el ensayo de inmunoprecipitación descrito anteriormente hasta completar la etapa de reversión del entrecruzamiento. En este paso, los ácidos nucleicos se disociaron de las proteínas presentes en la cromatina.

Una vez que las muestras se revirtieron con calor, las proteínas presentes se degradaron utilizando 50 µg de la enzima proteinasa K (FLUKA) y se incubaron a una temperatura de 60°C durante 1 h. En seguida se añadieron 500 µL de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó durante 30 segundos en vortex y se dejó reposar hasta la completa separación de fases.

A continuación, se centrifugó a una velocidad de 12 000 g durante 10 minutos. En este paso, el proceso de extracción líquido-líquido permite obtener a los ácidos nucleicos en la fase acuosa (fenol), mientras que las proteínas desnaturalizadas se mantienen en la fase orgánica (cloroformo).

La fase acuosa se extrajo cuidadosamente y se depositó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. En seguida, se añadieron 50 μ L de acetato de sodio 3 M, 1 mL de etanol 100% y se dejó reposar toda la noche a una temperatura de -20°C para favorecer la precipitación del DNA. El sistema se centrifugó a una velocidad de 20 000 g durante 30 minutos.

El pellet resultante se lavó nuevamente utilizando 500 μ L de etanol 70% y se centrifugó a una velocidad de 20 000 g durante 15 minutos. Finalmente, los ácidos nucleicos obtenidos se resuspendieron en 10 μ L de solución TE (*Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM*) y se añadieron 0.5 μ L de solución de cargado.

4.2.7.2 Electroforesis en gel de agarosa

Para poder identificar a los ácidos nucleicos extraídos, se procedió a preparar un gel de agarosa 1%.

Se disolvieron 0.5 g de agarosa en 50 mL de solución TBE (*Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 1 mM pH 8*). Se calentó hasta integrar completamente el soluto en el disolvente. Posteriormente, se agregaron 2 μ L de bromuro de etidio. Se dejó enfriar y el contenido se vació en la cámara electroforética. Se colocó el peine y se dejó gelificar durante 30 minutos. El gel se sumergió en solución TBE.

Se cargaron 10 μ L de muestra en cada pozo y se corrió a una intensidad de 85 V durante 30 minutos. Se utilizó el equipo de detección de fluorescencia para tomar la fotografía.

5.1.2 Eficiencia del entrecruzamiento en la cromatina fragmentada

La determinación del tiempo óptimo de entrecruzamiento es crucial para desarrollar con éxito la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Un exceso en el tiempo de entrecruzamiento daría lugar a una disminución en la cantidad de cromatina obtenida, mientras que un tiempo corto de exposición impediría detectar la asociación entre las proteínas (*Orlando, 2000*).

Para determinar el tiempo óptimo de entrecruzamiento, no sólo se consideró lo reportado en el extracto total, sino también lo observado en la fracción de cromatina. La adecuada obtención de esta fracción fue de suma importancia para los experimentos posteriores.

En la **figura 5.2** se observa la aparición del trímero de PCNA hasta la primera hora de tratamiento al utilizar el agente entrecruzante en la fracción de cromatina. A las 4 h de tratamiento se observa la desaparición del monómero de PCNA para formar el trímero, esto indica que el efecto del formaldehído fue tal, que la formación de enlaces covalentes a este tiempo fue suficiente para mantener íntegro al trímero de PCNA. Sin embargo, al considerar la cantidad de proteína obtenida en la fracción de cromatina a las 4 h de tratamiento (**tabla 5.1**), se demuestra que ésta resultó ser considerablemente menor al compararla con los tratamientos de menor duración, indicando que posiblemente PCNA también se asoció fuertemente a otros conglomerados celulares producto del entrecruzamiento, quedando alojada en otras fracciones durante el proceso de extracción de la cromatina. Por lo tanto, no fue posible utilizar las muestras de cromatina de este tiempo de entrecruzamiento debido a que la cantidad de proteína sería insuficiente para continuar con los experimentos posteriores.

Considerando lo anterior, se eligió a la muestra de 2 h de tratamiento con formaldehído como aquella con el tiempo óptimo de entrecruzamiento, ya que presentó evidencia de estabilidad de trímero y niveles adecuados de cantidad de proteína en la fracción de cromatina para poder continuar con los experimentos.

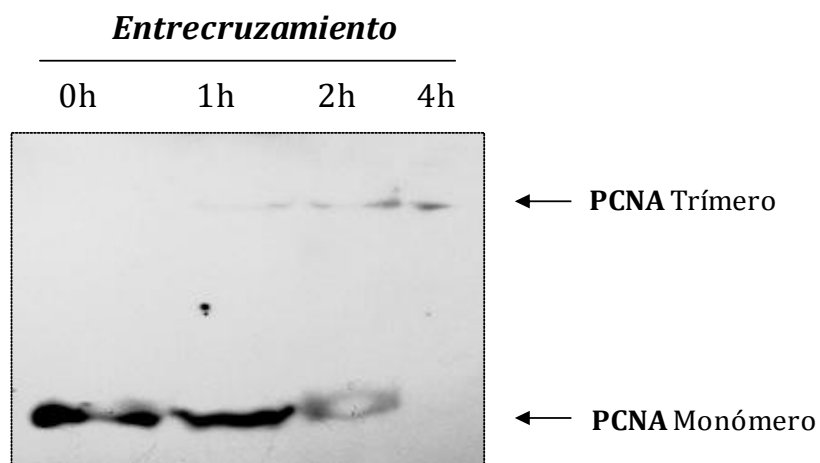


Figura 5.2 Efecto del formaldehído sobre PCNA en la fracción de cromatina fragmentada a diferentes tiempos de tratamiento. Inmunodetección de PCNA.

Tabla 5.1 Concentración de proteína en la fracción de cromatina fragmentada

TRATAMIENTO	Tiempo de tratamiento (Horas)	Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Control	0 h	3.87
Formaldehído 1%	1 h	2.47
Formaldehído 1%	2 h	2.10
Formaldehído 1%	4 h	0.18

5.1.3 Eficacia de la extracción de la cromatina

Para validar el proceso de extracción de la cromatina se realizó la inmunodetección de histona H3 en las fracciones celulares obtenidas, dicha proteína se ha utilizado como marcador nuclear específico de cromatina (Nagaki *et al.*, 2003; Ricke *et al.*, 2005).

En la **figura 5.3** se observa el efecto del formaldehído sobre la presencia de la proteína histona H3 en las fracciones celulares obtenidas por la metodología ChIP. En la muestra control, no entrecruzada, se distingue a la proteína histona H3 en la fracción de cromatina extraída (CF), pero también está presente en la fracción de citoplasma (S1); esto indica que durante el proceso de extracción de la cromatina una parte del material nuclear quedó alojado en la fracción citoplásmica. Sin embargo, en la muestra seleccionada con el tiempo óptimo de entrecruzamiento, se observa la ausencia de histona H3 en la fracción citoplásmica y una marcada presencia de ésta en la fracción de cromatina.

Lo anterior demuestra que, la formación de enlaces covalentes provenientes del tratamiento con formaldehído permitió estabilizar a las estructuras celulares “*in vivo*” antes de realizar el proceso de extracción de la cromatina, logrando que los elementos integrantes de la fracción de cromatina no se dissociaran hacia la fracción citoplásmica por las condiciones de extracción, y por lo tanto, poder obtener cromatina de alta calidad. De esta manera, la fracción citoplásmica quedó ausente de moléculas que pudieran pertenecer a la fracción nuclear. Estos resultados demuestran la eficacia del método para extraer a la cromatina.



Figura 5.3 Efecto del entrecruzamiento en la extracción de la cromatina. Inmunodetección de histona H3 en las fracciones celulares. Se utilizó la muestra con el tiempo óptimo de entrecruzamiento. ET (extracto total), CF (cromatina fragmentada), S1 (citoplasma).

5.1.4 Eficiencia de la reversión del entrecruzamiento

La aplicación de calor es uno de los métodos más usados para revertir complejos proteína-proteína y proteína-DNA formados por las bases de Schiff. La reversión del entrecruzamiento representa un punto crítico de la metodología ChIP. Los tiempos cortos de aplicación de calentamiento serían insuficientes para identificar las asociaciones de los complejos mencionados, mientras que los tiempos largos de tratamiento podrían degradar a las proteínas involucradas (*Niranjanakumari et al., 2002*).

Para determinar el tiempo óptimo de reversión del entrecruzamiento, se seleccionó a la muestra de extracto total con el tiempo óptimo de entrecruzamiento (muestra de 2 h de tratamiento con formaldehído 1%) y se llevó a una temperatura de 65°C a diferentes tiempos de exposición.

En la **figura 5.4** se observa que la desaparición completa del trímero para formar el monómero de PCNA ocurre a las 24 h de tratamiento con calor, tiempo en el cual se han revertido los enlaces formados por las bases de Schiff; por lo tanto, será posible identificar a las proteínas que en ese preciso momento estén interaccionando con PCNA.

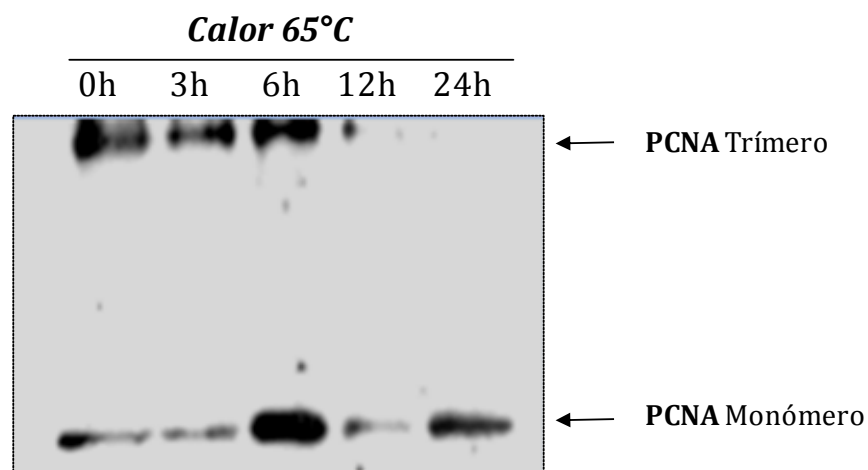


Figura 5.4 Efecto del calor sobre el trímero de PCNA a diferentes tiempos de tratamiento. Inmunodetección de PCNA. Muestras del extracto total con el tiempo óptimo de entrecruzamiento.

5.1.5 Eficacia de la fragmentación de la cromatina

Para poder llevar a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina es necesario que los fragmentos de DNA tengan un tamaño adecuado. Fragmentos de DNA de alto peso molecular impedirían que el anticuerpo inmunoprecipitara adecuadamente a su antígeno en la cromatina; por otro lado, para poder inmunoprecipitar al antígeno en fragmentos de DNA de bajo peso molecular, sería necesario utilizar grandes cantidades de cromatina. Dicho lo anterior, la fragmentación de la cromatina representa un punto crítico de la metodología ChIP (*Haring et al., 2007*).

Existen varios métodos para realizar la fragmentación de la cromatina, la acción enzimática es uno de los más efectivos. Para poder realizar esto, se utilizó la enzima nucleasa micrococcal derivada de *Staphylococcus aureus*. Esta enzima actúa como endo-exonucleasa, cortando inespecíficamente fragmentos de ácidos nucleicos de doble hebra. La adición del ion Ca^{2+} logra activar a la enzima durante un tiempo determinado, mientras que al agregar el agente quelante EGTA, la enzima detiene su actividad; esto permite controlar el proceso de fragmentación enzimática (*Heins et al., 1967*).

Para determinar la eficacia de la fragmentación enzimática debida a la nucleasa micrococcal, se extrajo el DNA de la cromatina proveniente de la muestra con el tiempo óptimo de entrecruzamiento y reversión (muestra de 2 h de tratamiento con formaldehído 1% y reversión a 65°C durante 24 h), para posteriormente ser corrido en un gel de agarosa.

En la **figura 5.5** se observan fragmentos de DNA de alto peso molecular de aproximadamente 12000 pares de bases (pb) en la fracción de cromatina intacta (CI), tanto en la muestra control, no entrecruzada, como en la muestra seleccionada con el tiempo óptimo de entrecruzamiento. Mientras tanto, en las muestras de cromatina fragmentada (CF) que tratadas con la nucleasa micrococcal se observa la desaparición de los fragmentos de DNA de alto peso molecular debido a la acción de la enzima, formando segmentos de ácidos nucleicos menores a 650 pb en la muestra entrecruzada.

El tamaño de los fragmentos de DNA producto de la acción enzimática resulta ser el adecuado para poder realizar los ensayos de inmunoprecipitación en la fracción de la cromatina fragmentada que ha sido entrecruzada, de acuerdo con las metodologías ya descritas (*Das et al., 2004; Aparicio et al., 2004; Haring et al., 2007*).

Al comparar la cromatina fragmentada de la muestra control, no entrecruzada, con la cromatina fragmentada de la muestra entrecruzada, se observa que el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos es mayor en esta última. Esto indica que el entrecruzamiento es capaz de proteger parcialmente a la cromatina de la acción enzimática. Esto es entendible, ya que la formación de enlaces covalentes debidos a las bases de Schiff permitieron estabilizar a los complejos proteína-DNA, logrando con esto la protección parcial del DNA durante la fragmentación enzimática (*Solomon & Varshavsky, 1985; Dedon et al., 1991*).

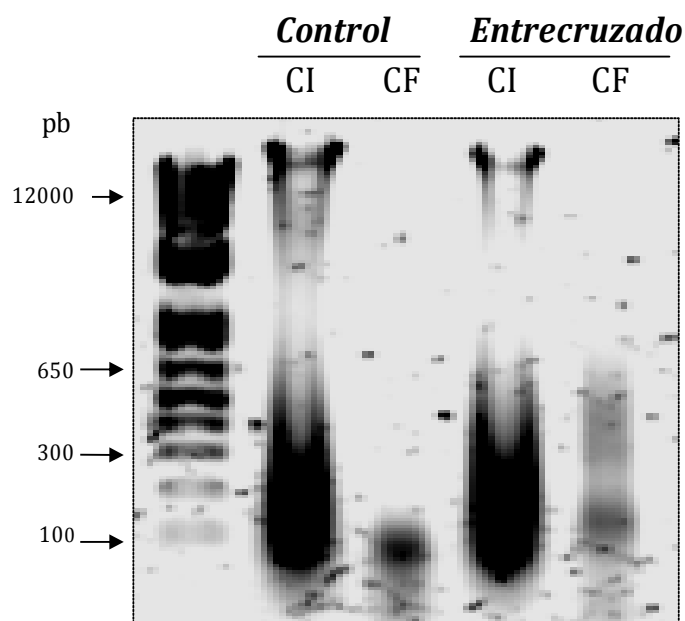


Figura 5.5 Eficacia de la fragmentación de la cromatina intacta utilizando nucleasa micrococcal de *Staphylococcus aureus*. Identificación de DNA en gel de agarosa. Muestra con el tiempo óptimo de entrecruzamiento y reversión. CI (cromatina intacta), CF (cromatina fragmentada).

5.1.6. Análisis de PCNA en las fracciones celulares

Hasta este momento se ha comprobado la adecuada extracción de la cromatina y de su fragmentación, así como la obtención de la fracción citoplásmica; además, se seleccionó la muestra con el tiempo óptimo de entrecruzamiento y se determinó el tiempo óptimo de reversión del mismo. Ahora es importante validar la metodología mediante la comprobación del efecto del agente entrecruzante y el proceso de reversión sobre PCNA en las fracciones celulares obtenidas.

En la **figura 5.6** se presenta el efecto del agente entrecruzante y del tratamiento con calor sobre la integridad de PCNA en las diferentes fracciones obtenidas por la metodología ChIP utilizando las condiciones óptimas establecidas.

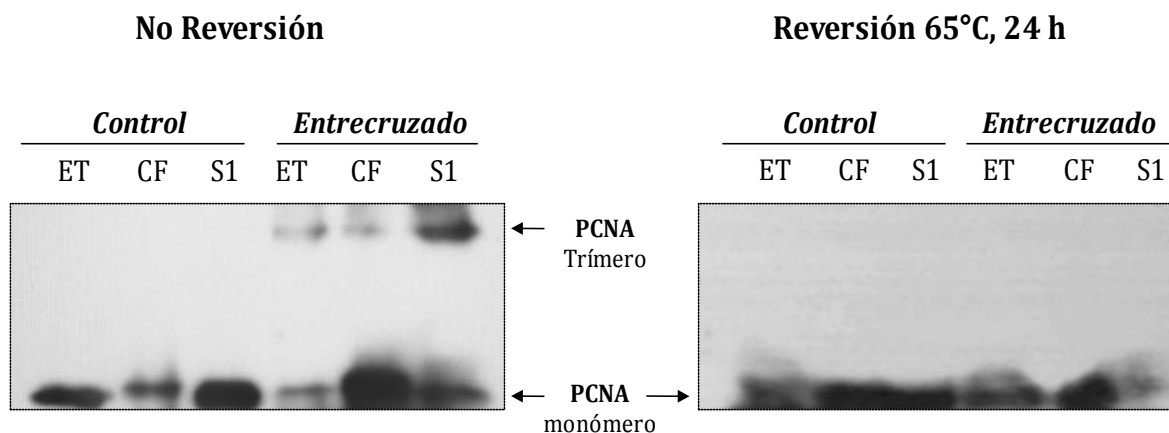


Figura 5.6 Efecto del entrecruzamiento y reversión sobre PCNA en las fracciones celulares. Inmunodetección de PCNA. Se utilizaron las condiciones óptimas de entrecruzamiento y reversión. ET (extracto total), CF (cromatina fragmentada), S1 (citoplasma).

En las muestras no revertidas se observa la presencia del trímero de PCNA únicamente en las fracciones celulares entrecruzadas: fracción de cromatina fragmentada (CF), fracción citoplásmica (S1) y extracto total (ET); mientras que en la muestra control, no entrecruzada, únicamente se detecta el monómero de PCNA. Estos datos coinciden con lo descrito en las **figuras 5.1 y 5.2**, y confirma la eficacia del formaldehído como agente entrecruzante. La presencia de aminoácidos básicos como lisinas, argininas e histidinas en los puntos de contacto entre los monómeros del anillo de PCNA, son los responsables de la formación de las bases de Schiff por efecto del formaldehído, confirmando la presencia del trímero de PCNA en las células del eje embrionario de la semilla de maíz (*López et al., 1995; Metz et al., 2004*). Este efecto ya ha sido reportado en células de mamífero (*Naryznhy et al., 2005*) y en embriones de elote (*Becerril, 2007*).

En las muestras revertidas con calor se observa la disociación de los enlaces formados por las bases de Schiff en las fracciones celulares que se entrecruzaron previamente. En este caso, el trímero de PCNA se disoció para formar el respectivo monómero debido al tratamiento con calor durante 24 h. Este resultado coincide con lo observado en la **figura 5.3** previamente descrita.

Los resultados anteriores confirman la presencia del trímero y del monómero de PCNA tanto en la fracción de cromatina como en la fracción de citoplasma “*in vivo*”.

5.2 ETAPA 2: Ensayos de inmunoprecipitación

El establecimiento de las condiciones óptimas de la metodología ChIP permitió demostrar la presencia de PCNA en las fracciones celulares analizadas (cromatina fragmentada y fracción citoplásmica). Es posible que PCNA se encuentre interactuando con proteínas del ciclo celular en estas fracciones celulares. Para demostrar esto, es fundamental realizar ensayos de inmunoprecipitación en dichas fracciones utilizando el anticuerpo anti-PCNA. En esta etapa se determinará si finalmente las condiciones del entrecruzamiento y reversión son las adecuadas para poder observar la asociación de proteínas y DNA con PCNA.

Para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación en las fracciones celulares fue necesario incubar a las muestras con el anticuerpo anti-PCNA para propiciar la unión con el antígeno. Enseguida, estos complejos se precipitaron con la proteína A-agarosa, la cual se une con gran afinidad a la región Fc del anticuerpo, logrando aislar los complejos formados. Posteriormente, estos complejos se revirtieron a 65°C durante 24 h, para finalmente someterse a SDS-PAGE con el fin de separar a las posibles proteínas asociadas. La identificación se realizó mediante western blot utilizando los anticuerpos primarios anti-PCNA, anti-ciclina D4;2 y anti-CDKA, así como el anticuerpo secundario anti-IgG nativo.

En los experimentos de inmunoprecipitación se utilizó el anticuerpo anti-PCNA (sin muestra inmunoprecipitada) como control interno de inmunoprecipitación (IgG), indicando que la señal obtenida por el anticuerpo secundario anti-IgG nativo en el western blot, no se debía a reconocimiento inespecífico de los fragmentos de inmunoglobulina del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar, sino al anticuerpo primario utilizado en la inmunodetección.

5.2.1 Inmunoprecipitación de la cromatina

5.2.1.1 Inmunodetección de proteínas asociadas a PCNA

En la **figura 5.7** se distingue el efecto del entrecruzamiento con formaldehído sobre la estabilidad de los complejos proteicos co-inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-PCNA en la fracción de cromatina. Se observa la presencia del monómero de PCNA en los inmunoprecipitados (IP) de la fracción de cromatina fragmentada (CF) del tratamiento control y entrecruzado, demostrando la capacidad del anticuerpo anti-PCNA para unirse con gran afinidad a su antígeno y poder aislarlo del medio.

En este contexto, al aislar a PCNA se detecta la asociación con las proteínas CDKA y ciclina D4;2, dicha interacción sólo se logra mantener en las muestras que han sido entrecruzadas con formaldehído. Lo anterior, confirma que la formación de enlaces covalentes debidos a las bases de Schiff, las cuales se originaron por el agente entrecruzante, permite estabilizar a las proteínas asociadas a PCNA durante el procedimiento de extracción de la cromatina.

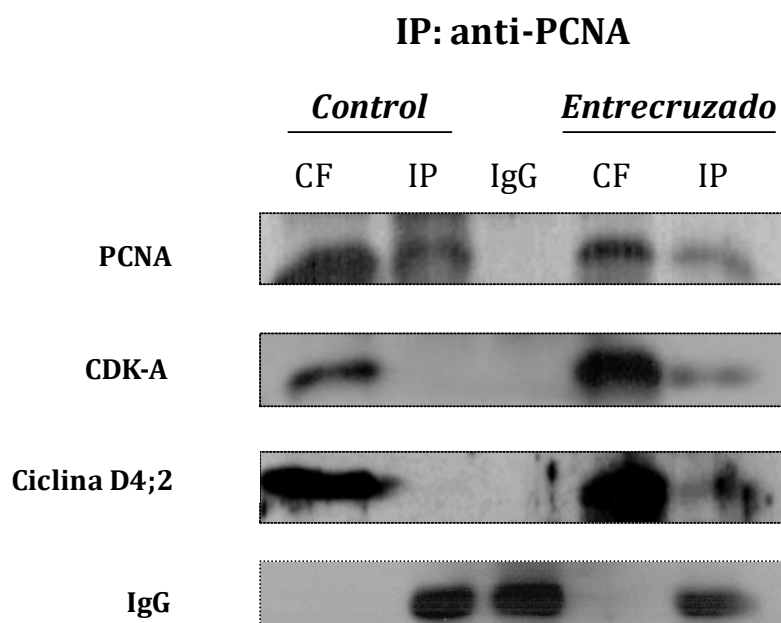


Figura 5.7 Inmunodetección de proteínas co-inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-PCNA en la fracción de cromatina. Inmunodetección de PCNA, CDKA y ciclina D4;2. Se utilizaron condiciones óptimas de entrecruzamiento y reversión. CF (cromatina fragmentada), IP (inmunoprecipitado), IgG (anticuerpo anti-PCNA).

El monómero de PCNA se identificó con un peso molecular de 30 KDa. Las proteínas CDKA y ciclina D4;2 se identificaron con un peso molecular de 34 y 41 KDa, respectivamente. La inmunoglobulina (IgG, cadena pesada) se identificó con un peso molecular de 50 KDa.

Con este ensayo se demuestra la efectividad del método de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para poder detectar proteínas asociadas a PCNA en la fracción de cromatina.

5.2.2.2 Detección de DNA asociado a PCNA

En el apartado anterior, se demostró la presencia de proteínas asociadas a PCNA en los inmunoprecipitados de la muestra de cromatina entrecruzada. Ahora, utilizando las mismas condiciones de inmunoprecipitación, se procederá a determinar la presencia de DNA en estos complejos proteicos.

Una vez que se aislaron los complejos con el anticuerpo anti-PCNA, estos se revirtieron con calor. Inmediatamente se trataron con proteinasa K para digerir a las proteínas presentes en la muestra. Finalmente, el DNA se extrajo utilizando cloroformo/fenol y precipitando con etanol.

En la **figura 5.8** se presentan los resultados de las muestras obtenidas una vez que los ácidos nucleicos se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Se observa la presencia de DNA en los inmunoprecipitados de PCNA tanto en la muestra control como en la entrecruzada. Lo anterior, indica que es posible detectar DNA en los inmunoprecipitados de PCNA en la fracción de cromatina fragmentada; sin embargo, los fragmentos de DNA del tamaño esperado (<650 pb) sólo están presentes en la muestra que entrecruzada.

En este punto, se ha demostrado la asociación de PCNA con el DNA *“in vivo”*. Aunque la detección de DNA en los inmunoprecipitados coincide tanto en la muestra control como en la muestra entrecruzada al ser comparadas entre sí, es de relevancia señalar que la formación del complejo (DNA/PCNA/CDKA/ciclina D4;2) solo se presenta en las muestras de cromatina fragmentada que recibieron el tratamiento con formaldehído. Es importante mencionar que esta interacción se presenta en las muestras de ejes embrionarios de 24 h de germinación. Este ensayo demuestra la eficacia de la metodología ChIP y sirve como ejemplo para ser probado en otros tiempos de la germinación.

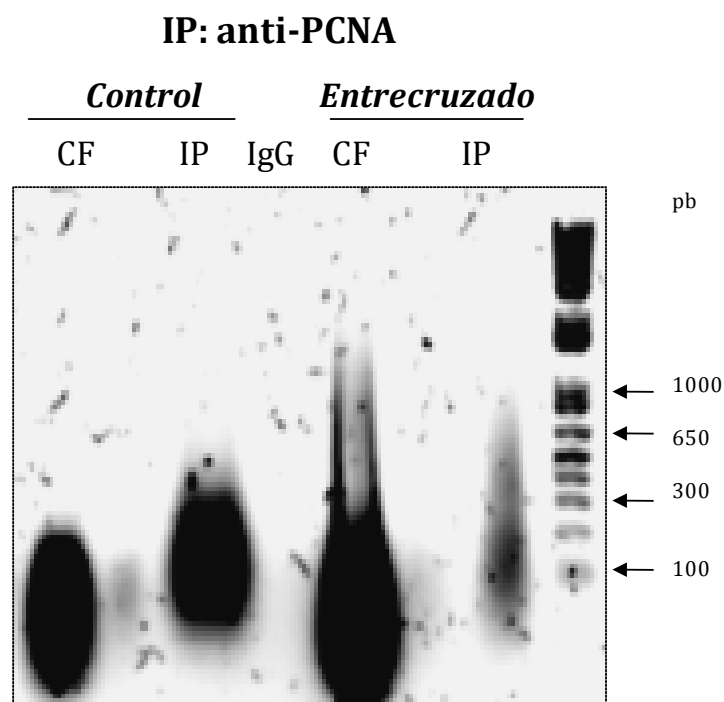


Figura 5.8 *Detección de DNA co-inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-PCNA en la fracción de cromatina. Electroforesis en gel de agarosa para la detección de DNA. Se utilizaron condiciones óptimas de entrecruzamiento y reversión. CF (cromatina fragmentada), IP (inmunoprecipitado), IgG (anticuerpo anti-PCNA).*

5.2.2 Inmunoprecipitación en la fracción citoplásmica

En la sección anterior se demostró la asociación de PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular en la fracción de cromatina. Para averiguar si ésta asociación se presenta también en la fracción de citoplasma, se procedió a realizar los ensayos de inmunoprecipitación en esta fracción celular. Dichos ensayos se realizaron con las mismas condiciones experimentales que los aplicados a la fracción de cromatina.

En la **figura 5.9** se observa que PCNA es capaz de ser inmunoprecipitado con el anticuerpo respectivo, pero no existe asociación con proteínas reguladoras del ciclo celular (CDKA y ciclina D4;2) en la fracción citoplásmica entrecruzada. Estas proteínas existen en la fracción de citoplasma pero no se asocian con PCNA; por lo menos, así sucede en los ejes embrionarios de 24 h de germinación.

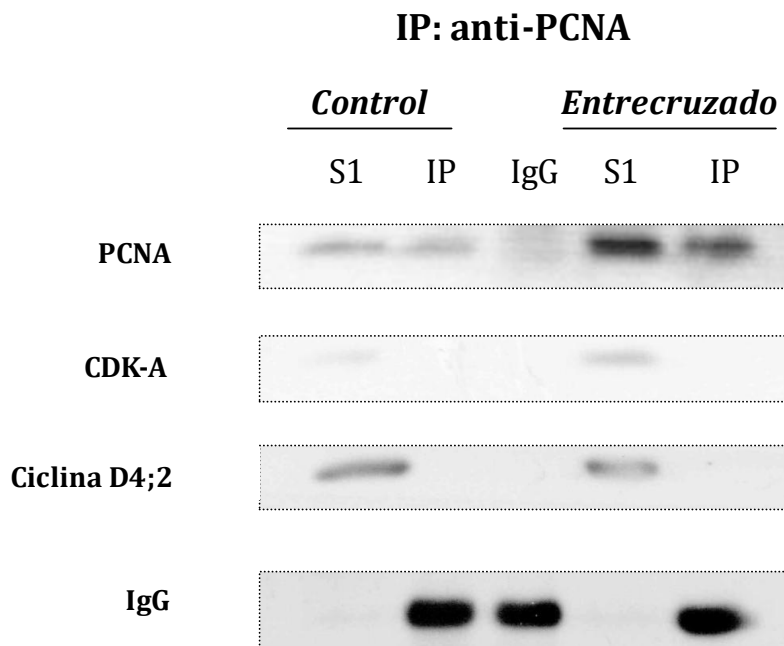


Figura 5.9 Inmunodetección de proteínas co-inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-PCNA en la fracción de citoplasma. Inmunodetección de PCNA, CDKA y ciclina D4;2. Se utilizaron condiciones óptimas de entrecruzamiento y reversión. S1 (citoplasma), IP (inmunoprecipitado), IgG (anticuerpo anti-PCNA).

5.3 Condiciones experimentales óptimas de la metodología ChIP

Todos los resultados obtenidos hasta el momento tienden a confirmar la eficacia de la metodología ChIP para obtener fracciones celulares de alta calidad y posteriormente detectar la asociación de PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular y DNA.

En la **tabla 5.2** se presentan las condiciones experimentales óptimas determinadas en las etapas 1 y 2 de este trabajo. En la etapa 1 se optimizó el proceso de extracción de la cromatina. Este resultó de vital importancia debido a que la muestra seleccionada posteriormente se utilizó para realizar los ensayos de inmunoprecipitación de la etapa 2. Es importante resaltar que estas condiciones experimentales se determinaron manteniendo un solo tiempo de germinación (24 h) y los resultados obtenidos reflejan el proceso fisiológico llevado a cabo en ese instante.

Tabla 5.2. *Condiciones experimentales óptimas de la metodología ChIP*

ETAPA 1 : EXTRACCIÓN DE LA CROMATINA	
Agente entrecruzante	Formaldehído 1%
Tiempo de entrecruzamiento	2 h
Agente de arresto del entrecruzamiento	Glicina 0.2 M
Método de reversión del entrecruzamiento	Calor 65°C
Tiempo de reversión del entrecruzamiento	24 h
Método de fragmentación de la cromatina	Nucleasa micrococcal
ETAPA 2: ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN	
Anticuerpo de inmunoprecipitación	5 µL de anticuerpo anti-PCNA
Condiciones de incubación	500 µL solución IP, 12 h, 4°C
Agente de captura de inmunocomplejos	20 µL de proteína A-agarosa

5.4 ETAPA 3: Inmunoprecipitación en las fracciones celulares durante la germinación de maíz

La detección de nuevas interacciones proteína-proteína y proteína-DNA, y su identificación en tiempo, espacio y relevancia funcional dentro del amplio contexto celular, ha sido uno de los principales retos en la investigación científica. La evaluación de estas interacciones nos permite entender el funcionamiento de los sistemas biológicos. A pesar de que varios genomas se han secuenciado, la relevancia y función de las proteínas tiene que determinarse aún (*Howell et al., 2006*).

Para conocer si PCNA forma complejos con proteínas reguladoras del ciclo celular y el DNA a lo largo de la germinación de los ejes embrionarios de maíz, desde la entrada de agua hasta las 24 h de imbibición, se aplicó la metodología ChIP optimizada con el fin de detectar dichas interacciones, tanto en la fracción de cromatina como en la fracción de citoplasma. Lo anterior, sentará las bases para discernir acerca de la función fisiológica de estas interacciones durante la germinación de maíz.

5.4.1 Proteínas del ciclo celular durante la germinación de maíz

Antes de comenzar con los ensayos de inmunoprecipitación de la etapa 3, fue necesario llevar a cabo la identificación de las proteínas de interés en las fracciones celulares durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Para ello se utilizaron ejes embrionarios, los cuales se germinaron por 0, 6, 12 y 24 h.

Las muestras se obtuvieron a partir de ejes embrionarios expuestos con formaldehído durante el tiempo óptimo de entrecruzamiento; enseguida se obtuvieron las fracciones celulares respectivas (cromatina y citoplasma), incluyendo un control de extracto total; posteriormente éstas se revirtieron durante el tiempo óptimo de reversión del entrecruzamiento; finalmente las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se realizó el western blot con el anticuerpo respectivo.

En la **figura 5.10** se presenta la inmunodetección de las proteínas de interés (CDKA, ciclina D4;2 y PCNA) en las fracciones de cromatina, citoplasma y extracto total, durante la germinación de maíz. Como control de cargado se seleccionó una banda de proteína teñida con rojo de Ponceau que no presentó variación de sus niveles durante los tiempos de germinación seleccionados.

En las **figuras 5.11, 5.12 y 5.13** se presentan las gráficas de las densitometrías de los western blot realizados en este experimento. El nivel de estas proteínas se normalizó con respecto al control de cargado y considerando el valor promedio de 3 réplicas. Se incluyó la desviación estándar de las repeticiones experimentales.

Mediante este experimento se logró determinar el comportamiento de cada una de estas proteínas en las fracciones celulares durante la germinación de maíz. De esta manera, se tiene un control que permite hacer aseveraciones particulares más concretas acerca de la forma en la que estas proteínas se acumulan en los compartimentos subcelulares durante el evento fisiológico que se estudia.

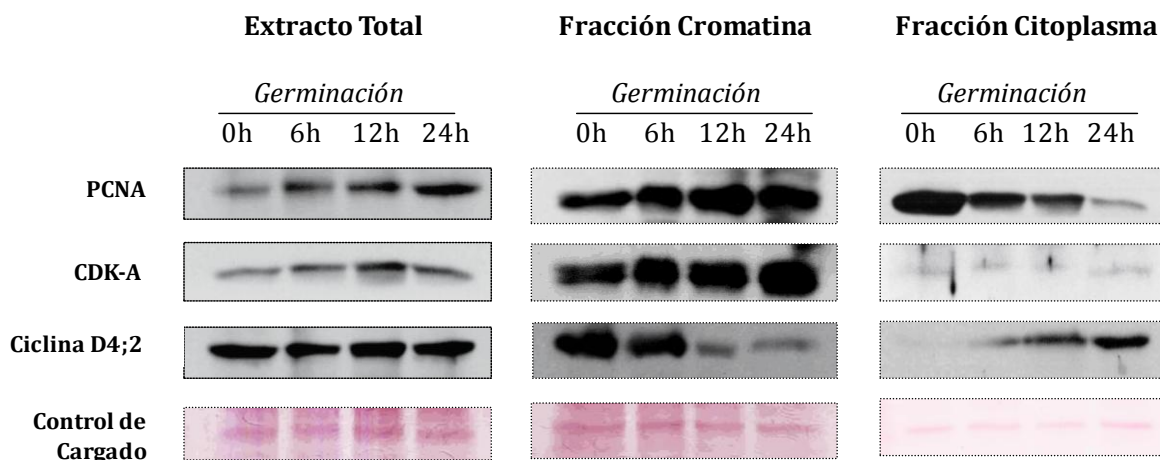


Figura 5.10 *Inmunodetección de las proteínas del ciclo celular en las fracciones celulares durante la germinación de maíz. Las muestras se entrecruzaron y revirtieron de acuerdo a las condiciones óptimas ChIP.*

5.4.1.1 PCNA durante la germinación de maíz

En la **figura 5.11** se observa un incremento en los niveles de proteína de PCNA en los extractos totales conforme avanza el tiempo de germinación. Sin embargo, este incremento es más significativo en la fracción de cromatina, en donde PCNA está presente en bajos niveles en los ejes embrionarios de la semilla de maíz seca, y aumenta considerablemente hasta alcanzar un máximo después de las 12 h de germinación. Dado que PCNA se ha utilizado como marcador específico de proliferación celular (*Citterio et al., 1992; Onelli et al., 1997*), estos resultados sugieren que la proliferación de las células es necesaria durante la germinación de las semillas, por lo que se requerirá de la síntesis de PCNA.

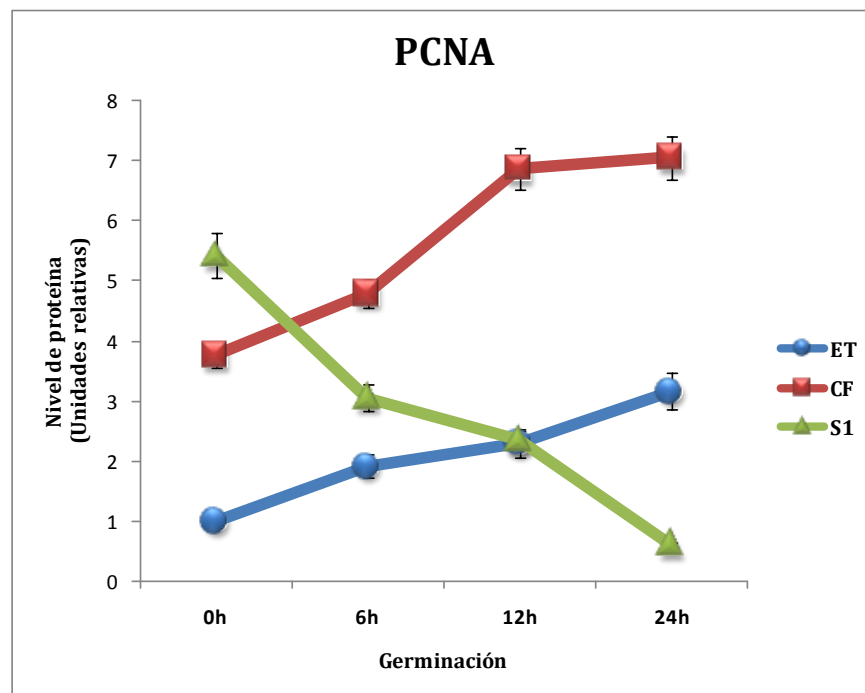


Figura 5.11 Niveles de proteína de PCNA en las fracciones celulares durante la germinación de maíz. Gráficas de densitometría. Los valores promedio se normalizaron con respecto al control de cargado ($n=3$). ET (extracto total), CF (cromatina fragmentada), S1 (citoplasma).

El período de máxima acumulación de PCNA en cromatina, después de las 12 h de germinación, coincide con el tiempo en el cual se ha reportado que la replicación del DNA se está llevando a cabo en los tejidos meristemáticos (*Baíza et al., 1989; Reyes-Jiménez et al., 1991*), lo que indica que la mayoría de las células han salido de la fase G1 y entrado a la fase S del ciclo celular, en donde la presencia de PCNA es indispensable para llevar a cabo la replicación del material genético. En células de animales, se ha demostrado que PCNA está presente en bajos niveles en células quiescentes y en altos niveles en células proliferantes, hasta alcanzar un pico durante la fase S del ciclo celular (*Morris & Mathews, 1989*).

Este resultado correlaciona con estudios previos en maíz, en donde además, se ha observado que la presencia de fitohormonas como benziladenina acelera el proceso germinativo, incrementando la cantidad de PCNA en extractos totales en las primeras 6 h después de la imbibición (*Herrera et al., 2000; Sánchez et al., 2004*). De esta manera, el incremento en los niveles de proteína de PCNA a partir de la imbibición del eje embrionario sustenta la idea de que la reactivación del ciclo celular juega un rol fundamental en el establecimiento de la plántula.

Por otra parte, en la fracción de citoplasma se observa que los niveles de proteína de PCNA disminuyen considerablemente conforme progresa la germinación; mientras tanto, como ya se demostró anteriormente, los niveles de PCNA incrementan sustancialmente en cromatina. Esto hace suponer la existencia de un mecanismo en el cual PCNA es trasladado desde el citoplasma hacia el núcleo para ejercer su función durante la replicación del DNA. Este mecanismo ya se ha propuesto para explicar la localización subcelular de PCNA durante la progresión del ciclo celular en líneas celulares de carcinoma humano expuestas a hipoxia y en células animales (*Van Betteraey-Nikoleit et al., 2003; Naryzhny & Lee, 2004*).

5.4.1.2 CDKA durante la germinación de maíz

En la **figura 5.12** se observa que los niveles de proteína de CDKA en la fracción de citoplasma son mínimos, en una cantidad casi indetectable mediante western blot. En contraparte, los niveles de proteína de CDKA que se une a la cromatina son abundantes, incrementándose a medida que avanza el proceso germinativo. Complementando este escenario, no se observan cambios notables en los niveles de CDKA en los extractos totales durante el mismo proceso fisiológico. Lo anterior, refleja que la proteína CDKA se concentra principalmente dentro del núcleo de la célula asociado a la cromatina, incluso desde que forma parte de la semilla seca.

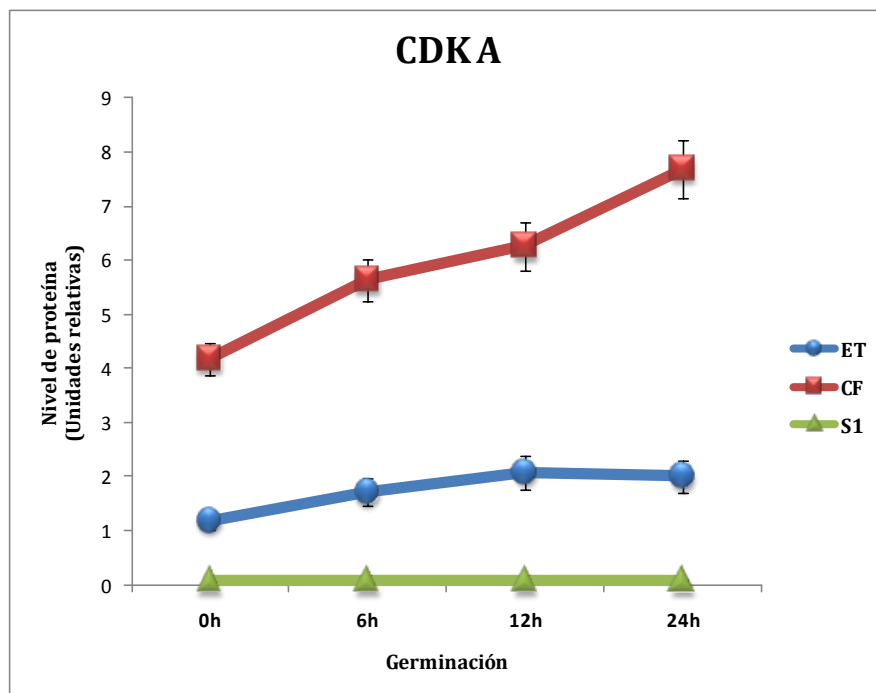


Figura 5.12 Niveles de proteína de CDKA en las fracciones celulares durante la germinación de maíz. Gráficas de densitometría. Los valores promedio se normalizaron con respecto al control de cargado ($n=3$). ET (extracto total), CF (cromatina fragmentada), S1 (citoplasma).

Esto sugiere que para mantener constantes los niveles totales de CDKA en la célula, una fracción de esta proteína se encontraría no asociada a la cromatina, posiblemente en el compartimento nucleoplásmico.

El incremento en los niveles de CDKA asociada a la cromatina abarca desde la entrada de agua en el eje embrionario hacia tiempos mayores de imbibición. En este contexto, se sugiere que CDKA participa a lo largo del ciclo celular interactuando con varios tipos de ciclinas. Estos complejos presentarían actividad sobre sus proteínas blanco, las cuales pudieran estar interactuando con el DNA. Esta interacción parece ser más relevante a tiempos en los que se estaría avanzando hacia la fase S del ciclo celular (*Reyes-Jiménez et al., 1991; Cruz-García et al., 1998*). Se sabe que CDKA se asocia a ciclinas tipo A y D, y que sus niveles de proteína en extractos totales son constantes durante todo el ciclo celular; particularmente, su actividad de cinasa se incrementa durante las transiciones G1/S y G2/M (*Joubés et al., 2000*).

Sólo es posible de proponer lo anterior, gracias a que las proteínas asociadas a la red de cromatina se mantuvieron en sus condiciones fisiológicas debido al efecto entrecruzante del formaldehído, lo cual permitió obtener a la cromatina correctamente durante el procedimiento de extracción y poder identificar a las proteínas por western blot.

5.4.1.3 Ciclina D4;2 durante la germinación de maíz

En la **figura 5.13** se comparan los niveles de proteína de ciclina D4;2 en los compartimentos subcelulares durante la germinación de maíz. Los niveles de proteína de ciclina D4;2 se mantienen constantes durante los tiempos de germinación estudiados en las muestras de extractos totales. A pesar de esto, se observa que los niveles de proteína de ciclina D4;2 disminuyen drásticamente a partir de las 12 h en la fracción de cromatina durante la germinación, mientras que en la fracción de citoplasma ocurre lo contrario.

Lo anterior indica que la ciclina D4;2 disminuye potencialmente su asociación a la cromatina en tiempos en los cuales se estaría entrando a la fase S del ciclo celular (Baíza et al., 1989).

El comportamiento observado de esta proteína entre la región nuclear y la región citoplásmica indica que se está llevando a cabo un transporte entre ambos compartimentos. La velocidad de este recambio parece ser igual en ambos sentidos, dando como resultado que la cantidad de proteína de ciclina D4;2 en los extractos totales se mantenga constante a lo largo del proceso germinativo. Lo anterior sugiere que los niveles de proteína ciclina D4;2 son regulados a nivel de compartimentalización subcelular.

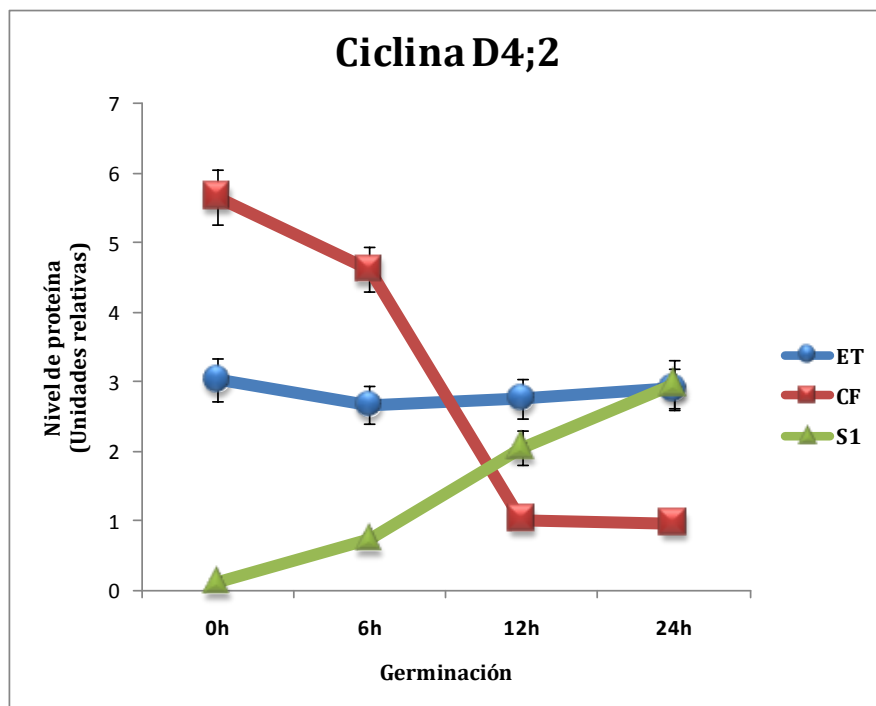


Figura 5.13 Niveles de proteína de ciclina D4;2 en las fracciones celulares durante la germinación de maíz. Gráficas de densitometría. Los valores promedio se normalizaron con respecto al control de cargado (n=3). ET (extracto total), CF (cromatina fragmentada), S1 (citoplasma).

5.4.2 Interacción de proteínas reguladoras del ciclo celular con PCNA durante la germinación de maíz

Para detectar la asociación de PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación correspondientes utilizando las condiciones óptimas de la metodología ChIP obtenidas durante las etapas 1 y 2 de este proyecto.

Los ejes embrionarios se embebieron durante los tiempos de 0, 6, 12 y 24 h; enseguida se entrecruzaron y posteriormente se obtuvieron las fracciones celulares de cromatina y citoplasma. Estas fracciones se incubaron con el anticuerpo anti-PCNA o anti-ciclina D4;2 como parte del proceso de inmunoprecipitación. Los complejos inmunes resultantes se aislaron e inmediatamente se llevó a cabo la reversión del entrecruzamiento. Las proteínas co-inmunoprecipitadas se detectaron mediante western blot, mientras que el DNA asociado a inmunoprecipitados de PCNA se aisló y se detectó en un gel de agarosa.

En la **figura 5.14** se presentan los western blots de las inmunoprecipitaciones realizadas. Se colocó un control de IgG que corresponde a la cadena pesada de las inmunoglobulinas utilizadas para inmunoprecipitar, con el propósito de demostrar que no existe variación en las cantidades de anticuerpo empleadas durante los distintos tratamientos. Además, se colocó un control de citoplasma de 24 h de germinación (S1) en las fracciones citoplásmicas, para demostrar que la ausencia de señal en estos inmunoprecipitados no se debía a problemas en el western blot sino a la falta de interacción entre las proteínas analizadas. En la **figura 5.16** se presentan las gráficas de las densitometrías obtenidas a partir de los western blots.

En la **figura 5.15** se presenta la detección del DNA co-inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-PCNA en la fracción de cromatina fragmentada durante la germinación de maíz. Se colocó un control de IgG que corresponde al anticuerpo anti-PCNA sin cromatina, sometido a las mismas condiciones de inmunoprecipitación que las otras muestras.

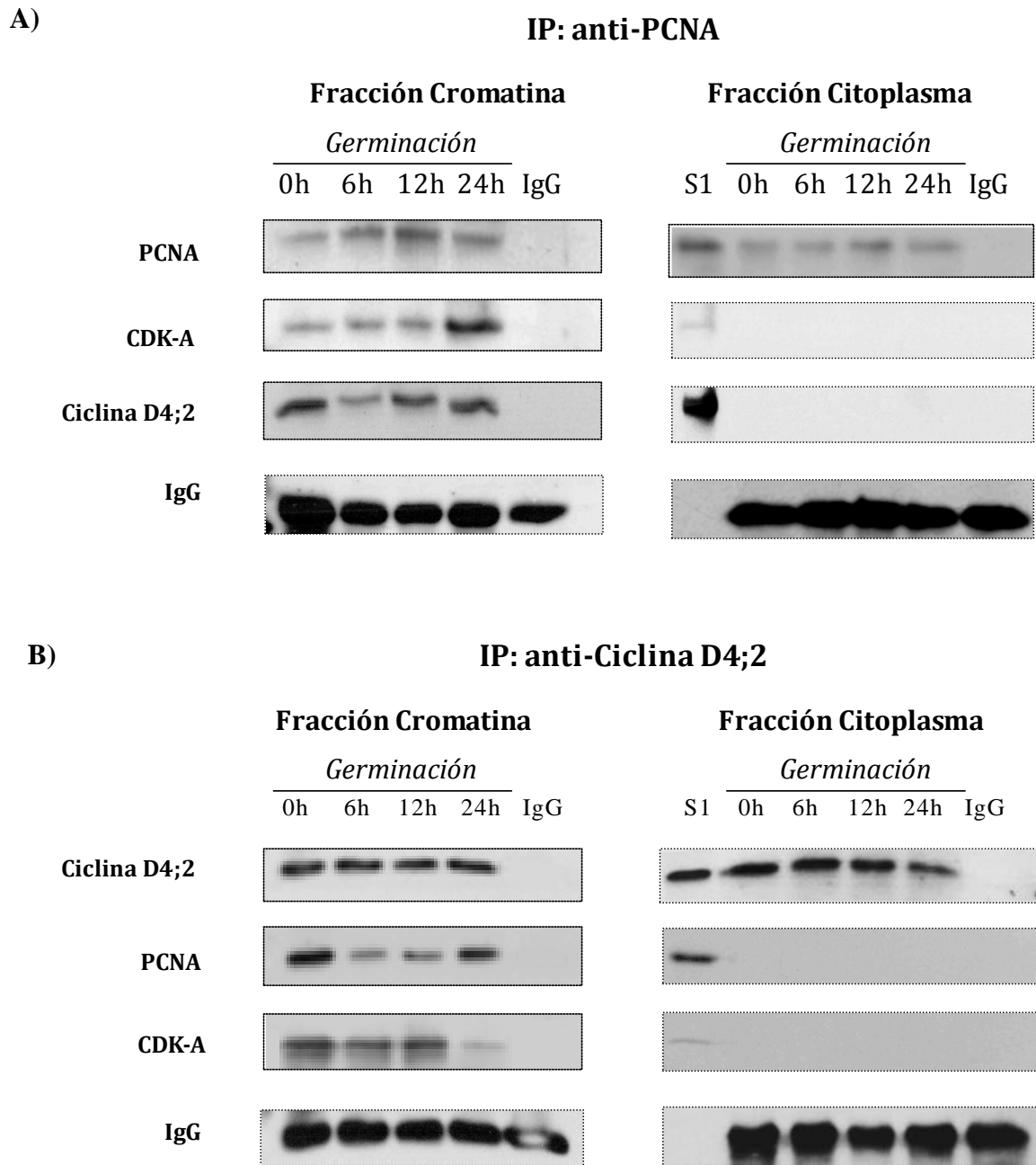


Figura 5.14 Inmunodetección de complejos proteicos inmunoprecipitados de las fracciones celulares durante la germinación de maíz. **A)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-PCNA de maíz; **B)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-ciclina D4;2 de maíz. Se aplicaron condiciones experimentales óptimas de la metodología ChIP. S1 (control de citoplasma de 24 h de germinación), IgG (anticuerpo).

5.4.2.1 PCNA, CDKA y ciclina D4;2 forman un complejo unido al DNA

En la **figura 5.14** se observa que no se forman asociaciones entre PCNA y las proteínas reguladoras del ciclo celular (CDKA y ciclina D4;2) en la fracción de citoplasma durante la progresión del proceso germinativo; tal como se demostró en la etapa 2 de este proyecto, esta asociación tampoco se presenta a tiempos mayores de la germinación. No obstante, se demuestra que la asociación entre estas proteínas se presenta únicamente en la fracción de cromatina.

Por otra parte, en la **figura 5.15** se demuestra la interacción directa de PCNA con el DNA en la fracción de cromatina a todos los tiempos del proceso de germinación estudiado, lo que indica que PCNA está anclado al DNA durante todas las fases del ciclo celular.

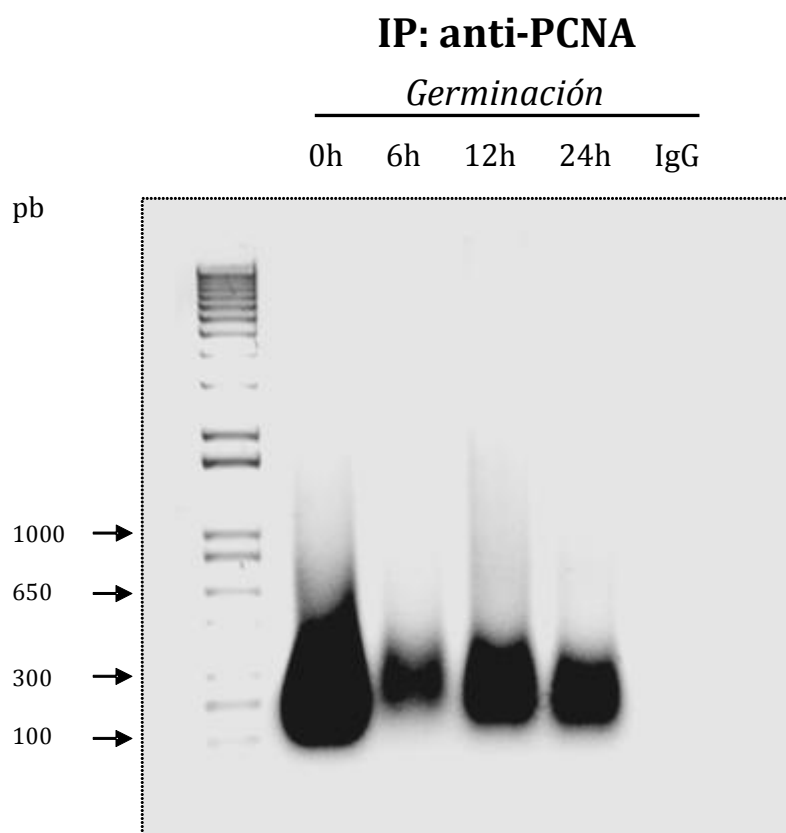


Figura 5.15 *Detección de DNA co-inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-PCNA en la fracción de cromatina durante la germinación de maíz. Electroforesis en gel de agarosa. Se aplicaron condiciones experimentales óptimas de la metodología ChIP. IgG (anticuerpo anti-PCNA).*

Lo anterior, sugiere que PCNA está anclada al DNA formando complejos con CDKA y ciclina D4;2 durante el proceso de germinación. Este resultado es de esperarse, ya que PCNA es una molécula importante en el metabolismo del DNA (*Strzalka & Ziemienowicz, 2010*) y la formación de estos complejos en el núcleo de la célula permitiría controlar procesos celulares relacionados con la regulación del ciclo celular.

En maíz, se ha descrito que PCNA co-inmunoprecipita con ciclina D4 y con una proteína tipo CDKA identificada con el anticuerpo anti-PSTAIRE (*Lara-Núñez et al., 2008*); dicha asociación se reveló utilizando extractos totales de ejes embrionarios de maíz. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo demuestran que la asociación ya descrita, se presenta únicamente en la fracción nuclear y que, además, estos complejos presentan interacción con el DNA.

A pesar de que en este trabajo se demuestra la formación del complejo DNA/PCNA/CDKA/ciclina D4;2 durante la germinación de maíz, no es posible determinar la manera en la que estas moléculas interactúan entre sí.

Los ensayos de inmunoprecipitación permiten conocer la asociación de forma global, pero se desconoce si PCNA interacciona directamente con la CDKA y/o la ciclina D4;2. Para conocer esto, se deben realizar ensayos "in vitro" de delección de mutantes. Este experimento consiste en producir fragmentos de regiones de aminoácidos de las proteínas de interés acopladas a un Tag de purificación; posteriormente, mediante cromatografía de afinidad se hacen interactuar dichos fragmentos y las interacciones se detectan por western blot. De esta manera se puede conocer que regiones de PCNA interaccionan directamente con CDKA y/o ciclina D4;2, o bien, si alguna de estas proteínas se asocia al complejo indirectamente.

Se sabe muy poco acerca de los complejos que forma PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular y la manera en la que estas interactúan. En células humanas, se ha demostrado que PCNA es capaz de formar complejos con diversos tipos de ciclinas y CDKs, además de p21 (*Xiong et al., 1992; Zhang et al., 1993; Loo et al., 1997*).

Por ejemplo, se ha descrito la interacción directa entre el extremo carboxilo de PCNA y CDK2 (*Koundrioukoff et al., 2000*), así como la unión directa entre ciclinas tipo D con las regiones amino y carboxilo de PCNA (*Matsuoka et al., 1994*). Estos complejos presentan actividad de cinasa sobre varios sustratos, por lo que se ha propuesto que PCNA podría funcionar como una molécula reclutadora de complejos ciclina/CDK capaces de fosforilar a sus proteínas blanco (*Koundrioukoff et al., 2000*). Para tratar de comprender la formación de estos complejos proteicos se han desarrollado modelos estructurales en donde se sugieren algunas de estas interacciones (*Kontopidis et al., 2005*), así como la manera en la que PCNA interactúa con el DNA (*Kochaniak et al., 2009; McNally et al., 2010*).

Por otra parte, en plantas como *Arabidopsis thaliana* se ha reportado la interacción de CDKA y ciclina D4 mediante ensayos de doble híbrido en levaduras y por complementación bimolecular fluorescente (*Van Leene et al., 2010a & 2010b*); mientras que en maíz se ha demostrado la asociación de las ciclinas D4, D2 y D5 con proteínas tipo CDKA, formando también complejos con PCNA (*Herrera et al., 2000; Sánchez et al., 2002 & 2004; Gómez-Roig & Vázquez-Ramos, 2003; Gutiérrez et al., 2005; Lara-Núñez et al., 2008*).

Dada la información anterior, es posible que los complejos CDKA/ciclina D4;2 se asocien directamente con PCNA, formando complejos ternarios en los cuales la ciclina D4;2 o CDKA interaccionarían indirectamente con PCNA; o quizá, tanto CDKA como ciclina D4;2 se unen directamente con ésta. Como ya se mencionó, esto sólo es posible de determinar mediante ensayos “*in vitro*” de delección de mutantes.

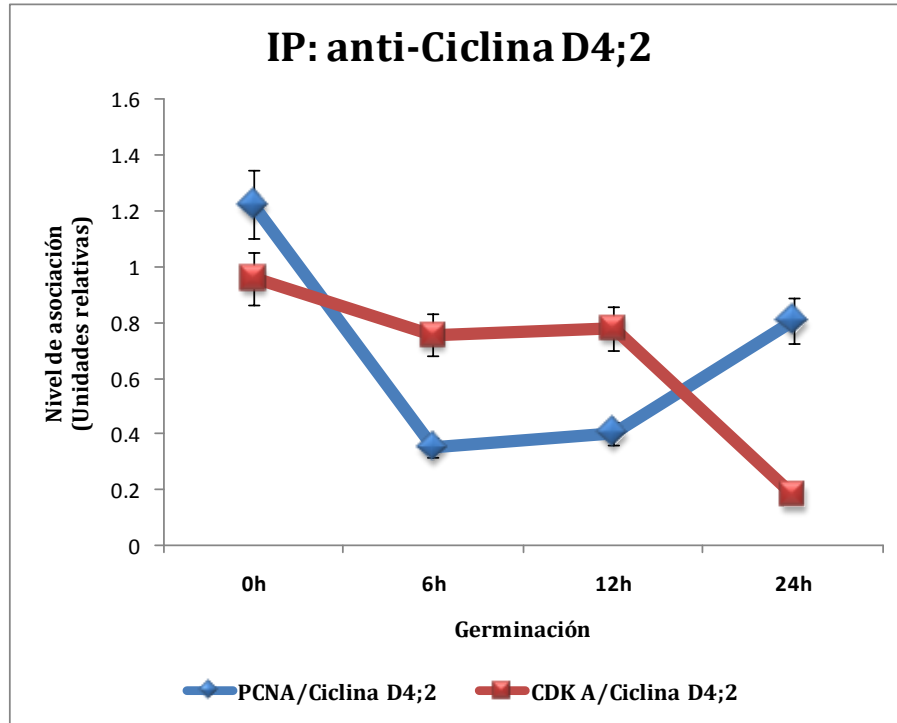
5.4.2.2 La asociación PCNA/CDKA/ciclina D4;2 varía durante el proceso germinativo

En los inmunoprecipitados de ciclina D4;2 (**Figura 5.14B**) se observa que tanto PCNA como CDKA se encuentran asociadas formando un complejo proteico exclusivamente en la fracción de cromatina; dicha interacción también logra observarse en los inmunoprecipitados de PCNA (**Figura 5.14A**). Esto hace evidente que tal asociación está involucrada en el control de procesos celulares que tiene como zona de mando a la región nuclear.

En la **figura 5.16** se presentan las gráficas de las densitometrías obtenidas a partir de los western blots referentes a la **figura 5.14**. El nivel de asociación se determinó al considerar la intensidad de la banda de la proteína asociada, normalizada con respecto a la intensidad de banda de la proteína inmunoprecipitada con el anticuerpo respectivo; de esta manera se obtuvo el valor promedio a partir del triplicado de cada tratamiento, incluyendo la desviación estándar en cada punto. En esta figura se presenta el nivel de asociación entre las proteínas co-inmunoprecipitadas, tanto con el anticuerpo anti-PCNA como con el anticuerpo anti-ciclina D4;2, observándose variaciones importantes en la formación de los complejos ternarios conforme avanza el proceso de germinación.

Tanto en los inmunoprecipitados de ciclina D4;2 como de PCNA se observa que la formación de complejos entre estas proteínas sigue el mismo patrón de asociación, de modo que se confirma que la interacción PCNA/ciclina D4;2 es consistente a lo largo del proceso germinativo. En las **figuras 5.16A y B** se observa que dicha asociación se incrementa a partir de las 6 h de imbibición, recuperando los niveles de asociación encontrados en la semilla seca (0 h).

A)



B)

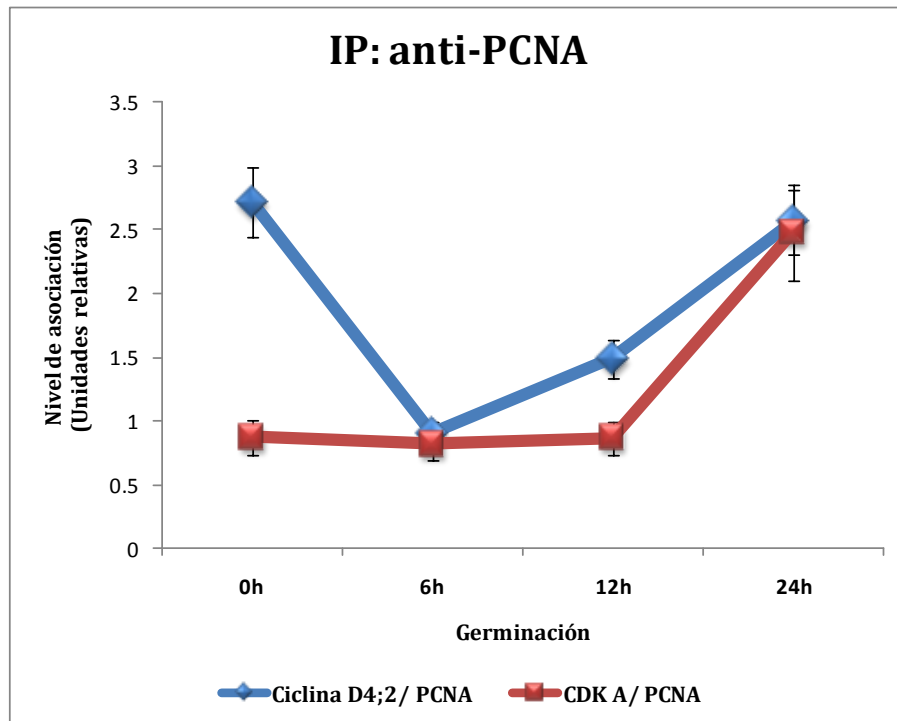


Figura 5.16 Nivel de asociación de las proteínas co-inmunoprecipitadas de la fracción de cromatina durante la germinación de maíz. **A)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-ciclina D4;2; **B)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-PCNA. Gráficas de densitometría referidas a los western blots de la figura 5.14. Los valores promedio se normalizaron con respecto a la proteína inmunoprecipitada directamente con el anticuerpo (n=3).

En los inmunoprecipitados de ciclina D4;2 (**figura 5.16A**) se aprecia que la formación de los complejos CDKA/ciclina D4;2 disminuye significativamente a las 24 h de imbibición; al mismo tiempo, los niveles de asociación del complejo PCNA/ciclina D4;2 se recuperan rápidamente. Por otra parte, en los inmunoprecipitados de PCNA (**figura 5.16B**) se observa que la asociación de CDKA/PCNA es constante hasta las 12 h de imbibición y a partir de éste tiempo la formación de complejos se incrementa de manera importante; mientras tanto, los niveles de la asociación ciclina D4;2/PCNA se recuperan al igual que en los inmunoprecipitados de ciclina D4;2.

El patrón de asociación observado en los complejos CDKA/ciclina D4;2 hacia las 24 h de germinación indica que a este tiempo un número importante de complejos se han disociado. A la fecha, se han descubierto 17 genes de ciclinas tipo D de maíz (*Datos del laboratorio no publicados*), es posible que la disociación del complejo CDKA/ciclina D4;2 a este tiempo se deba a que CDKA se estaría uniendo a otros tipos de ciclinas D de maíz o bien, a ciclinas que tienen que ver con la fase G2 y M del ciclo celular. Este comportamiento en el patrón de asociación del complejo CDKA/ciclina D4;2 ya se ha observado en extractos totales de maíz durante el mismo proceso fisiológico (*Godínez, 2010*).

Inmunoprecipitados de PCNA obtenidos de extractos totales de maíz han presentado una máxima actividad de cinasa sobre RBR, proteína implicada en la transición G1/S del ciclo celular, durante las primeras horas de la germinación; esta actividad de cinasa se asoció a proteínas tipo CDKA (*Sánchez et al., 2002 & 2004*) y posteriormente se demostró que proteínas como ciclina D4 podían acompañar a estos complejos (*Lara-Núñez et al., 2008*). En el presente trabajo, se observó que los complejos PCNA/CDKA/ciclina D4;2 se encuentran asociados al DNA en la fracción de cromatina; posiblemente, estos complejos presentan actividad de cinasa sobre RBR, lo que indicaría que PCNA funciona como una plataforma deslizante sobre el DNA que acarrea a los complejos CDKA/ciclina D hasta sus proteínas blanco como RBR. Lo anterior indicaría una nueva función para PCNA nunca antes descrita.

Para comprobar si PCNA interacciona con CDKA y ciclina D4;2 como una plataforma deslizante sobre el DNA capaz de fosforilar a RBR, sería necesario determinar la actividad de cinasa sobre RBR de los complejos mencionados en la fracción de cromatina. Otro experimento necesario para conferir esta función a PCNA incluye la determinación de la presencia de RBR y E2F en los inmunoprecipitados de PCNA en la misma fracción celular; así como demostrar la presencia de secuencias de DNA que reconoce el factor transcripcional E2F, el cual interactúa con RBR. Es posible de investigar esto gracias a que las condiciones experimentales de la metodología CHIP se han optimizado. Lo anterior, sentaría las bases para definir nuevas funciones a PCNA.

6. CONCLUSIONES

- Se logró optimizar las condiciones de la metodología CHIP. Estas fueron: el proceso de extracción de la cromatina y las condiciones de inmunoprecipitación en las fracciones celulares.

- Los niveles de las proteínas PCNA, CDKA y ciclina D4;2 varían tanto en la cromatina como en el citoplasma durante la progresión del proceso germinativo.

- El complejo proteico PCNA/CDKA/ciclina D4;2 se encuentra asociado al DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Este complejo proteico no se forma en el citoplasma.

- El nivel de asociación del complejo proteico PCNA/CDKA/ciclina D4;2 fluctúa conforme avanza el proceso de germinación.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar la identificación de RBR y E2F en los inmunoprecipitados de PCNA de la fracción de cromatina.

- Investigar la presencia de secuencias de DNA reconocidas por el factor transcripcional E2F en los inmunoprecipitados de PCNA de la fracción de cromatina.

- Llevar a cabo ensayos de actividad de cinasa sobre RBR en los inmunoprecipitados de la fracción de cromatina.

- Efectuar ensayos “*in vitro*” de delección de mutantes con fragmentos de PCNA, CDKA y ciclina D4;2.

- Implementar esta metodología para estudiar a otras proteínas reguladoras del ciclo celular en maíz como CDKB, ciclina A, ciclina D5, etc.

8. REFERENCIAS

- **Aparicio, O., Geisberg J.V., Struhl K.** (2004) Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr. Prot. Cell Biol.* **17**, 1-23.
- **Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M., Sánchez, J.E.** (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* **135**, 416-421.
- **Becerril, N.A.** (2007) Estandarización de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina aplicado al estudio de PCNA unido al DNA. *Tesis de Licenciatura de QFB. Facultad de Química, UNAM.* México.
- **Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A.** (2004) *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture.* New York: Food Products Press.
- **Berckmans, B., De Veylder, L.** (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 599-605.
- **Bewley, J.D.** (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- **Bewley, J.D., Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination.* Second Edition. New York: Plenum Press.
- **Black, M., Bewley, J.D., Halmer, P.** (2006) *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses.* UK: Cromwell Press.
- **Bowler, C., Benvenuto, G., Laflamme, P., Molino, D., Probst, A.V., Tariq, M., Paszkowski, J.** (2004) Chromatin techniques for plant cells. *Plant J.* **39**, 776-789.
- **Bowman, G.D., O'Donnell, M., Kuriyan, J.** (2004) Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**, 724-730.

-
- **Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
 - **Ciccone, D.N., Morshead, K.B., Oettinger, M.A.** (2004) Chromatin immunoprecipitation in the analysis of large chromatin domains across murine antigen receptor loci. *Meth. Enzym.* **376**, 334-348.
 - **Citterio, S., Sgorbati, S., Levi, M., Colombo, B.M., and Sparvoli, E.** (1992) PCNA and total nuclear protein content as marker of cell proliferation in pea tissue. *J. Cell Sci.* **102**, 71-78.
 - **Cloix, C., Jenkins, G.I.** (2008) Interaction of the Arabidopsis UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. *Molecular Plant* **1**, 118-128.
 - **Cox, L.S.** (1997) Who binds wins: competition for PCNA rings out cell-cycle changes. *Trends Cell Biol.* **7**, 493-498.
 - **Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J.J., Vázquez-Ramos, J.M.** (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* **102**, 573-581.
 - **Das, P.M., Ramachandran, K., vanWert, J., Singal, R.** (2004) Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* **37**, 961-969.
 - **De Veylder, L., Beeckman, T., Inzé, D.** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 655-665.
 - **De Veylder, L., Joubes, J., Inzé, D.** (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 536-543.
 - **Dedon, P.C., Soultis J.A., Allis C.D., Gorovsky M.A.** (1991) A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Anal. Biochem.* **197**, 83-90.

-
- **Dewitte, W., Murray, J.A.H.** (2003) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 235-264.
 - **Enciclopedia Estudiantil Hallazgos** (2001) *Semilla*. México: World Book Editores.
 - **FAO** (1993) *El maíz en la nutrición humana*. Italia: Colección FAO.
 - **FIRA** (2010) Maíz, 2010: Panorama agroalimentario. México. Boletín Informativo. Consulta abril 2010: www.fira.gob.mx.
 - **Francis, D.** (2007) The plant cell cycle, 15 years on. *New Phytologist* **174**, 261-278.
 - **Godínez, S.K.** (2010) Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación de maíz. *Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM*. México.
 - **Gómez-Roig, E., Vázquez-Ramos, J.M.** (2003) Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/CDK complex: effect of benzyladenine. *J. Plant Physiol.* **160**, 983-990.
 - **Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., Vázquez-Ramos, J.M.** (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol.* **46**, 166-173.
 - **Harashima, H., Shinmyo, A., Sekine, M.** (2007) Phosphorylation of threonine 161 in plant cyclin-dependent kinase A is required for cell division by activation of its associated kinase. *The Plant J.* **52**, 435-448.
 - **Haring, M., Offermann, S., Tanja, D., Horst, I., Peterhansel, C., Stam, M.** (2007) Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* **3**, 1-16.

-
- **Heins, J.N., Suriano, J.R., Taniuchi, H., Anfinson, C.B.** (1967) Characterization of a nuclease produced by *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **242**, 1016-1020.
 - **Herrera, I., Sánchez, M.P., Molina, J., Plasencia, J., Vázquez-Ramos, J.M.** (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* **110**, 127-134.
 - **Howell, J.M., Winstone, T.L., Coorsen, J.R., Turner, R.J.** (2006) An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins. *Proteomics* **6**, 1-20.
 - **Huntley, R.P., Murray J.A.H.** (1999) The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 440-446.
 - **Indiani, C., O'Donnell, M.** (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nature* **7**, 751-761.
 - **Inzé, D.** (2003) Why should we study the plant cell cycle? *J. Exp. Bot.* **54**, 1125-1126.
 - **Inzé, D.** (2005) Green light for the cell cycle. *EMBO J.* **24**, 657-662.
 - **Inzé, D., De Veylder, L.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 77-105.
 - **Jager, S.M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., Murray, J.A.H.** (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 385-396.
 - **Joubés, J., Chevalier, C. Duditsm D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., Renaudin, J.P.** (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 607-620.
 - **Kelman, K.** (1997) PCNA: structure, funtions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-640.

-
- **Kochaniak, A.B., Habuchi, S., Loparoj J. J., Chang, D.J., Cimprich, K.A., Walter, J.C., Van Oijen, A.M.** (2009) Proliferating cell nuclear antigen uses two distinct modes to move along DNA. *J. Biol. Chem.* **284**, 17700-17710.
 - **Kontipodis, G., Wu, S., Zheleva, D., Taylor, P., McInnes, C., Lane. D., Fischer, P., Walkinshaw, M.** (2005) Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 1871-1876.
 - **Koundrioukoff, S., Jónsson, Z., Hasan, S., De Jong, R., Van der Vliet, P., Hottiger, M., Hübscher, U.** (2000) A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and CDK2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 22882-22887.
 - **Kuo, M.H., Allis C.D.** (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**, 425-433.
 - **Lara-Núñez, A., De Jesús, N., Vázquez-Ramos, J.M.** (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol. Plant.* **132**, 79-88.
 - **Lee, H.R., Zhang, W., Langdon, T., Jin, W., Yan, H., Cheng, Z., Jiang, J.** (2005) Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oriza* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11793-11798.
 - **Loor, G., Zhang, S.J., Zhang, P., Toomey, N.L., Lee, M.** (1997) Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res.* **25**, 5041-5046.
 - **López, I., Khan, S., Vázquez-Ramos, J., Hussey, P.J.** (1995) Molecular cloning of a maize cDNA encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochim. et Biophys. Acta* **1260**, 119-121.

-
- **Maga, G., Hübscher, U.** (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**, 3051-3060.
 - **Matsuoka, S., Yamaguchi, M., Matsukage, A.** (1994) D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **269**, 11030-11036.
 - **McNally, R., Bowman, G.D., Goedken, E.R., O'Donnell, M., Kuriyan, J.** (2010) Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading. *BMC Structural Biol.* **10**, 1-14.
 - **Metz, B., Kersten, G.F.A., Hoogerhout, P., Brugghe, H.F., Timmermans, H.A.M., Jong, A., Meiring, H., Hove, T., Henninks, W.E., Crommelin, D.J.A., Jiskoot, W.** (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 6235-6243.
 - **Moldovan, G.L., Pfander, B., Jentsch, S.** (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**, 665-679.
 - **Morris, G.F., Mathews, M.B.** (1989) Regulation of proliferating cell nuclear antigen during cell cycle. *J. Biol. Chem.* **264**, 13856-13864.
 - **Nagaki, K., Talbert, P.B., Zhong, C.X., Dawe, R.K., Henikoff, S., Jiang, J.** (2003) Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. *Genetics* **163**, 1221-1225.
 - **Naryzhny, S.N., and Lee, H.** (2004). The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **279**, 20194-20199.
 - **Naryzhny, S.N., Zhao, H., Lee, H.** (2005) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *J. Biol. Chem.* **280**, 13888-13894.

-
- **Negre, N., Lavrov, S., Hennetin, J., Bellis, M., Cavalli, G.** (2006) Mapping the distribution of chromatin proteins by ChIP on ChIP. *Meth. Enzym.* **410**, 316-340.
 - **Niranjanakumari, S., Lasda, E., Brazas, R., García-Blanco, M.A.** (2002) Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods* **26**, 182-190.
 - **Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H.** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos. Trans. R. Soc. London B.* **357**, 749-760.
 - **Onelli, E., Citterio, S., O'Connor, J.E., Levi, M., Sgorbati.** (1997) Flow cytometry, sorting and immunocharacterization with proliferating cell nuclear antigen of cycling and non-cycling cells in synchronized pea root tips. *Planta* **202**, 188-195.
 - **Orlando, V.** (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-linked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 99.
 - **Paterson, A., Freeling, M., Sasaki, T.** (2005) Grains of knowledge: Genomics of model cereals. *Genome Res.* **15**, 1643-1650.
 - **Paunesku, T., Mittal, S., Protic, M., Oryhon, J., Korolev, V., Joachimiak, A., Woloschak, G.E.** (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 1007-1021.
 - **PUC** (2011) Pontificia Universidad Católica de Chile. www.puc.cl. Consulta enero 2011.
 - **Reyes-Castañeda, P.** (1990) *El maíz y su cultivo*. México: AGT Editores.
 - **Reyes-Jiménez, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A., Vázquez-Ramos, J.M.** (1991) Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating seeds. *Seed Sci. Res.* **1**, 113-117.

-
- **Ricke, R.M., Bielinsky A.J.** (2005) Easy detection of chromatin binding proteins by histone association assay. *Biol. Proced.* **7**, 60-69.
 - **Sánchez, M., Torres, M., Boniotti, M., Gutiérrez, C., Vázquez-Ramos, J.M.** (2002) PCNA protein associates to CDKA type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* **50**, 167-175.
 - **Sánchez, M.P., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J., Vázquez-Ramos, J.M.** (2004) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* **56**, 515-523.
 - **SEP** (1987) *El maíz, fundamento de la cultura popular mexicana*. Tercera Edición. México: García Valadés Editores.
 - **SIAP** (2009) Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. México. <http://w4.siap.gob.mx>. Consulta abril 2010
 - **Solomon, M.J., Varshavsky, A.** (1985) Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6470-6474.
 - **Stals, H., Inzé, D.** (2001) When plants cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* **6**, 359-364.
 - **Stoimenov, I., Helleday, T.** (2009) PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 605-613.
 - **Strzalka, W., Ziemienowicz, A.** (2010) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell regulation. *Ann. Botany* **1**, 1-14.
 - **Ulrich, H.E.** (2009) Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair* **8**, 461-469.

-
- **Van Betteraey-Nikoleit, M., Eisele, K.H., Stabenow, D., Probst, H.** (2003) Analyzing changes of chromatin-bound replication proteins occurring in response to and after release from a hypoxic block of replication initiation in T24 cells. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3880-3890.
 - **Van Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., Russinova, E., De Veylder, L.** (2010b) A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends Plant Sci.* Article in Press. doi:10.1016/j.tplants.2010.12.004.
 - **Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., De Jaeger, G.** (2010a) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 397.
 - **Vázquez-Ramos, J.M.** (2006) El ciclo celular: modelos animales y vegetales. *Mensaje bioquímico UNAM México* **1**, 57-75.
 - **Vázquez-Ramos, J.M., Lara-Núñez, A.** (2008) Cyclins D, phytohormones and cell cycle onset in germinating maize. *Plant Signal. Behav.* **3**, 578-579.
 - **Vázquez-Ramos, J.M., Sánchez, M.P.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* **13**, 113-130.
 - **Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., dePamphilis, C., Ma, H.** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* **135**, 1084-1099.

-
- **Wang, H., Tang, W., Zhu, C., Perry, S.E.** (2002) A chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach to isolate genes regulated by AGL15, a MADS domain protein that preferentially accumulates in embryos. *Plant J.* **32**, 831-843.
 - **Warbrick, E.** (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* **22**, 997-1006.
 - **Xiong, Y., Zhang, H., Beach, D.** (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505-514.
 - **Zhang, H., Xiong, Y., Beach, D.** (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol. Biol. Cell* **4**, 897-906.