



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

"EXPRESION DE FLOR 1, UNA PROTEINA CON MOTIVOS REPETIDOS  
RICOS EN LEUCINA, DURANTE EL DESARROLLO FLORAL DE  
ARABIDOPSIS THALIANA (PRODUCCION DE ANTICUERPOS  
POLICLONALES E INMUNOLocalIZACION)."

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**JULIO EMILIO PAEZ VALENCIA**



DIRECTOR DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN

2001



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: " Expresión de FLOR 1, una proteína con motivos repetidos ricos en leucina, durante el desarrollo floral de Arabidopsis thaliana (producción de anticuerpos policlonales e inmunolocalización)."

realizado por Julio Emilio Páez Valencia.

con número de cuenta 9756984-9 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. en C. Alicia Gamboa de Buen. *Alicia Gamboa de B.*

Propietario Dr. Pedro Francisco Valencia Mayoral.

Propietario Dr. en C. Luis Felipe Jiménez García. *Luis Felipe Jiménez García*

Suplente Dra. en C. María de Lourdes Segura Valdez. *María de Lourdes Segura Valdez*

Suplente Dra. en C. Lourdes Teresa Agredano Moreno. *Lourdes Teresa Agredano Moreno*

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
U.N.A.M.  
Consejo Departamental de Biología

*Patricia Ramos Mora*



Dra. Patricia Ramos Mora

**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA**

## ÍNDICE GENERAL

<b>Introducción</b>	1
<b>Objetivos</b>	2
<b>Hipótesis</b>	2
<b>Antecedentes</b>	
Origen y estructura de la flor de <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Mutaciones homeótcas en el desarrollo floral y el modelo ABC.	5
Genes MADS-box y el desarrollo de eucariontes	8
Estructura de las proteínas codificadas por genes MADS-box, interacciones y el modelo del cuarteto.	9
Regulación post-transcripcional de los factores de transcripción codificados por genes MADS-box.	12
Estructura y función de las proteínas LRR.	15
Especificidad de las proteínas LRRs.	16
Localización subcelular de las proteínas LRRs.	18
FLOR 1, LRR extracelular o intracelular.	20
<b>Material y Métodos</b>	
Descripción de la anatomía y desarrollo del estambre de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	22
Descripción de la formación de la pared de la antera y microesporogénesis de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	23
Descripción de la anatomía y desarrollo del carpelo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	24
Producción de anticuerpos policlonales e inmunolocalización.	25
Esquema general de la producción de anticuerpos policlonales e inmunolocalización de FLOR 1 en diferentes etapas del desarrollo floral de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	27
<b>Resultados.</b>	
Caracterización del anticuerpo policlonal contra FLOR 1	28
Titulación y pruebas de reactividad cruzada del anticuerpo contra la proteína FLOR1.	29
Inmunolocalización de FLOR 1 en diferentes etapas del desarrollo floral.	30
Localización de FLOR 1 durante estadios tempranos del desarrollo floral.	36
Localización de FLOR 1 durante la formación de la pared de la antera y desarrollo del microgametofito.	36
Localización de FLOR 1 en tejidos específicos del carpelo.	37
<b>Discusión.</b>	
Regulación de la expresión genética de FLOR 1 (coincidencia espacial y temporal del RNAm y la proteína en diferentes tipos celulares).	39
Posibles escenarios de interacción entre AGAMOUS y FLOR <i>in planta</i> .	42
FLOR 1 extracelular o intracelular?	43
<b>Conclusiones.</b>	46

## **Apéndices**

Apéndice 1 (Purificación de FLOR 1)	47
Apéndice 2 (Procesamiento de las bandas de geles de acrilamida)	48
Apéndice 3 (Protocolo rutinario de inmunización de conejos por vía escapular)	49
Apéndice 4 (Desangramiento del conejo, preparación y almacenamiento del suero)	50
Apéndice 5 (Purificación de las inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio)	51
Apéndice 6 (Titulación del anticuerpo por dot-blot, pruebas de reactividad cruzada por Western-blotting, Inmunodetección empleando el sistema ECL)	52
Apéndice 7 (Fijación e inclusión de tejido vegetal en parafina)	55
Apéndice 8 (Inmunohistoquímica empleando el sistema de detección ABC [DAKO])	56

## **Bibliografía.**

57

+

## Introducción.

La organogénesis floral de *Arabidopsis thaliana* está determinada por cinco genes homeóticos, cuatro de los cuales pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box. Estos factores de transcripción desempeñan una gran cantidad de funciones relacionadas con el desarrollo y transducción de señales en diversos linajes eucariontes, como la diferenciación del músculo cardíaco, sistema nervioso, activación de la etapa lítica del virus Epstein Barr en mamíferos, y en plantas son responsables de eventos morfogenéticos de la flor, hoja, raíz, semilla, etc. Todos estos genes presentan una región denominada caja MADS que codifica para un dominio involucrado en la unión a secuencias específicas del DNA (cajas C A r G) y en la formación de dímeros. Nosotros estamos interesados en la regulación post-transcripcional de las proteínas codificadas por uno de ellos, *AGAMOUS* que es responsable de la determinación del meristemo floral y de la formación de estambres y carpelos en flores de *Arabidopsis thaliana*. Derivado de la secuencia MADS de *AGAMOUS* se sintetizó un decapeptido (TTNRQVTFCK) que presenta una secuencia reconocida por proteínas cinasas (RXXT) y proteínas fosfatasas (RXVXT). A partir de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* se purificaron dos proteínas de 38 kDa y 29 kDa. La secuencia de dos oligopéptidos resultantes de los mapas trípticos de cada una de las proteínas revelaron que la de 38 kDa es una proteína con motivos repetidos ricos en leucina (LRR) específica de flor y la de 29 kDa es una proteína descrita como de almacenamiento vegetativo (VSP, vegetative storage protein) específica de carpelos. Las proteínas LRR (leucine rich repeat) han sido descritas como necesarias en las interacciones proteína-proteína, como receptores de membrana, translocadores de factores de transcripción y en el caso de plantas como proteínas de defensa contra patógenos (PGIP) y proteínas involucradas en el desarrollo (*CLAVATA* y *ERECTA*). Para comprobar la interacción *in vitro* entre FLOR 1 y *AGAMOUS* se realizaron ensayos adicionales : coimmunoprecipitación e interacción de FLOR 1 recombinante con *AGAMOUS*. Por otro lado la posibilidad de una interacción *in vivo* implica que ambas proteínas deben coexistir en el espacio y en el tiempo, dicha coincidencia puede ser corroborada con técnicas inmunohistoquímicas.

### **Objetivos:**

- a) Producir anticuerpos policlonales en conejo contra la proteína FLOR 1.
- b) Titular el anticuerpo empleando proteína purificada por medio de la columna de afinidad que posee un decapeptido inmovilizado derivado del dominio MADS de AGAMOUS.
- c) Medir la especificidad del anticuerpo por Western blotting empleando extracto crudo de proteínas de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* y proteína recombinante expresada en bacteria (tanto extracto crudo como purificada de columnas de NiNta).
- d) Inmunolocalizar a FLOR 1 en diferentes estructuras a lo largo del desarrollo floral.
- e) Comparar los patrones del mRNA de *FLOR 1* con la proteína.
- f) Comparar los patrones de expresión de *AGAMOUS* con los de FLOR 1.
- g) Determinar de manera preliminar su compartimentalización subcelular.

### **Hipótesis.**

FLOR 1 tiene la capacidad de generar anticuerpos policlonales en conejo capaces de reconocer una banda de proteína de aproximadamente 38 KD en extractos crudos de flores de *Arabidopsis thaliana*, en el caso de reconocer más de una banda es posible que diferentes proteínas del extracto posean epítopos compartidos con FLOR 1, si no, los epítopos son específicos de la proteína en cuestión.

Al ser específico el anticuerpo FLOR 1 puede ser localizada en los tipos celulares donde se expresa su mensajero.

Si FLOR 1 realmente interacciona con AGAMOUS, debemos encontrar a la proteína donde se localiza AGAMOUS, esto es en el merismo floral ( la región del domo de la antera que da origen al tercer y cuarto verticilo), primordios de estambres y carpelos, y tejidos específicos del tercer y cuarto verticilio.

Los factores de transcripción y sus interactores solo pueden coincidir en citoplasma o núcleo, por lo que FLOR 1 se debe de localizar en cualquiera de estos dos compartimentos celulares si realmente interacciona con AGAMOUS en alguna de las etapas del desarrollo floral:

## **Antecedentes.**

### **Origen y estructura de la flor de *Arabidopsis thaliana*.**

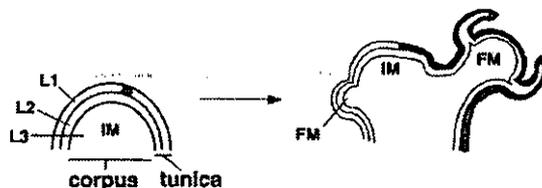
El desarrollo de las angiospermas depende de la actividad de dos meristemas, el meristemo de la raíz y el meristemo apical, que se ubican en las terminaciones opuestas del embrión de la planta ( Brand et al 2000). Las principales funciones del meristemo apical son iniciar la formación de órganos laterales, como hojas y flores y perpetuarse por sí mismo para el mantenimiento de una población de células indiferenciadas y llevar a cabo un programa específico de desarrollo (Sundaresan & Colasanti, 2000).

En *Arabidopsis thaliana*, como en muchas otras dicotiledoneas, el meristemo apical está formado por un grupo de células que forman un domo cubierto y protegido por hojas. Este tipo de células parece ser bastante homogéneo pero está organizado en regiones con diferentes funciones y destino. En el primer nivel de organización, las células están ordenadas en una capa llamada túnica y una capa interior llamada corpus. En algunas especies la túnica solo son dos capas L1 y L2 (layer 1, layer 2) ( Steeves 1989; Lenhard & Laux 1999; Bowman & Eshed 2000; Vaughanes, 1952). Las divisiones celulares dentro de las capas son anticlinales, es decir, que las paredes celulares nuevas se forman perpendicularmente a la superficie del meristemo. La progenie de las células de la capa L1 se mantendrá en esta etapa meristemática y eventualmente puede diferenciarse en una célula epidérmica. Las células de la L2 formarán una capa de células subepidérmicas y los gametos. Debajo de la túnica, las divisiones celulares no están orientadas y el corpus o L3 dará origen a la médula y al sistema vascular (Irish, 1991).

En un segundo nivel de organización, el meristemo apical, puede dividirse en una zona central y una zona periférica. Estas zonas contienen células pertenecientes a las tres capas clonales y difieren en sus tasas de división: las divisiones son poco frecuentes en la zona central y son frecuentes en la zona (Steeves, 1989). La zona central contiene un reservorio de células germinales pluripotenciales que servirán como fuente de nuevas células. Todos los apéndices incluyendo las hojas, y los nuevos meristemas que darán origen a las flores, están formados exclusivamente de células de la zona periférica. Se han descrito otras diferencias del meristemo basadas en la citología, los patrones de expresión de genes marcadores (Zondlo & Irish, 1999) y los potenciales de membrana (Rinne & van der Shoot, 1999).

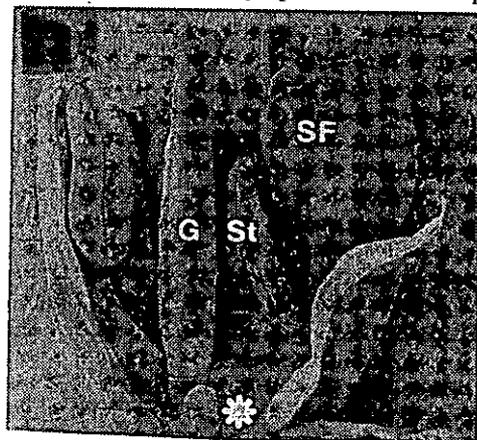
La vida de las plantas está dividida en una fase vegetativa y una fase reproductiva. El meristemo apical inicia estructuras como las hojas durante el

crecimiento vegetativo y las flores e inflorescencias durante la fase reproductiva. Cuando las plantas entran en una etapa crítica, las señales ambientales activan el desarrollo floral y el meristemo apical inicia la formación de los primordios de hojas y meristemas florales. En muchas especies de angiospermas la transición del meristemo floral tiene lugar en dos pasos: primero el meristemo apical cambia su programa de desarrollo y genera un meristemo inflorescente que después da origen a un meristemo floral determinado, a partir del cual se forma las flores ( Theissen & Seadler, 1999).



**Fig.1 Estructura del meristemo inflorescente (IM), donde después de la proliferación celular, surge un meristemo floral del la región que flanquea a la región central.**

Las flores maduras de *Arabidopsis thaliana*, tienen una estructura simple, típica de las Brassicaceae, un cáliz de cuatro sépalos ( primero verticilio), una corola de cuatro pétalos ( segundo verticilio), un androceo formado por seis estambres ( tercer verticilio), cada uno compuesto por un filamento y una antera. Las anteras son biloculadas y presentan una dehiscencia longitudinal. El gineceo maduro ( cuarto verticilio), es sésil, ocupa la parte central de la flor y posee dos carpelos fusionados congénitamente (Bowman, 1994)



**Fig. 2 Estructura de la flor silvestre de *Arabidopsis thaliana* (Bowman J, 1994)**

El desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana* se ha descrito con detalle y puede dividirse en una serie de estadios que van del 1 al 14. Del estadio 1 al 7 se forman los primordios de los órganos y tiene lugar la especificación. Generalmente estos son referidos como etapas tempranas del desarrollo floral. Durante el estadio 8 al 14, etapas

tardías del desarrollo floral, incluye muchos de los procesos de diferenciación celular. A partir del estadio 7 empieza la diferenciación morfológica de estambres y carpelos (Bowman et al , 1994)

### **Mutaciones homeóticas en el desarrollo floral y el modelo ABC.**

La combinación de las técnicas de DNA recombinante con estudios de genética clásica han hecho posible una disección de las bases moleculares de la especificación genética de la morfogénesis floral. Muchos de estos avances se han obtenido por mutantes homeóticos (Raghavan, 1997). Una mutación homeótica se define como aquella que causa un cambio en el desarrollo de un órgano o un sistema de órganos. Este tipo de mutaciones es ejemplificada mas espectacularmente en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*, donde por ejemplo, la mutación del locus *antennapedia* produce la formación de alas o de patas en la cabeza, en lugar de las antenas normales. Estas mutaciones deben ocurrir en un loci individual, cuya función es activar o coordinar una miriada de genes cuya expresión combinada es requerida para la formación de un órgano específico. A estos genes se les denomina genes homeóticos (Glibert, 1997).

En plantas han sido identificadas una gran cantidad de mutaciones homeóticas que alteran la especificación de los órganos florales. Las principales especies sujetas a estudio además de *Arabidopsis thaliana* son *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum* y *Oryza sativa*. El desarrollo floral es uno de los eventos morfogenéticos mejor entendidos a nivel molecular en plantas ( Raghavan, 1997). Una de las maneras para generar mutantes es mutagenizar químicamente las semillas, y las plantas que presentan fenotipos que interfieren con el desarrollo de las plantas son seleccionados (Raghavan 1997). Las mutaciones por lo general afectan la diferenciación de un órgano en una posición particular del meristemo y producen flores anormales. Un gran número de estudios han puesto de manifiesto que el desarrollo de las inflorescencias y las flores está determinado por una red de genes reguladores, muchos de los cuales codifican para factores de transcripción (Theissen & Seadler; 1995). Estos genes, a su vez están regulados por factores ambientales como la longitud del día, calidad de la luz, temperatura ente otros (Theissen & Seadler; 1999). Se usan específicamente las lesiones genéticas que producen cambios en la posición de los verticilos sobre el receptáculo, como pétalos en lugar de estambres y nuevo primordio de flores en lugar de carpelo ( *agamous* ) , carpelos donde los estambres estaban presentes normalmente (*pistilata*, *a-petala 3*, *universal flower organs [ufo]*), estambres

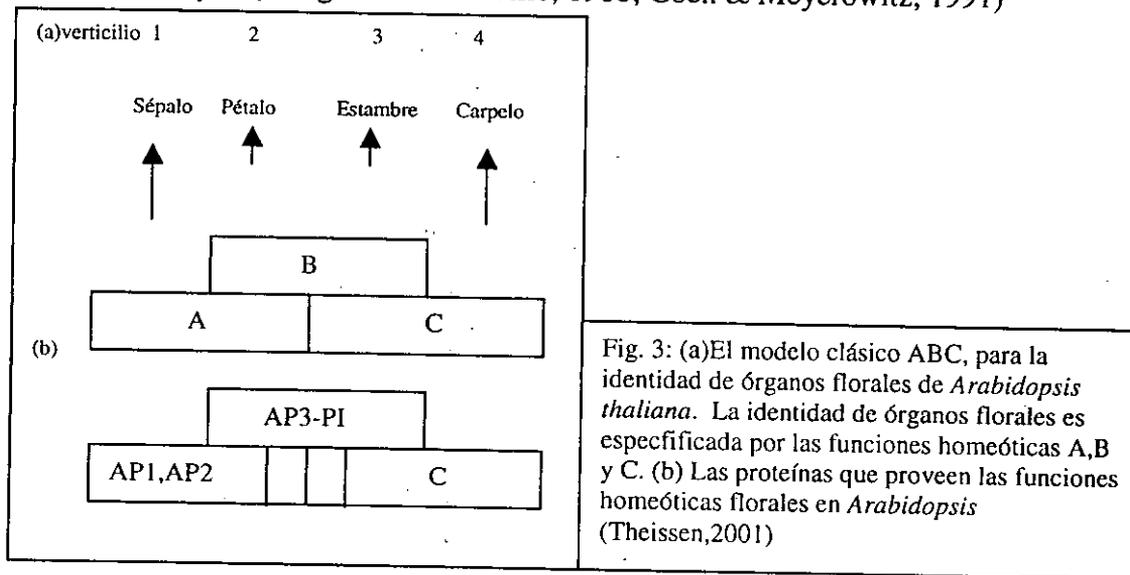
que pierden el lóculo de la antera (*fl-54*), estambres en lugar de carpelos (*floral-10*, *superman*), carpelos en lugar de sépalos en el perianto entero (*flo-2*, *flo-3* y *flor-4*) y flores secundarias en las axilas de los sépalos de las flores primarias (*apetala-1*) (Raghavan, 1997).

El desarrollo del meristemo floral de *Arabidopsis thaliana* es iniciado por genes de identidad del meristemo, como son *LEAFY* y *API* (*APETALA-1*) (Weigel et al; 1992; Mandel et al; 1992). Otros genes de identidad del meristemo son *APETALA 2* y *CAULIFLOWER*, cuyas mutaciones tienen efectos menores sobre el meristemo, pero ambas mutaciones (*ap2* y *cal*) potencian los efectos de las mutaciones *LFY* y *API* sobre la identidad del meristemo.

En el meristemo apical inflorescente de *Arabidopsis thaliana*, la acción de los genes de identidad de meristemo es antagonizada por el gen *TERMINAL FLORWER* (*TFL 1*) (Bradley et al; 1997). Por lo tanto la pérdida de la función de estos genes resulta en expresión ectópica de *LFY* y *API* en el meristemo inflorescente, el cual se transforma en un meristemo floral que genera una flor terminal. *TFL 1* codifica para una proteína asociada a membrana posiblemente involucrada en una transducción de señales requerida para reprimir la expresión de los genes de identidad floral en el meristemo inflorescente (Theissen & Seadler 1999).

Cuando la transición del meristemo inflorescente al meristemo floral, los órganos florales aparecen en una posición definida dentro de éste. Ciertos genes como *CLAVATA 1 (CLV1)*, *CLAVATA 2 (CLV2)*, y *CLAVATA 3 (CLV 3)* y *WIGGUM (WIG)*, regulan el tamaño del meristemo floral y también influyen el número de órganos florales (Clark et al; 1995). *CLV 1* codifica para un receptor con actividad de proteína cinasa y *CLV 3* codifica una pequeña proteína extracelular que puede ser el ligando de *CLV1* (Clark et al; 1997). Los genes "cadastrales" como *LEUNIG (LUG)* (Liu & Meyerowitz; 1995) *AP2* y *AG* están involucrados en establecer los límites de las funciones de los genes de identidad de órganos, definiendo los diferentes órganos florales. Los genes como *PERIANTHIA (PAN)*, los cuales codifican factores de transcripción tipo bZIP actúan estableciendo la posición y el número específicos de primordios de órganos florales (Chuang et al; 1999). Los genes de identidad de órganos florales (selectores homeóticos) especifican la identidad de cada órgano floral por la activación de genes realizadores.

En el modelo clásico de desarrollo floral, ABC, se han propuesto tres funciones homeóticas codificadas por los genes de identidad de órganos florales. Cada función es llamada A, B y C (Haughn & Somerville, 1988; Coen & Meyerowitz, 1991)



Este modelo trata de explicar como la interacción de estos genes promueve la formación de los cuatro verticilios florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos). La expresión solo de la función A especifica la formación de sépalos, la combinación de A y B especifica la formación de pétalos, la combinación de B y C la formación de estambres y la función C la formación de carpelos. Este modelo también explica que los genes de la función A y C se regulan negativamente mientras que los genes de la función B están restringidos al segundo y tercer verticilio independientemente de la función A y C. En las flores de *Arabidopsis thaliana* con fenotipo silvestre la función A corresponde al primer y segundo verticilio, la función B al segundo y tercer verticilio y la función C al tercer y cuarto verticilio. Este modelo se basó en los análisis de mutantes homeóticos del *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* (Weigel & Meyerowitz; 1994).

Los genes de *Arabidopsis thaliana* que proveen estas tres funciones homeóticas son conocidos: la función A se debe a *APETALA 1* (AP1) y *APETALA 2* (AP2), la función B por *APETALA 3* (AP3) y *PISTILATA* (PI) y la función C a *AGAMOUS*. En el caso de *Antirrhinum majus* la función B está dada por *GLOBOSA* (GLO) y *DEFICIENS* (DEF) y la función C por *PLENA* (PLE). En petunia también ha sido definida la función D, la similitud de su secuencia sugiere que corresponde a AGL 11 de *Arabidopsis thaliana*. Los genes de la función D (*FBP7* y *FBP 11*) son expresados ectópicamente en plantas transgénicas e inducen la formación ectópica de óvulos sobre

el perianto por lo que estos genes han sido definidos como genes maestros de la formación del óvulo (Angenet & Colombo; 1996).

### **Genes MADS-box y el desarrollo de eucariontes.**

Todos los genes descritos en el modelo ABC y los responsables de la función D han sido clonados y con excepción de AP2 todos pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box (Riechman & Meyerowitz, 1997). Estos genes codifican para una familia de factores de transcripción altamente conservados en plantas, animales y levaduras (Theissen & Seadler 1999). El nombre de estos genes es un acrónimo de cuatro proteínas MCM1 (de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*), AGAMOUS (de *Arabidopsis thaliana*) DEFICIENS (de *Anthirrinum majus*) y SRF (proteína humana) (Schwartz et al; 1990). En el caso de mamíferos el gen MADS-box (Myocyte enhancer factor) tiene un papel esencial en la miogénesis del músculo cardíaco y músculo esquelético (Black & Olson 1998; Kraushal et al, 1994; Lilly et al, 1995; Lin et al, 1997). También está involucrado en la regulación de genes del músculo liso (Kato et al; 1998), desarrollo del sistema vascular (Lin et al; 1998) y sistema nervioso (Mao et al 1999; Schultz et al; 1996) y tiene diferentes papeles en el sistema inmune (Han et al, 1997) en la inducción sérica de c-jun ( Han & Prywes; 1995) y la activación de la etapa lítica del virus Epstein-Barr en respuesta a calcio (Liu et al; 1997). También ha sido demostrado que la actividad de MEF 2 es necesaria para activar genes en respuesta a mitógenos a través de la ruta de transducción de señales mediada por p 38, BMK1/ERK5 ( Hann et al, 1997; Kato et al, 1997; Yang et al, 1999; Zetser et al, 1999; Zhao et al, 1999).

Otros genes MADS-box como SRF tienen un papel esencial en la proliferación y diferenciación en respuesta a proteínas de suero y tienen una relevancia funcional para la transcripción de genes específicos de músculo (Croissant et al, 1993; Soulez et al, 1996). También la función de SRF es esencial para la regulación transcripcional de numerosos genes inducibles por el factor de crecimiento como el oncogen *c-fos* y genes de actina específica de músculo (Shore & Sharrocks; 1995).

En plantas, además de los genes de identidad de órganos florales, hay una gran cantidad de genes MADS-box cuya función no ha sido bien definida (Moon et al; 1999). En *Arabidopsis thaliana*, por lo menos 85 genes de la familia MADS han sido detectados (León Martínez comunicación directa). Muchos de estos genes son

específicos de órganos florales y están involucrados en el inicio y el desarrollo de los órganos florales. Por ejemplo el gen *AGL2* y *AGL4* se expresan en etapas muy tempranas del desarrollo (después de que emerge el meristemo inflorescente pero antes de que aparezca cualquier primordio de órgano) sugiriendo que *AGL2* y *AGL4* desempeñan un papel importante en los pasos intermedios entre la iniciación de la inflorescencia y la iniciación de los órganos florales (Flanagan & Ma; 1994). Otros genes MADS-box están involucrados en el desarrollo de la semilla, el óvulo, crecimiento vegetativo, desarrollo de la raíz, embriogénesis e inducciones simbióticas (Mandel et al, 1995; Angenet et al, 1995; Hear & Dunn 1995; Flanagan et al, 1996; Perry et al, 1996; Buchner & Boutin, 1998; Zhang & Forde, 1998).

Todos estos genes controlan la expresión de genes blanco involucrados en la formación de órganos, ya sea amplificando los eventos de control de cascada reguladoras, o por la ejecución de funciones bioquímicas y estructurales que son cruciales para la fisiología y estructura de los órganos.

### **Estructura de las proteínas codificadas por genes MADS-box, interacciones y el modelo del cuarteto.**

Las proteínas MADS-box, al igual que los otros factores de transcripción eucariontes, presentan una organización modular (Shore et al; 1995). Las proteínas MADS-box en plantas presentan un dominio MADS (M), un dominio (I), un dominio similar a la queratina (K) y un dominio C-terminal (Matl, 1991; Purugganan, 1995; Theissen 1996).

El dominio o caja MADS presenta una longitud de 186 pb, es la región más conservada de la proteína (Purugganan, 1995) se encuentra ubicada en la región N-terminal y puede presentar residuos adicionales (proteínas tipo NMIKC). Este dominio es responsable de la unión al DNA, formación de dímeros e interacción con componentes accesorios (Tilly, 1998). Este dominio se une a secuencias consenso CC(A/T)6GG también llamada caja C Ar G que se encuentra en la región promotora de muchos genes probablemente regulados por estos factores de transcripción (Tilly, 1998).

El dominio o caja I, está formado por 30 aminoácidos, pero es un poco variable en longitud (Münster, 1997; Ma, 1991). En muchas proteínas MADS-box de *Arabidopsis thaliana*, este dominio constituye una clave molecular para la formación selectiva de dímeros que se unen al DNA (Reichman, 1997).

El dominio o caja K y la caja I no están presentes en ninguna de las proteínas MADS-box de animales y levaduras hasta ahora conocidas (Theissen & Seadler, 1995). Este dominio se caracteriza por presentar dominios hidrofóbicos y se propone que pueden formar hélices alifáticas (Reichman & Meyerowitz; 1997), es posible que esta región este involucradas en interacciones proteína-proteína (Ma et al, 1991; Pnueli et al 1991; Theissen et al, 1995). También se ha demostrado que este dominio se requiere para interacciones entre proteínas MADS-box (Fan et al, 1997). Empleando el sistema del doble híbrido se demostró que el dominio o caja K es necesario para las interacciones entre GLOBOSA y DEFICIENS, las proteínas de la clase B de *Anthirrinum majus* (Davies et al; 1997). En otros estudios empleando el mismo sistema se demostró que AGAMOUS interactúa con AGL2, AGLA, AGL6 y AGL9 (Fan et al; 1997). Estos resultados indican que las proteínas MADS-box interactúan con otras proteínas MADS-box para llevar a cabo sus funciones, en una interacción mediada por caja K.

La región mas variable, tanto en longitud como en secuencia, es el dominio C-terminal. La función de este dominio es desconocida, pero se ha demostrado que es indispensable para la unión al DNA y la formación de dímeros, al menos en proteínas con funciones homeóticas del desarrollo floral (Zachgos et al; 1995). Esta región es rica en aminoácidos ácidos, los cuales son característicos de los dominios de transactivación. Empleando el sistema del doble híbrido se demostró que el gen *OsMADS16*, homólogo de AP3, contiene un dominio de activación transcripcional en la región C-terminal (Moon et al; 1999).

Se sabe que todas las proteínas homeóticas que determinan funciones homeóticas en *Arabidopsis thaliana* (AP1, AP3, Pi y AG) pueden interactuar *in vitro* (Reichman et al; 1996). Los ensayos de movilidad electroforética y el sistema del doble híbrido revelan que la formación de dímeros de unión al DNA es altamente específica (Reichman et al 1996; Davies et al, 1996; Fan et al, 1997). Genéticamente, los genes de la función B, de *Anthirrinum majus* y *Arabidopsis thaliana* como son DEF- GLO y AP3 y PI respectivamente, interactúan con los genes de la función C de PLE (*Anthirrinum majus*) y AGAMOUS (*Arabidopsis thaliana*) para especificar la formación de estambres. Las proteínas de la función B no forman dímeros de unión al DNA con proteínas de la función C. De hecho, las proteínas de la función B forman dímeros de unión al DNA entre ellas (DEF-GLO o AP3 y PI) pero no con proteínas MADS-box de otra clase (Reichman et al, 1996; Davies et al 1996). Anteriormente se reportó que la

proteína de la función C formaba dímeros de unión al DNA con proteínas tipo AGL-2 (Davies et al, 1996; Fan, 1997). La hipótesis era que las proteínas de la función C en *Arabidopsis thaliana* requerían interactuar con proteínas tipo AGL-2, sugerencia que recientemente fue corroborada (Pelaz et al, 2000).

Recientemente, han sido encontradas evidencias sobre la formación de grandes complejos multiméricos, entre proteínas con dominio MADS que son relevantes para resolver el problema de las interacciones entre proteínas homeóticas florales ( Egea-Cortines et al; 1999). También se ha reportado interacciones genéticas en *Anthirrinum majus* entre *SQUAMOSA* ( gen ortólogo de *API*) y los genes de la función B ( *GLOBOS* y *DEFICIENS*). Esta interacción es necesaria para establecer la filotaxia de los órganos florales ( Egea-Cortines et al; 1999). La interacción ha sido probada en proteínas, empleando el sistema del doble híbrido y ensayos de movilidad electroforética donde *DEFICIENS*, *GLOBOSA* y *SQUAMOSA* forman un complejo multimérico. La afinidad de este complejo por el DNA, difiere de la afinidad de dímeros individuales. De esta manera se sugiere un modelo, de acuerdo al cual, las proteínas forman un tetrámero compuesto por un homodímero *SQUA-SQUA* y un heterodímero *DEF-GLO*. Dentro de este tetrámero, cada dímero reconoce secuencias diferentes de DNA denominadas cajas C Ar G ( Egea-Cortines et al; 1999).

La caracterización de los complejos multiméricos de proteínas con dominio MADS puede constituir un gran avance en el entendimiento de las interacciones entre genes homeóticos florales. Por otra parte hay evidencias de que las proteínas con dominio MADS de *Arabidopsis thaliana* forman complejos multiméricos que incluyen proteínas como *AGL2*, *AGL4* y *AGL9* ( *SEP 1*, *SEP2* y *SEP 3* respectivamente). Los dímeros formados incluyen a *AP3-PI*, *SEP3-API*, *SEP3-AG* (Pelaz et al; 2001).

Toda esta información ha llevado a la generación de un modelo llamado modelo del cuarteto de identidad de órganos florales, el cual trata de explicar como la interacción entre proteínas, codificadas por genes homeóticos florales, especifican la identidad de órganos en la flor, sin referirse a la función homeótica floral (Pelaz et al; 2001).

Para la simplificación del modelo se ignora los óvulos. De esta manera se puede explicar como son establecidas las identidades de los cuatro órganos florales: sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Para esto se necesita la combinación única de proteínas homeóticas florales. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, esta combinación se puede basar en diferentes complejos proteicos. sépalos: *API-API-?-?*; pétalos *API-AP3-PI*

SEP; estambres AP3-PI-AG-SEP; carpelo AG-SEP-AG-SEP, los componentes desconocidos se denotan por "?". Se asume que estos complejos proteicos son factores de transcripción, que pueden ejercer su función por la unión específica a genes blanco los cuales son activados(+) o reprimidos(-) de manera adecuada para el desarrollo de las identidades de los diferentes órganos florales. La especificidad de la elección de los genes blanco, puede llevarse a cabo por los cuatro complejos teniendo diferentes afinidades por pares de secuencias de DNA (probablemente caja C Ar G) y por la distribución característica de estos pares de secuencias en la región promotora de los genes blanco. El antagonismo entre los genes de la función A y C en el modelo ABC, puede ser explicado por el hecho de que los complejos proteicos que contienen AP1 reprimen la expresión del gen AG y los complejos que tienen a AG reprimen la expresión de AP1, estas interacciones podrían ser mas indirectas (Pelaz; 2001).

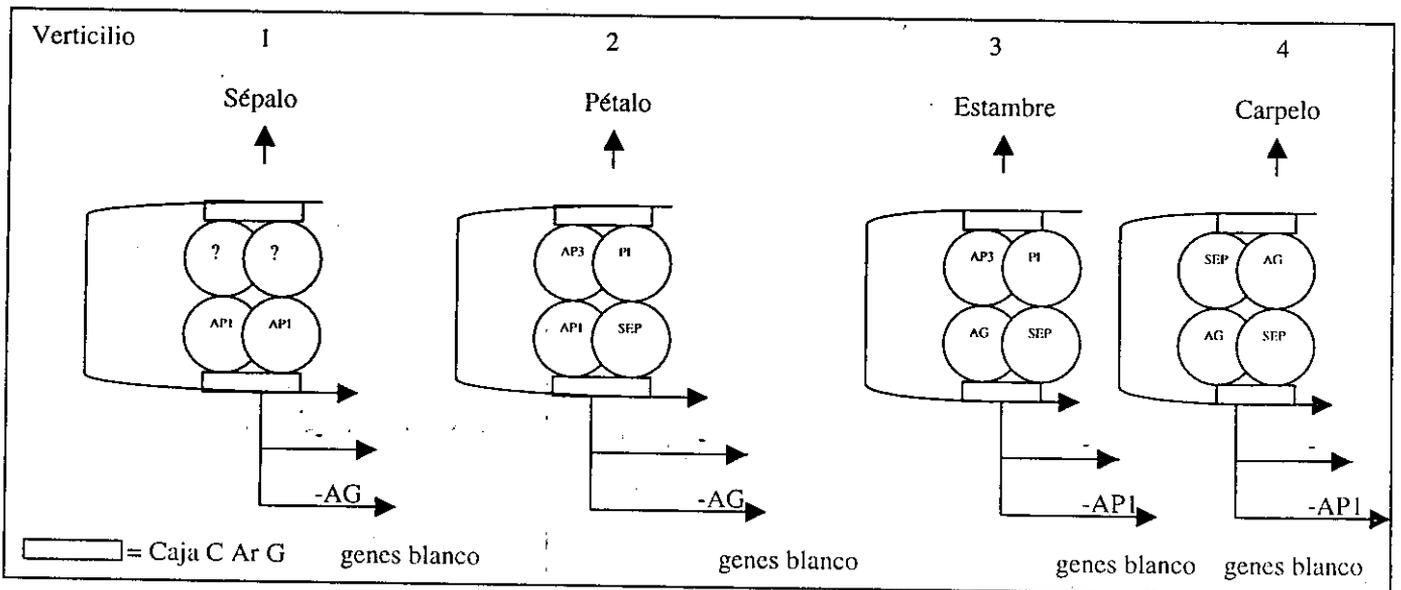


Fig. 4: Modelo del cuarteto de identidad de órganos florales de *Arabidopsis thaliana*. Este modelo sugiere que la combinación de cuatro proteínas homeóticas florales determina la identidad de los cuatro diferentes órganos. Estos complejos proteicos, los cuales se asume representan factores de transcripción, pueden ejercer su función uniéndose específicamente a los promotores de los genes blanco, los cuales son activados (+) o reprimidos (-) para el desarrollo adecuado de la identidad de los órganos florales. La unión ocurre probablemente cajas C Ar G. El antagonismo entre la función A y C podría ser causada por la represión de la expresión génica de AG por complejos proteicos que contienen a AP1. De la misma manera los complejos que poseen AG reprimen la expresión de AP1 (Theissen, 2001)

### Regulación post-transcripcional de los factores de transcripción codificados por genes MADS-box.

El tipo mas común y habitual de modificación covalente reversible es la fosforilación, mediante la cual se regula la actividad de muchas enzimas, proteínas transportadoras de membrana, factores de transcripción y otras proteínas blanco

(Strayer, 1994). Las proteínas que catalizan estas reacciones se llaman proteínas cinasas. Una clase de proteínas cinasas transfiere el grupo fosforilo terminal ( $\gamma$ ) del ATP a residuos específicos de serina y treonina y otra clase los transfiere a residuos de tirosina. Los aceptores de los grupos fosforilo se encuentran localizados en el interior de las células donde el ATP es abundante. Las proteínas extracelulares no son reguladas por fosforilación reversible (Strayer, 1994). Las proteínas fosfatasas revierten el efecto de las proteínas cinasas catalizando la hidrólisis de los grupos fosforilo unidos a proteínas. La cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo no modificado se regenera y produce ortofosfato (Strayer, 1994).

La fosforilación es un medio muy efectivo para controlar la actividad de una proteína por varias razones de tipo termodinámico y cinético por varias razones: (i) Un grupo fosforilo añade dos cargas negativas a una proteína modificada, las interacciones electrostáticas en la proteína no modificada pueden interrumpirse y otras nuevas pueden formarse. Estos cambios estructurales pueden alterar fundamentalmente la unión del sustrato y la actividad catalítica, (ii) un grupo fosforilo puede formar tres puentes de hidrógeno, la geometría tetraédrica hace a estas interacciones totalmente direccionales. (iii) la fosforilación y la defosforilación pueden tener lugar en un segundo o durante horas. La cinética se ajusta para encontrar el tiempo necesario del proceso fisiológico. (iv) la fosforilación genera eventos muy amplificados, una sola proteína cinasa activada puede fosforilar a cientos de proteínas en un intervalo muy corto, además una sola enzima blanco puede transformar una gran cantidad de moléculas en sustrato (Strayer, 1994).

La exposición de las células a señales químicas extracelulares o a las modificaciones del ambiente extracelular generan cambios en la expresión de genes que permiten una adecuada respuesta fisiológica. Esto ocurre gracias a la integración de múltiples vías de señales intracelulares que controlan la actividad de factores de transcripción. El mecanismo regulador más común, debido a las rápidas alteraciones de la actividad de los factores de transcripción, involucra la fosforilación y la defosforilación de proteínas (Witmarsh & Davis; 2000).

La fosforilación y defosforilación de proteínas puede regular la función de los factores de transcripción por lo menos a través de cinco mecanismos: (i) a través de la translocación del citoplasma al núcleo, (ii) marcando los factores de transcripción para su degradación proteolítica, (iii) regulando las interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción, correguladores y complejo basal de la transcripción (iv)

regulando la unión del factor de transcripción al DNA (v) modificando la estructura de la cromatina (Witmarsh & Davis, 2000).

Por ejemplo la proteína MADS-box SRF, al igual que otras proteínas de esta familia, pose una caja MADS necesaria para la unión al DNA, dimerización e interacción con elementos accesorios ( Shwartz-Sommer et al; 1995). Los homodímeros de SRF se unen específicamente a los elementos de respuesta al suero SER ( serum response elements), que es una secuencia genómica identificada por primera vez en la región promotora de *c-fos*. Esta región SER contiene una secuencia consenso CC(AT)6 G llamada caja CA Ar G y se encuentra en la región promotora de todos los genes regulados por SRF ( Soulez, 1996),

Recientemente se comprobó que la treonina 160 ( Thr 160) de la caja MADS de SRF, es fosforilada *in vitro*, por una proteína cinasa dependiente de calmodulina (CaMK II) ( Flük et al; 2000) y esta treonina podría estar involucrada directamente en los contactos de los dímeros de SRF con SER, formando un puente de hidrógeno para un fosfato de un residuo de guanina dentro del motivo central de reconocimiento de SER, además de estar involucrada en los contactos de dimerización ( Pellegrini et al; 1995). De acuerdo con este modelo estructural, la fosforilación de la Treonina 160 podría inducir una carga negativa que afectaría la interacción de SER con SRF además de influenciar las interacciones entre los dímeros de SRF. Se sabe que la mutación de Thr-160 por un prolina reduce considerablemente la capacidad de SRF para unirse a SER (Sharroks et al 1993). Por otra parte, se sugiere un papel regulador de esta treonina, por estar conservada en todos los homólogos de SRF.

El grado de especificidad de las proteínas cinasas varía. Las proteínas cinasas específicas fosforilan a una sola proteína o varias muy parecidas entre sí. Las proteínas cinasas multifuncionales, por otra parte, modifican muchas proteínas blanco diferentes: tienen un amplio alcance y pueden coordinar diversos procesos. La comparación de las secuencias de aminoácidos de muchos centros de fosforilación demuestran que las cinasas reconocen secuencias concretas. Por ejemplo las secuencia consenso reconocida por la proteína cinasa A es una Arg-Arg- X- Ser Z ó Arg-Arg-X-Thr-Z donde X es un residuo pequeño, Z un residuo hidrofóbico voluminoso y Serina o treonina como centro de fosforilación. No se requiere que la secuencia esté intacta. Por ejemplo, la lisina, aunque no de un modo tan efectivo, puede sustituir a uno de los residuos de arginina. Los péptidos sintéticos cortos que poseen una secuencia consenso son siempre fosforilados por proteínas cinasas de treonina o serina. Así, el determinante de la

especificidad es la secuencia que rodea a los residuos de serina o treonina ( Strayer, 1994),

Los péptidos sintéticos cortos, que poseen una secuencia consenso, han sido empleados en columnas de afinidad para aislar proteínas cinasas específicas (Woodgett,1991; Ferrar, 1998). Fry et al, describieron el uso de cromatografías de afinidad con fosfopéptidos, como un procedimiento para purificar fosfatidil-inositol-3-cinasa en cerebro bovino ( Fry et al ; 1992). Empleando el mismo sistema se ha descrito la identificación de los componentes de una cascada de tirosincinasa (Duménli et al; 1997).

Analizando la estructura primaria de los genes MADS-box, se localizaron varios motivos conservados que median interacciones proteína-proteína, como es el posible sitio de reconocimiento de proteínas fosfatasas (RXVXT) ( Egloff et al; 1997) que incluye un posible sitio de fosforilación (RXXT) ( Theissen et al; 1997). El principio bioquímico de la columna de afinidad con secuencias consenso se utilizó para aislar factores accesorios potenciales que interactúan con proteínas MADS-box como AGAMOUS, durante el desarrollo floral. De esta manera, por medio de una cromatografía de afinidad utilizando un decapeptido derivado de un posible sitio de reconocimiento de fosfatasas y de fosforilación de la secuencia MADS de AGAMOUS se purificaron dos proteínas a partir de extracto proteico crudo de flores de *Arabidopsis thaliana*. Las proteínas se identificaron como FLOR 1 que pertenece a la familia de proteínas con motivos repetidos ricos en leucina ( LRR) y VSP que pertenece a la familia de proteínas de almacenamiento vegetativo con actividad de fosfatasa. La secuencia N-terminal de FLOR 1 posee un péptido señal que puede actuar potencialmente en el reconocimiento de membranas, así como un sitio de unión a nucleótidos. La secuencia de aminoácidos del 77 al 285 contiene 8 regiones repetidas en tandem ricas en leucina con un tamaño promedio de 24 aminoácidos; diez de los 24 residuos están conservados. Además la secuencia presenta tres sitios de N-glicosilación (Gamboa et al; 2001).

### **Estructura y función de las proteínas LRR.**

Las proteínas con motivos repetidos ricos en leucina (LRR) fueron descubiertas en la  $\alpha$ -glicorproteína del suero humano (Takahashi et al; 1985) a la fecha mas de cien LRR han sido descritas. Estas proteínas están presentes en todos los linajes, desde las bacterias hasta el hombre ( Kobe & Deisenhofer 1995) e incluyen receptores de hormonas, receptores con actividad de tirosincinasa, moléculas de adhesión celular,

factores de virulencia bacteriana, enzimas y glicorpteínas de la matriz extracelular. Todas las LRR parecen estar involucradas en interacciones proteína-proteína, las cuales son esenciales en procesos como la transducción de señales, adhesión celular, reparación del DNA, recombinación, transcripción, procesamiento del RNA, resistencia a enfermedades y nucleación del hielo ( Matsushima et al; 2000). El número de motivos repetidos ricos en leucina va de 1 a 33, por ejemplo el PGIB plaquetario y la caoptina respectivamente. Los motivos repetidos ricos en leucina, por lo general, están repetidos en tandem. La longitud más común del motivo LRR es de 24 aminoácidos ( Kajava et al; 1995). También se ha propuesto ( Kobe & Deisenhofer 1994) una secuencia consenso general para las unidades repetidas ricas en leucina que es **xLxxLxLxxNzxaxxxzazzzzazzxzz** en la cual “x” significa un residuo variable, “z” frecuentemente es un espacio y “a” valina, leucina o isoleucina. Las leucinas son remplazadas por valinas o isoleucina, la asparagina consenso es remplazada algunas veces por cisteína o treonina. Todas las LRR tienen un motivo altamente conservado **LxxLxLxxNxL** ( Kajava, 1998). Recientemente se propuso que las proteínas LRR pueden ser divididas en por los menos seis o siete subfamilias, caracterizadas por diferentes longitudes y secuencias consenso de la parte variable y de las repetidas (Ohyanagi et al 1997; Kajave, 1998), también se propuso que las partes variables difieren tridimensionalmente en su estructura ( Kajave, 1998).

En plantas, estas proteínas, juegan un papel fundamental tanto en el desarrollo como en la defensa contra patógenos, donde el reconocimiento específico es fundamental. Estas proteínas incluyen las PGIPs (proteínas inhibitoras de poligalacturonasa), el producto del gen de resistencia R de tomate, el cual confiere resistencia contra varias razas de hongos (Hammond-Kosack & Jones; 1997), así como receptores con actividad de cinasas en *Arabidopsis thaliana*, tales como ERECTA (Torii et al, 1996) y CLAVATA (Clark et al; 1997) y posibles receptores de brasinosteroides (Li & Chory; 1997).

### **Especificidad de las proteínas LRRs.**

Las proteínas inhibitoras de poligalacturonasa (PGIP) están presentes en la pared celular de muchas plantas, y pertenecen a la familia de LRR especializadas en el reconocimiento y rechazo de patógenos (Cervone et al; 1997). En la PGIP de *Phaseollus vulgaris*, el dominio comprendido entre el aminoácido 69 al 326 puede dividirse en 10.5 unidades repetidas en tandem, cada una derivada de un péptido de 24

aminoácidos (De Lorenzo et al; 1997). La comparación entre los motivos LRRs de las PGIPs con otras proteínas indica que las secuencias despliegan gran similitud, el número de repeticiones puede variar significativamente entre especies (Mattei et al , 2001).

La mayoría de los genes de resistencia contra patógenos codifican proteínas clasificadas como NBS-LRR por contener un sitio de unión a nucleótidos (nucleotide binding site) y un dominio repetido rico en leucina (LRR) (Ellis & Jones; 1998). Los diferentes genes de este grupo confieren resistencia contra virus, bacterias, oomicentos, hongos, nemátodos e insectos. Esta clase de proteínas puede ser subdividida en dos subgrupos, el primero contiene proteínas que poseen una región N-terminal distintiva, similar al dominio citoplásmico de la proteína Toll de *Drosophila* y al receptor de interleucina 1. Las proteínas del segundo grupo carecen de esta región pero pueden tener una cremallera de leucina o dominio coiled-coil (estructuras secundarias tipo rizo) e la región N-terminal (Pan et al; 2000).

Muchas de las variaciones entre los genes de resistencia y sus homólogos ocurren en el dominio LRR, particularmente en el motivo **xxLxLxx** de las unidades repetidas y ciertas evidencias sugieren que esta región ha sido blanco de selección diversificadora (Meyeres et al; 1998). En las proteínas LRR canónicas, tales como el inhibidor de ribonucleasa porcina y el inhibidor de ribonucleasa humano (pRI y hRI), estos motivos adoptan un estructura tipo  $\beta$ -trand/ $\beta$ -turn, donde las leucinas forman un núcleo hidrofóbico hacia la proteína y los residuos que flanquean a las leucinas quedan expuestos e interactúan con su ligando (Kobe & Deisenhofer, 1995; Papageorgiou et al; 1997). En el complejo de la pRI y su ligando la ribonucleasa A, 26 de los 28 puntos de contacto involucra aminoácidos de los motivos **xxLxLxx**, mientras que en un complejo similar formado por la hRI y la Angiogenina, 19 aminoácidos dentro del motivo **xxLxLxx** de la hRI establecen un fuerte contacto con la Angiogenina y seis puntos de contacto ocurren fuera de este motivo. La mayoría de los puentes de hidrógeno y contactos de van de Waals en los complejos son distintivos, indicando que la habilidad del hRI para reconocer diferentes ligandos esta basado en su capacidad para interactuar con un número de características únicas de ellos ( Papageorgiou et al; 1997).

Recientemente, Leckie et al (1999) demostraron que el aminoácido que confiere especificidad y afinidad al PGIP por la poligalacturonasa fúngica se encuentra en el motivo conservado **xxLxLxx**. Un solo cambio de un aminoácido en esta región confiere una nueva capacidad de reconocimiento a la PGIP.

### **Localización subcelular de las proteínas LRRs.**

Las PGIPs, presentan grandes similitudes con una clase de proteoglicanos extracitoplásmicos de animales llamados SLRPs (small leucine rich proteoglycans), los cuales incluyen la decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano y efiglicano (Iozzo, 1997). Las PGIPs y los SLRPs comparten muchas propiedades: ellas son proteínas solubles de la matriz extracelular (como lo demuestran diferentes métodos de extracción), presentan pesos moleculares similares, un número similar de LRRs en el dominio central, así como la presencia de regiones ricas en cisteína que flanquean a la región central. Las SLRPs están involucradas en el ensamble de la matriz extracelular, en la orientación y ordenamiento de las fibras de colágena durante la ontogenia y en la recuperación de procesos patológicos como la reparación tisular. La decorina y quizás otras SLRPs regulan en muchos niveles la producción y el ensamble de la matriz extracelular y de este modo la remodelación del tejido conectivo (Iozzo, 1997). Las modificaciones post-traduccionales pueden ocurrir por diferentes funcionalidades dentro de la proteína: por ejemplo, han sido reportadas la existencia de muchas SLRPs con una o muchas cadenas de glicosaminoglicanos y diversos patrones de N-glicosilación, por lo que esta diversidad de modificaciones post-traduccionales, se perfila como parte de un papel funcional (Iozzo 1997) Por analogía con la función de las SLRPs no se descarta el papel de las PGIPs en el ensamble de la matriz extracelular y procesos morfogénicos en plantas. La pared que rodea a las células vegetales, la cual puede ser considerada un equivalente a la matriz extracelular de los tejidos animales, es una fuente de señales que las plantas usan para detectar patógenos y señales dentro de la célula que determinan cuando se produce pared, se construye y es remodelada durante el crecimiento y la diferenciación. Recientemente se comprobó que las PGIPs interaccionan con pectinas metiladas y que la sobreexpresión de la PGIP de frijol en plantas de tomate genera morfologías alteradas ( Bellicampi in Mattei; 2000).

En procariontes, los motivos LRRs han sido identificados previamente en proteínas de membranas bacterianas gram-positivas (*Listeria monocytogenes*) así como en proteínas secretoras relacionadas con la patogenicidad de bacterias gram-negativas como *Shigella flexneri* y *Yersinia pestis*. Otra proteína con motivos LRRs de bacteria es la TplLRRR inmunolocalizada en los complejos de peptidoglicanos de *Treponema pallidum* y se propone, puede estar involucrada en interacciones proteína-proteína o

interacciones lípido-proteína que son necesarias entre los componentes de la envoltura celular de la espiroqueta ( Shevchenko et al; 1997).

En plantas, la única proteína con motivos LRR, de la cual se ha hecho una localización subcelular, empleando técnicas inmunohistoquímicas es FIL2. Esta proteína es específica de flor y se aisló por medio de un ensayo de escritorio diferencial entre el fenotipo silvestre de *Anthirrinum majus* y un mutante nulo de DEFICIENS (Steinmayr et al; 1994). Esta proteína se expresa en tipos celulares específicos de la floral como papila estigmática, pared de la antera, excepto en granos de polen y tejido vascular, filamento del estambre y parte superior del tejido de transmisión. La localización subcelular se hizo en el filamento de la antera, órgano de la flor cuya histología es muy similar a la hoja. El anticuerpo reconoce a la proteína en la matriz extracelular.

## FLOR 1, LRR extracelular o intracelular.

Los dominios de LRR de FLOR 1 fueron comparados con los dominios LRR de otras proteínas. En FLOR 1, la región comprendida entre los aminoácidos 70-303, se encuentran 10 regiones LRR repetidas en tandem con un tamaño de 24 aminoácidos: 9 de los 24 residuos están conservados mostrando la secuencia consenso - LxxLxxLxxLxLxxxNxLxGxIP - que ha sido reportada como específica de plantas (Kajava, 1998). La alineación de los motivos consenso LRR de CLAVATA, ERECTA y FIL2 muestran una gran similitud entre ellas y FLOR 1. Dentro de la región LRR se encuentra la región hipervariable xxLxLxx que se ha demostrado da especificidad para interactuar con el ligando. Las diez regiones hipervariables de FLOR 1 fueron comparadas con las secuencias xxLxLxx de PGIP de *Phaseolus vulgaris*, PGIP-1 y 2 de *Arabidopsis thaliana* y FIL 2 de *Anthirrinum majus*. Únicamente comparten entre ellas cuatro regiones.

Proteín	Secuencia consenso	LRR
FLOR 1	LxxLxxLxxLxLxxNxLxG-----xIPxx	10
PGIP	LxxLKxLxxLdLSxNxLxG-----xIPxx	10
PLK5	LxxLxxLxxLxLxxNxLSG-----xIPxx	21
Cf-2.1	LGNLxxLxxLxLxxNxLxG-----SIPxx	36
Cf-9	LxxLxxLxxLDLSSNNLxG-----xIPSx	28
Xa21	LxxLxxLxxLDLSSNNLxG-----xIPxx	23
Br11	axxxxxLxxLxLSxNxaSG-----xIPxx	25
CLAVATA 1	axxaxxLxxLxLxxNxLxG-----xIPxx	23
ERECTA	axxaxxLxxLxLxxNxLxG-----xIPxx	20
SLRP	axxlxxLxxLxLxxNxIxx-----xIPxx	20
PRI	xxxLLxxLxLxxc/N. xLxxxgaxxLLxxaLxx	15

Comparación de los motivos LRR de FLOR 1 con otras proteínas LRR. Se coloca una x para cualquier aminoácido, a indica un residuo alifático (L,I,F,V,M), donde la isoleucina es la mas representada y se indica con I. Se coloca S para S o T, D para un residuo ácido (D o E). Cf son producto de genes de resistencia de tomate y arroz. RLK5, BR11, CLAVATA y ERECTA son productos de genes relacionados con el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. SLRP son pequeños proteoglicanos ricos en leucina que incluyen a la decorina, biglicano, fibromodulina, osteoaderina, apifiglicano y la osteoglicano. PRI es el inhibidor de ribonucleasa porcina.

Muchas de las proteínas tipo FLOR 1 son supuestamente extracelulares, esto es por la presencia del peptido señal responsable de la compartimentalización extracelular (Kajava, 1998), es aquí donde surge la pregunta ¿ Como puede FLOR 1 interactuar con el factor de

transcripción *AGAMOUS*? Son varios los requisitos que se deben de cumplir para que la interacción *in vitro* mostrada por la columna de afinidad entre ambas proteínas ocurra de manera fisiológica, una de ellas es la coincidencia espacial y temporal de ambas proteínas en diferentes tejidos y compartimentos celulares. Los patrones de expresión de *AGAMOUS* han sido cuidadosamente documentados (Bowman et al; 1991). En el desarrollo temprano de la flor AG se expresa en los primordios del tercer y cuarto verticilio (los cuales dan origen al estambre y al carpelo), pero no se encuentra en el primordio de sépalos ni de pétalos. Cuando la flor madura *AGAMOUS* se expresa solo en tipos celulares específicos del estambre y el carpelo. En estambres *AGAMOUS* se expresa en toda la pared de la antera pero principalmente en el tapetum y el tejido conectivo y está ausente en los granos de polen y el tejido vascular. En el carpelo *AGAMOUS* se expresa en las células de la papila estigmática, placenta, óvulos pero está ausente en el tejido de conducción del septo. Los resultados de hibridación *in situ* para caracterizar los patrones de expresión de *FLOR 1*, muestran que se expresa en el meristemo floral, después en el estadio 7 y 8, la expresión de *FLOR 1* es específica de primordios de estambres y carpelo y por último, en estadios avanzados del desarrollo *FLOR 1* se expresa en toda la antera excepto los granos de polen, mientras que en los carpelos la expresión de *FLOR 1* se restringe a la placenta y a los óvulos. De cualquier modo esta información es parcial, puesto que buscamos la interacción entre los productos de ambos genes y no entre sus mensajeros. En este sentido las técnicas inmunohistoquímicas se perfilan como las herramientas más adecuadas para establecer la coincidencia espacial y temporal de los componentes del sistema de interacción, ya que con este sistema, en asociación con estudios bioquímicos y fisiológicos se pueden establecer los patrones de acumulación espacial y temporal de las proteínas durante la diferenciación tisular.

## **Material y Métodos.**

**Especie de estudio:** *Arabidopsis thaliana* ( ecotipo Columbia)

### **Descripción de la anatomía y desarrollo del estambre de *Arabidopsis thaliana*.**

Los procesos reproductivos masculinos en las angiospermas tienen lugar en el estambre (Esau, 1977). Este sistema organográfico esporofítico contiene células diploides que sufren meiosis y producen esporas haploides masculinas o microesporas. Las microesporas se dividen mitóticamente y se diferencian en un gametofito masculino o grano de polen (Goldberg et al, 1993).

Los étambres constan de dos partes morfológicamente distintas, la antera y el filamento. El filamento es un tubo de tejido vascular que ancla al estambre con el receptáculo de la flor y sirve como conductor de agua y nutrientes. La antera contiene tejido vegetativo y tejido reproductivo que son responsables de producir y liberar los granos de polen para llevar a cabo la polinización de la planta (Goldberg et al, 1993).

El desarrollo de la antera puede dividirse en dos fases generales. Durante la primera fase se establece la morfología de la antera, ocurre una diferenciación celular y tisular y la célula madre de la microespora sufre meiosis, al final de esta fase la antera contiene la mayoría de los tejidos especializados y las tétradas de polen están presentes en el lóculo de la antera. En la fase dos los granos de polen se diferencian, el filamento se alarga, se lleva a cabo la diferenciación tisular, ocurre la dehiscencia y se libera el grano de polen (Goldberg et al, 1993).

En *Arabidopsis thaliana* los primordios de los seis estambres se forman en el estadio 5 por divisiones periclinales de la subepidermis. En el estadio 8 hay un engrosamiento y en el estadio 8 los lóculos ya son aparentes. Los tejidos altamente diferenciados llevan a cabo funciones no reproductivas por ejemplo el soporte y la dehiscencia (Goldberg et al; 1993). El tejido no reproductivo incluye la epidermis, endotecio, tapetum, tejido conectivo, capas medias, y haces vasculares (Esau, 1977).

Células y/o tejidos de la antera	Principal función (*)
Tejido conectivo	Conecta a la antera con el filamento; estructura y morfología.
Endotecio	Estructura, soporte y dehiscencia.
Epidermis	Estructura y soporte; dehiscencia.
Microesporas	Desarrollo del grano de polen y células esperáticas.
Capas medias	Estructura y soporte; dehiscencia.
Estomio	Dehiscencia.
Tejido vascular	Conexión entre la antera, el filamento y la flor; abastecimiento de agua y nutrientes.

(\*) Tomado de Esau (1977).

### **Descripción de la formación de la pared de la antera y microesporogénesis de *Arabidopsis thaliana*.**

La microesporogénesis de *Arabidopsis thaliana* presenta el patrón típico de las dicotiledoneas (Misra; 1962; Bhandari; 1984; Sanders et al; 1999). En el estadio 7 del desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana*, las células hipodérmicas se expanden radialmente y se diferencian en células arquesporales (Sanders et al; 1999). Las células arquesporales sufren divisiones periclinales y dan origen a una capa externa de células parietales primarias y una capa de células esporógenas primarias. Después en las subsecuentes divisiones periclinales y anticlinales se forman dos capas de células parietales secundarias. Las capas internas de las células parietales secundarias se diferencian en tapetum, mientras que la capa externa de células parietales secundarias sufre una o mas divisiones periclinales que forman el endotecio y las capas medias. Al mismo tiempo, las células esporógenas primarias se diferencian en microesporocitos o células madres del polen y estas empiezan a

aislarse unas de otras por la deposición de calosa sobre la pared y sufren meiosis para generar las microesporas (Owen & Makaroff 1995).

### **Descripción de la anatomía y del desarrollo del carpelo de *Arabidopsis thaliana*.**

El carpelo o pistilo maduro de *Arabidopsis thaliana* está constituido por tres partes: el ovario que es la base del pistilo; el cual contiene los óvulos y estos a su vez se diferencian en frutos después de la fertilización; el estilo, que es una extensión de tejido a través del cual se desarrolla el tubo polínico hacia el óvulo; y el estigma, que se encuentra en la región distal del estilo, donde el grano del polen se adhiere y germina (Esau, 1977).

Durante las primeras etapas del desarrollo del carpelo ocurre la determinación celular en la parte central del meristemo floral. En la segunda fase, ocurre la diferenciación celular y de esta manera los carpelos adquieren forma de una cúpula superficial. En la tercera fase se forman dos columnas longitudinales que dan al carpelo la forma de un cántaro con una abertura adaxial. Los lóculos del carpelo se unan en sus márgenes y se fusionan. Seguida de la fusión de los márgenes, los óvulos se forman en la placenta (Raghavan, 1997).

El carpelo comparte tejidos con el cuerpo vegetativo de la planta, que son necesarios para el soporte, nutrición y protección. Estos tejidos incluyen el de reserva, el vascular y la epidermis. Sin embargo, los tejidos mas interesantes para estudiar son los intrínsecos del carpelo, como son el tejido estigmático y el de conducción (Gasser et al; 1993). Estos tejidos son responsables de capturar el grano de polen y facilitar el paso del tubo polínico a los óvulos respectivamente (Esau, 1977). Las células del tejido de transmisión están organizadas en filas verticales unidas entre sí por uniones tipo plasmodesmos (Gasser et al; 1993). Estas células son altamente secretoras y la presencia de una secreción mucilaginosa al igual que la matriz estilar son atributos del tejido estilar altamente diferenciados. En *Arabidopsis thaliana*, el tracto de transmisión se extiende a lo largo de la región estilar y del septo facilitando al tubo polínico acceder a los óvulos (Gasser et al, 1993).

La región superior del estilo se diferencia en una estructura altamente secretora: el estigma. Este proceso incluye la proliferación celular, la existencia de células epidérmicas de varias longitudes dentro de la papila, y la secreción de compuestos involucrados en el rechazo del polen incompatible o promover la germinación del polen compatible (Bouman, 1984). Las secreciones también tienen propiedades adhesivas que facilitan la captura del

grano de polen del aire o los animales polinizadores. El tejido estigmático es contiguo con el tejido de transmisión, proveyendo una ruta ininterrumpida para el crecimiento del tubo polínico ( Gasser et al; 1993).

Los óvulos residen en el ovario y estos, por sí solos, constituyen una estructura muy compleja donde se llevan a cabo los procesos de megaesporogénesis y megagametogénesis. Estos procesos han sido ya descritos en muchos reportes y revisiones (Misra, 1962; Reiser & Fisher. 1993; Schneitz et al, 1995; Angenet & Colombo, 1996; Drews et al, 1998; Gasser et al, 1998; Grossinklaus & Schneitz 1998; Schneitz et al, 1998). *Arabidopsis thaliana* posee un óvulo bitégmico y tenuinucelado, que aparece sobre la placenta del ovario, en el estadio 10 del desarrollo floral. En el estadio 10 y 11 se forma una célula arqueporial a partir de una sola célula hipodérmica en la punta del primordio del óvulo, siendo más prominente que las células vecinas por su gran tamaño, citoplasma denso y núcleo conspicuo. En *Arabidopsis thaliana* la célula arqueporial se elonga longitudinalmente y se polariza diferenciándose directamente en una célula madre de la megaespora (Willemse, 1981; Grossinklaus & Schneitz, 1998). La célula madre de la megaespora sufre meiosis y genera una tétrada donde la megaespora calazal se convierte en una megaespora funcional, mientras que las tres esporas de la región micropilar sufren una muerte celular programada (Webb & Gunning 1990). Inmediatamente que la célula arqueporial se hace visible, se forma el integumento externo e interno a partir de las células epidermales de la base de la nucela. El integumento externo envuelve al integumento interno y el interno envuelve a la nucela, en la cual se desarrolla el megagametofito o saco embrionario. En el estadio 13 del desarrollo floral, la capa de células del integumento interno se diferencia en un endotelio nutritivo y la nucela es reabsorbida (Yang et al; 1999).

### **Producción de anticuerpos policlonales e inmunocalización**

El procedimiento de la inmunocalización involucra: la obtención del anticuerpo, preparación del espécimen, incubación del espécimen con el anticuerpo primario, remover los anticuerpos que se pegaron de manera inespecífica y la localización de los anticuerpos que se unieron inespecíficamente.

Durante las dos décadas pasadas, los métodos inmunológicos de laboratorio se convirtieron en una herramienta poderosa en biología celular y bioquímica. La creciente importancia de las inmunoglobulinas en investigaciones celulares, viene de la gran cantidad

de artículos publicados en *Journal of Cell Biology*, en los cuales, los anticuerpos fueron usados para resolver problemas que hubieran sido difícil o imposible de responder por otro método. En 1970 solo el 1% de los trabajos realizados emplearon métodos inmunológicos, en 1980 el 30 % y el 70% para 1990. Las técnicas inmunológicas gozan de una amplia aplicación en investigaciones celulares debido a su alta especificidad y sensibilidad, lo cual permite la detección selectiva, aislamiento y cuantificación de moléculas a niveles menores de nanogramos. La ventaja principal de los anticuerpos es que pueden ser producidos virtualmente contra cualquier molécula con un Mr menor a 1000, siempre y cuando se presenten de manera adecuada al sistema inmune.

Las técnicas dependientes de anticuerpos que más frecuentemente se usan en biología celular son: (i) visualización de macromoléculas en tejidos y células por técnicas inmunohistoquímicas, (ii) identificación de proteínas en electroferogramas por técnicas de inmunoblotting, (iii) aislamiento de proteínas por inmunoprecipitación y (iv) determinación cuantitativa de proteínas por inmunoensayo. Otras técnicas inmunológicas importantes en biología celular, es la microinyección de anticuerpos a células para bloquear la actividad de proteínas individuales, sus ensamblajes supramoleculares y el uso de anticuerpos en el estudio de interacción para mapeo y definición de sitios funcionales en proteínas.

El éxito de las aproximaciones inmunológicas, está basado en gran parte es la especificidad, reactividad cruzada y afinidad de los anticuerpos disponibles. Dependiendo de la pregunta que se quiere responder, uno debe tomar ciertas decisiones con respecto al antígeno empleando para inmunización y los procedimientos para titular y medir la especificidad de los anticuerpos producidos.

**Esquema general de la producción de anticuerpos policlonales e inmunolocalización de FLOR 1 en diferentes etapas del desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana*.**

Purificación de 1 gr de proteína FLOR 1 empleando un columna de afinidad (Apéndice-1).



Corrimiento de geles de acrilamida y cortado de bandas para emulsificarlas con Adyuvante de Freund (Apéndice-2).



Aplicación del protocolo rutinario de inmunización de conejos por vía escapular (Apéndice-3).



Sacrificio, desangramiento y almacenamiento del suero (Apéndice-4)



Purificación de la fracción gama-globulínica por precipitación con sulfato de amonio (Apéndice-5)



Titulación del anticuerpo y pruebas de reactividad cruzada del por dot-blotting y Western blotting respectivamente (Apéndice-6)

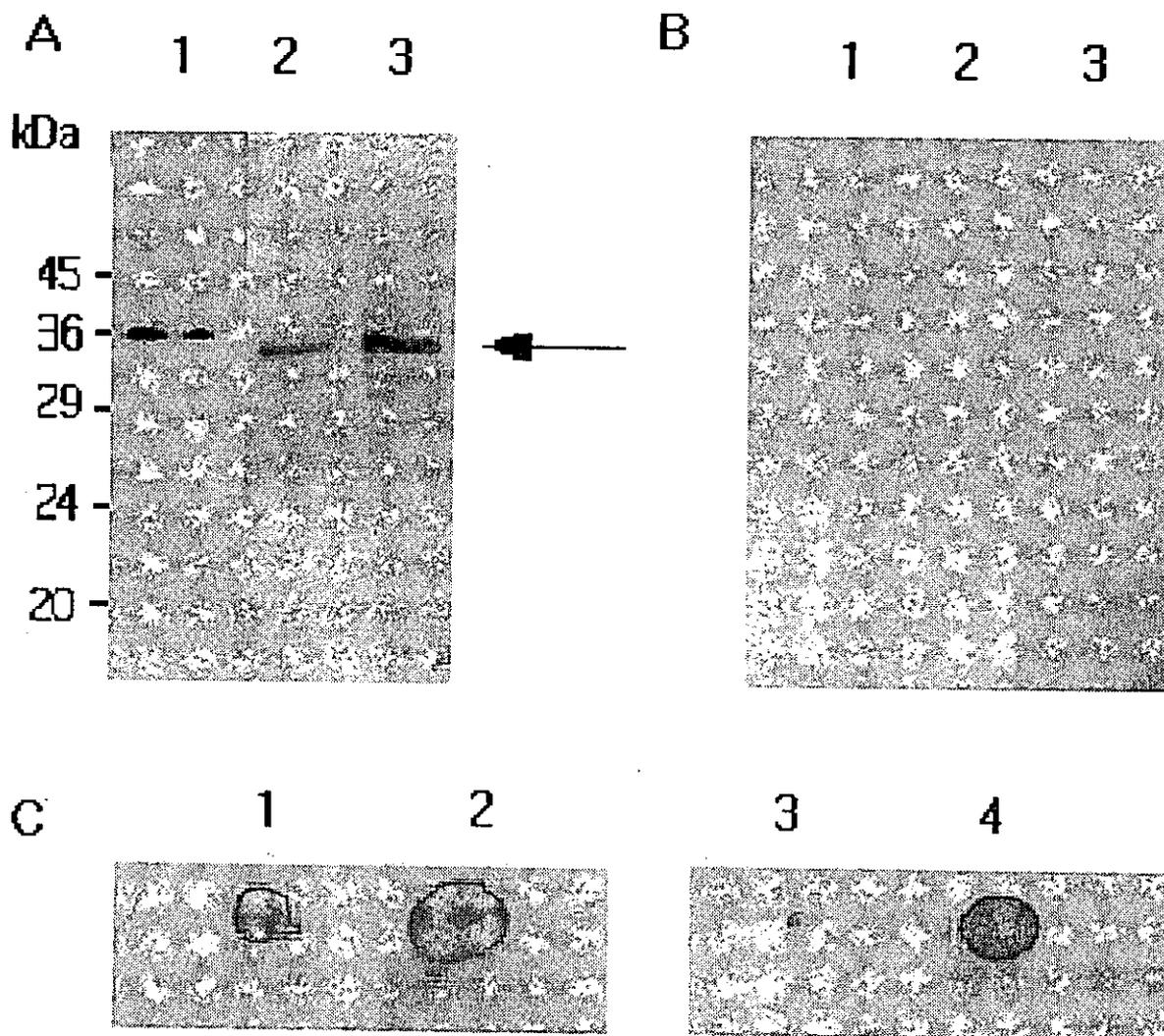


Fijación e inclusión de las muestras ( flores de *Arabidopsis thaliana*) en parafina (Apéndice-7)



Inmunolocalización de FLOR 1 en diferentes etapas del desarrollo floral empleando el sistema de detección ABC (DAKO) (Apéndice-8)

## Resultados (caracterización del anticuerpo policlonal contra FLOR 1)



**Figura 1.** Caracterización del anticuerpo contra FLOR 1.

- (A) Pruebas de reactividad cruzada por Western blotting empleando extracto crudo de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana*, proteína recombinante expresada en *E. coli*, y proteína recombinante purificada con la columna de NiNta.
- (B) Control negativo, donde los tres extractos anteriores fueron incubados con suero preinmune.
- (C) Titulación del anticuerpo con proteína FLOR 1 purificada a partir de la columna de afinidad que posee el decapeptido derivado del dominio MADS de AGAMOUS.

## **Resultados (caracterización del anticuerpo policlonal contra FLOR 1)**

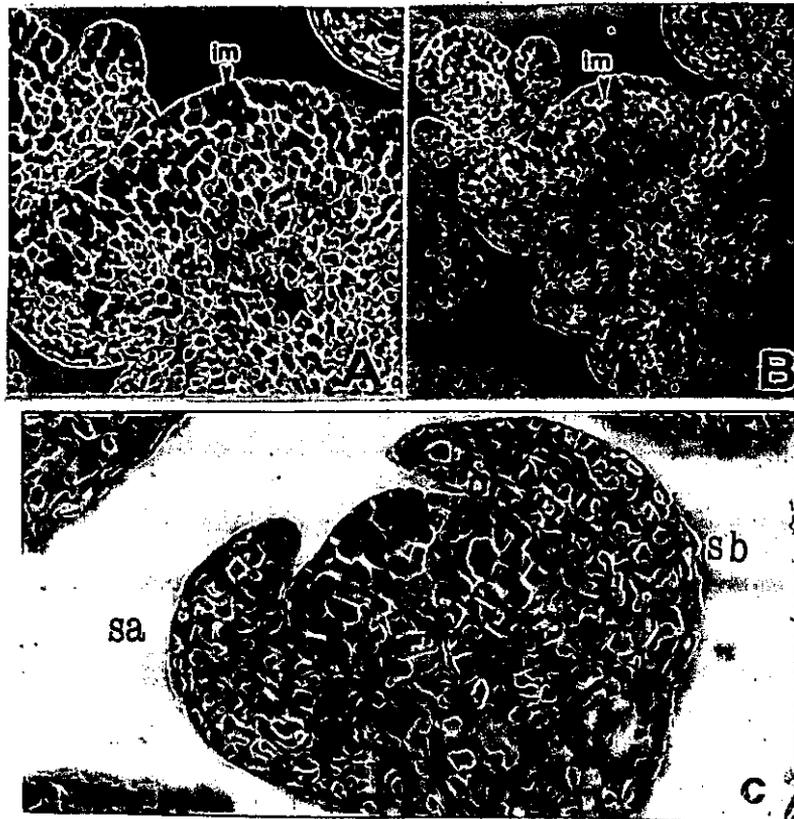
### **Titulación y pruebas de reactividad cruzada del anticuerpo contra la proteína FLOR 1.**

La fracción gamma-globulínica del suero de la coneja, que fue inoculada con la proteína FLOR1, se obtuvo mediante el protocolo de precipitación con sulfato de amonio, después de la aplicación de las tres inyecciones potenciadoras empleando como fuente de antígeno la proteína purificada a partir de la columna de afinidad que posee el decapeptido derivado de la caja MADS de AGAMOUS. La titulación del anticuerpo y la prueba de especificidad del suero se hizo por dot blotting y Western blotting respectivamente (Fig. 1)

Para la titulación del anticuerpo se emplearon diferentes concentraciones de proteínas adsorbidas en nitrocelulosa e incubadas con diferentes diluciones del anticuerpo. En la figura 1-C la muestra 1 corresponde a 10 ng y la muestra 2 a 100 ng de proteína incubadas con un anticuerpo en una dilución 1: 500, por otra parte las muestras 3 y 4 corresponden a 10 y 100 ng respectivamente de proteína incubadas con anticuerpo diluido 1:1000. En experimentos no mostrados se corroboró que el anticuerpo reconoce 100 ng de proteína en una dilución 1:2000. El anticuerpo tiene un alto grado de especificidad como lo muestran las pruebas de reactividad cruzada, empleando Western blotting. En este caso se corrieron tres extractos proteicos diferentes, en la figura 1 A se muestra un extracto crudo de proteínas de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana*, en la figura A2 un extracto crudo de *Escherichia coli* con la capacidad de expresar a la proteína recombinante de FLOR 1 y en la figura A 3 la proteína recombinante purificada a partir de una columna de NiNta. En los tres casos las muestras fueron incubadas con el anticuerpo contra FLOR 1 en una dilución 1:500: y reveladas por medio del sistema de inmunodetección ECL (Amersham). El anticuerpo tiene la capacidad de reconocer solo una banda de aproximadamente 38 KDa que coincide con el peso molecular de la proteína FLOR 1. Como control negativo (Fig. 1-B 1,2 y 3). Los tres extractos proteicos se incubaron con suero preinmune y revelados bajo las mismas condiciones. En ninguno de los tres extractos es reconocida ninguna banda, lo que revela, que previo a la inoculación, la coneja no había generado anticuerpos contra FLOR 1 u otra proteína que presentara algún epitope compartido, mostrándose así la alta especificidad del anticuerpo.

## Resultados (inmunolocalización de FLOR 1 en diferentes etapas del desarrollo floral).

Para poder investigar la distribución de FLOR 1, se hicieron estudios de inmunolocalización sobre cortes de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* en diferentes etapas del desarrollo floral. Para este fin las muestras fueron fijadas e incluidas en parafina, como está descrito en materiales y métodos. Los diferentes cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (previamente caracterizado) y se revelaron con anticuerpos secundarios biotinilado.



**Figura 1.** Distribución de FLOR 1 durante las etapas tempranas del desarrollo floral.

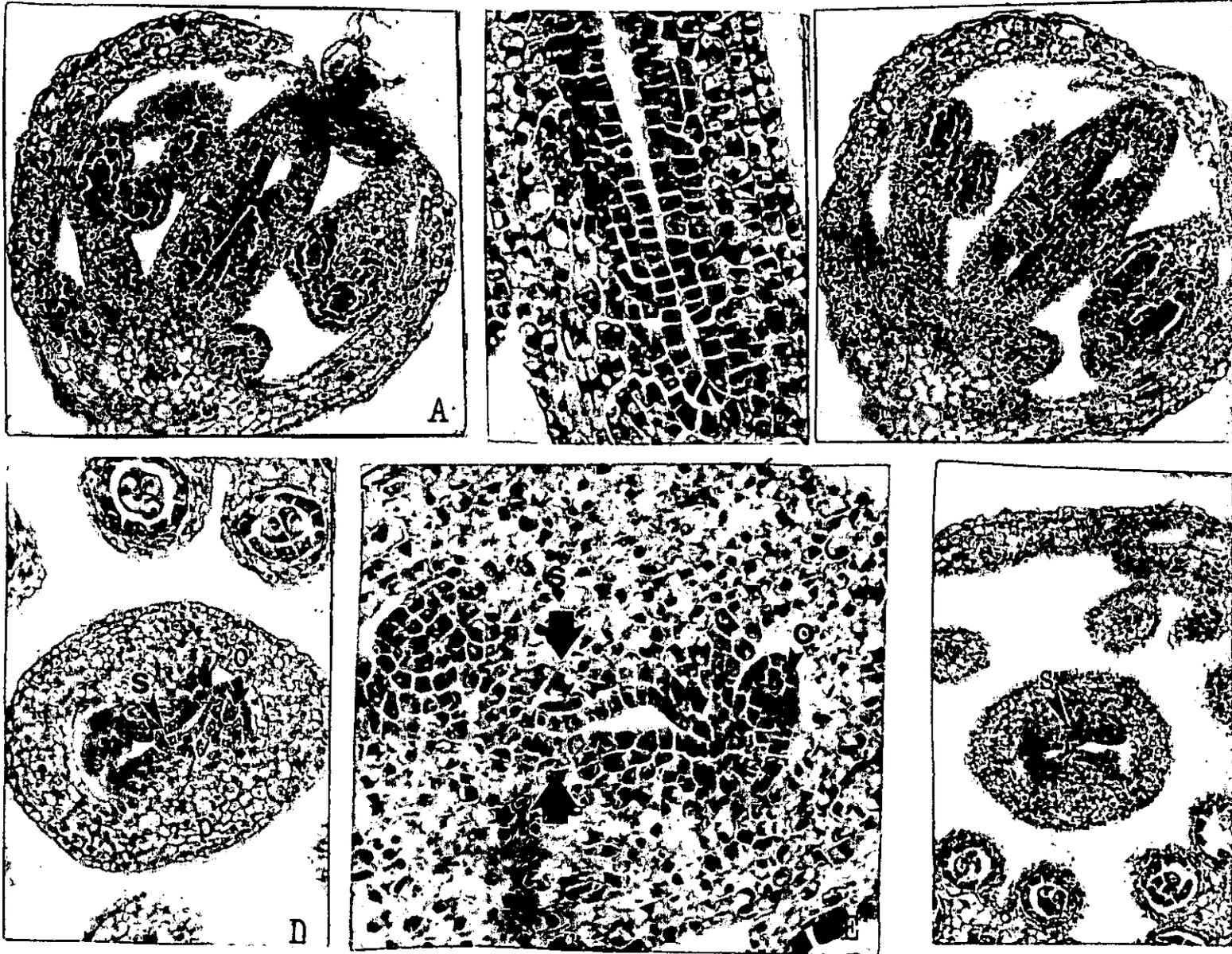
(A) Corte longitudinal de meristemo inflorescente (estadio 1).(40x)

(B) Control negativo.(40X)

(C) Corte longitudinal de un primordio floral cuando aparecen los primordios florales.  
(estadio4)(40X)

Nota: Los controles negativos fueron incubados con suero preinmune.

Abreviaciones: im: meristemo inflorescente, sa, sépalos adaxiales; sb, sépalos abaxiales



**Figura 2.** Inmunolocalización de FLOR 1. Estadios tempranos del desarrollo del carpelo.

(A) Corte longitudinal de carpelo (estadio 8) donde el carpelo es un cilindro bien formado y el tejido esporógeno es evidente.(10x).

(B) Corte longitudinal del carpelo (estadio 8) (40x).

(C) Control negativo(10x).

(D) Corte transversal del carpelo, (estadio 9), aparecen los primordios de óvulos (20x).

(E) Corte transversal del carpelo (estadio 9) (40X).

(F) Control negativo (20x).

Abreviaturas: o, óvulo; s, septo, p, placenta.

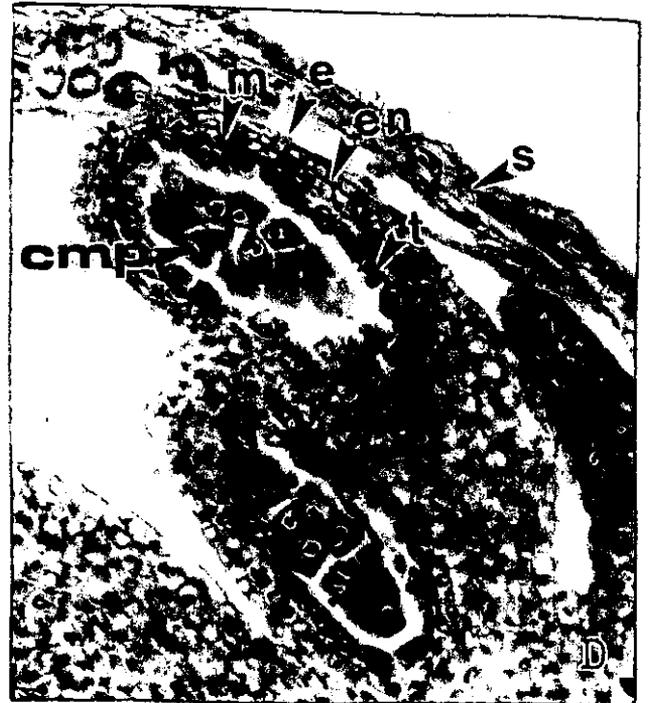
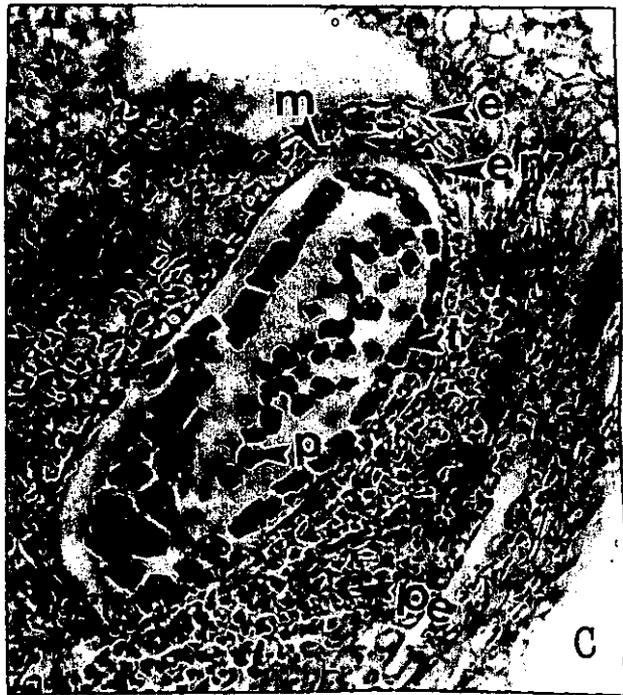
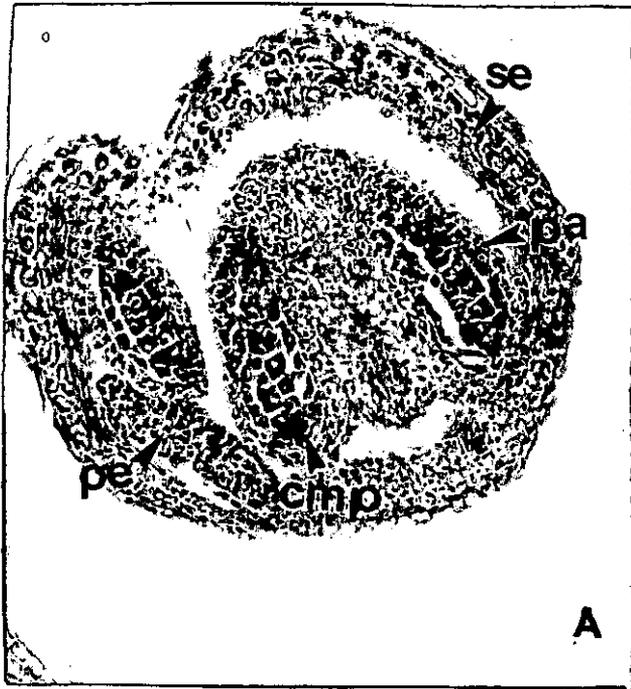


Figura 3. Distribución de FLOR 1 a lo largo del desarrollo de la pared de la antera.

- (A) Corte longitudinal de antera, estadio 6 del desarrollo de la pared de la antera, donde las células esporógenas primarias se diferencian en un micropesporocito o célula madre del polen, y estas se aíslan entre sí por la deposición de calosa en la pared celular (10 x).
- (B) Corte longitudinal de antera, estadio 7 del desarrollo de la pared de la antera, la célula madre del polen sufre meiosis, generando una tétrada de microesporas (40x).
- (C) Corte longitudinal de la antera, en el estadio 8 del desarrollo de la pared de la antera, la calosa que rodea a la tétrada es reabsorbida, liberando una microespora individual, concomitantemente el tapetum aparece binucleado y las microesporas están libres en el saco polínico (40x).
- (D) Control negativo (40x).

Abreviaturas: se, sépalo; p, polen, pa, pared de la antera; cmp, célula madre del polen, pe, pétalo; en, endotecio; t, tapetum, m, capas medias, e, epidermis,

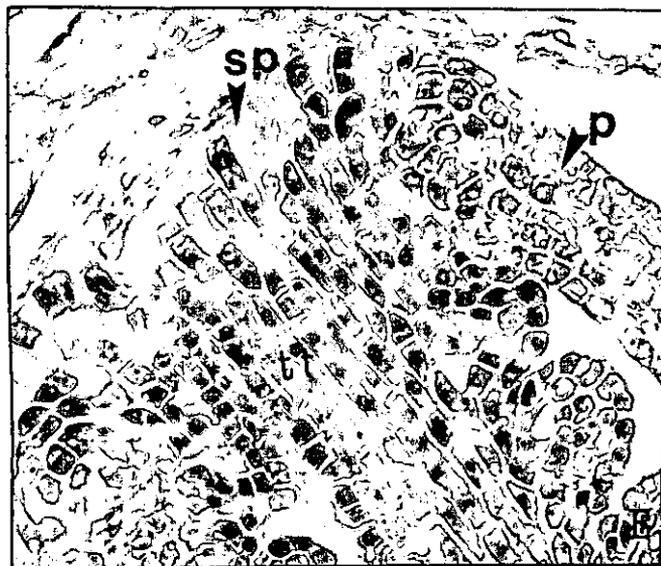
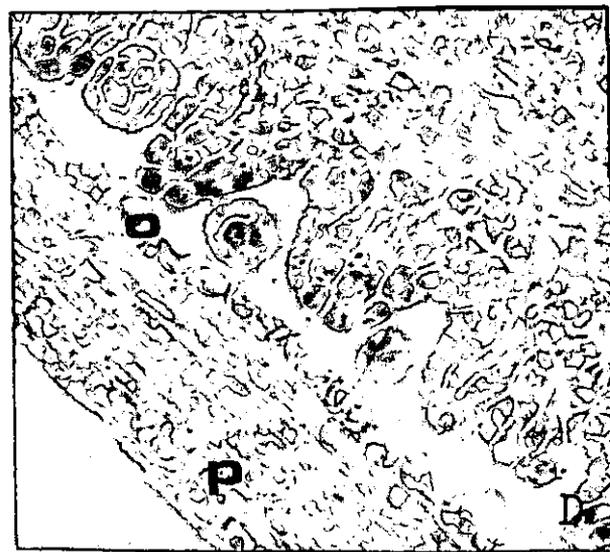
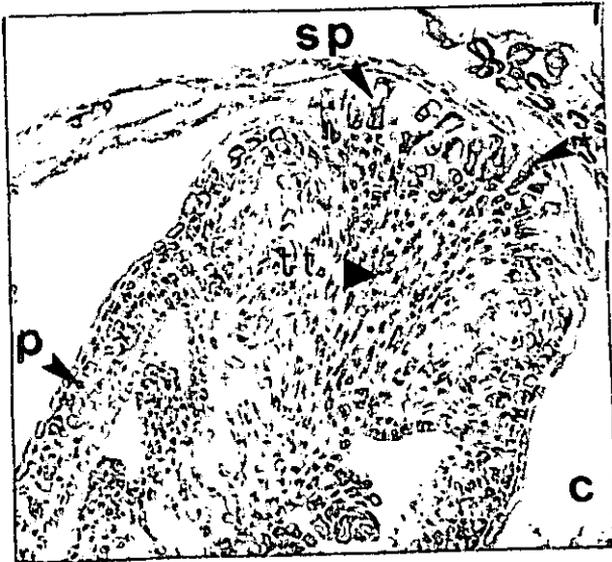
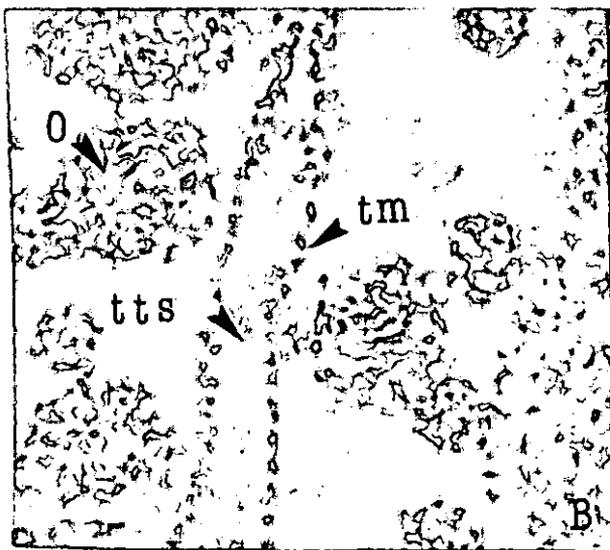
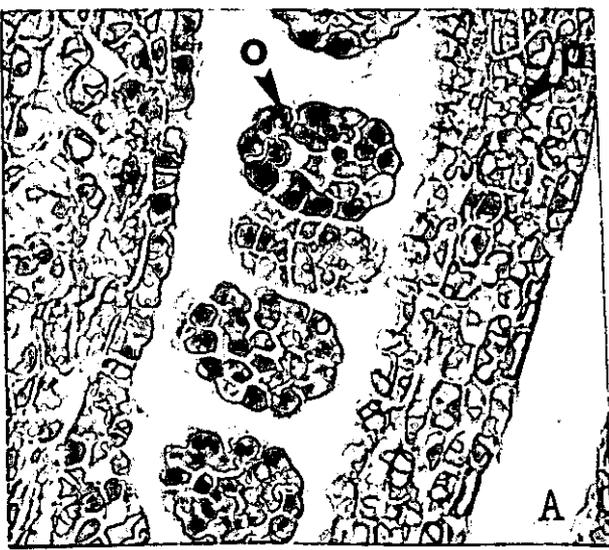


Figura 4. Expresión de FLOR 1 en tipos celulares específicos del carpelo.

- (A) Inmunolocalización de FLOR1 en cortes longitudinales de óvulos (40x).
- (B) Inmunolocalización de FLOR 1 en cortes longitudinal del tejido de conducción del septo y los óvulos (40x).
- (C) Inmunolocalización de FLOR 1, se aprecia la papila estigmática (40x).
- (D) Control negativo de corte longitudinal de óvulos (40x).
- (E) Control negativo de corte longitudinal de papila estigmática (40x).

Abreviaturas: o, óvulo, tt, tejido de transmisión, sp, papila estigmática, es, estigma, tts, tejido de transmisión del septo, tm, tejido marginal, p, placenta,

### **Localización de FLOR 1 durante estadios tempranos del desarrollo floral.**

Durante etapas tempranas del desarrollo floral, FLOR 1, se expresa en el meristemo inflorescente, preferencialmente en las regiones de la L1, L2 (túnica) y un poco L3 (corpus), así como en las regiones periféricas del meristemo que dan origen al meristemo floral (Figura 1), Conforme avanza el desarrollo FLOR 1 se expresa en el domo central del meristemo floral, región que dará origen a estambres y carpelos, también en los primordios de sépalos, tanto adaxiales como abaxiales (Figura 1C). En datos no mostrados se observó que FLOR 1 no se expresa en ninguna etapa del desarrollo de los pétalos. En etapas posteriores del desarrollo del carpelo, previo a la formación del óvulo, las divisiones celulares anticlinales de la L1 y L2 generan un alineamiento con una apariencia muy uniforme, en la zona central de la invaginación, en las células de organización tabicada la expresión de FLOR 1 es generalizada (Figura 2 AB), posteriormente, las divisiones periclinales de las células subepidérmicas dirigen la invaginación central (mostrada por flechas) que marcan el inicio de la formación del óvulo y de 1 septo (Figura 2 DE), en este estadio FLOR 1 se expresa en el septo incipiente, en los primordios de óvulo y en la placenta, en esta zona la marca es preferencialmente nuclear (Figura 2 E).

### **Localización de FLOR 1 durante la formación de la pared de la antera y el desarrollo del microgametofito.**

La microesporogénesis del fenotipo silvestre de *Arabidopsis thaliana*, sigue el patrón típico de las dicotiledoneas. En el estadio 7 del desarrollo floral y 2 del desarrollo de la antera, las células hipodermales se expanden radialmente y se diferencian en una célula arqueosporial, En el estadio tres del desarrollo de la antera las células arqueosporiales sufren divisiones periclinales y dan origen a una capa interna de células de tejido esporógeno primario y una capa externa de células parietales primarias. En el estadio 4 del desarrollo de la antera las divisiones periclinales subsecuentes forman dos capas de células parietales secundarias. En el estadio 5 del desarrollo de la antera, las células parietales internas se diferencian en un tapetum, mientras que las células parietales externas sufren mas de una división periclinal para formar el

endotecio y las capas medias. A lo largo de estos procesos FLOR 1 se expresa de manera generalizada en el primordio del estambre (datos no mostrados). En el estadio 6 del desarrollo de la pared de la antera, las células esporógenas primarias se diferencian en un microesporocito o célula madre del polen y estas se aíslan entre sí por el depósito de calosa en la pared celular, en este estadio FLOR 1 se expresa en epidermis, endotecio, capas media y taptum, pero no en la célula madre del polen (Figura 3 A). Posteriormente, el estadio 7 del desarrollo de la antera, las células madres del polen sufren meiosis generando una tétrada de microespora, FLOR 1 se localiza en tejido vegetativo pero no en la tétrada (Figura 3 B) y por último en el estadio 8 la calosa que rodea a la tétrada es reabsorbida liberando una microespora individual, en este estadio FLOR 1 se expresa de manera preferencial en el citoplasma del tapetum, y disminuye su expresión en los otros tejidos de la pared de la antera, en este momento se puede apreciar la naturaleza binuclada del tapetum, teñido solo por la hematoxilina. (Figura 3C). De esta manera FLOR 1 se expresa en el tejido vegetativo de la antera pero nunca en el microgametofito. En etapas posteriores del desarrollo del microgametofito, la microespora sufre mitosis para formar el núcleo vegetativo y el núcleo generativo, además de que el grano de polen desarrolla sus ornamentaciones típicas, finalmente ocurre la dehiscencia de la antera y se libera un grano de polen funcional. FLOR 1 sigue el mismo patrón (datos no mostrados) en el que se expresa solo en tejido vegetativo pero nunca en el grano de polen en desarrollo.

### **Localización de FLOR 1 en tejidos específicos del carpelo.**

El carpelo maduro de *Arabidopsis thaliana* está constituido por tres partes: el ovario, en la región basal, que contiene los óvulos y estos a su vez se diferencian en frutos y semillas después de la fertilización; el estilo, que conforma una extensión de tejido, a través del ovario, por el cual se desarrolla el tubo polínico hacia el óvulo y por último, el estigma que se encuentra en la región distal del estilo donde se adhiere el grano de polen y germina. El carpelo comparte tejido con el cuerpo vegetativo de la planta, que son necesarios para el soporte, protección y nutrición, estos tejidos incluyen los de reserva, vascular y epidermis sin embargo, los tejidos más interesantes son los intrínsecos del carpelo, como el estigmático, el de conducción y estructuras complejas como los óvulos.

FLOR 1 se expresa en tipos celulares específicos del carpelo como los óvulos, unidad organográfica donde se llevan a cabo los procesos de la megasporogénesis, en

este órgano la expresión es generalizada ( Figura 4 A), en la región de la placenta, la marca es preferentemente nuclear.

El tejido de transmisión se extiende por la región estilar y a lo largo del septo, facilitando al polen acceder a los óvulos. FLOR 1 se expresa en el tejido de transmisión del estilo, en el tejido de los márgenes del septo, que posee la misma naturaleza celular de la placenta ( sitio donde si se expresa FLOR 1), pero no en el tejido de transmisión del septo ( Figura 4B). Por último FLOR 1 también se expresa en la papila estigmática (Figura 4C), cuya principal función es la secreción de compuestos involucrados en el rechazo del polen incompatible, o promover la germinación del polen compatible.

## **Discusión.**

Los datos arrojados por la caracterización de los anticuerpos, sugieren que FLOR 1 es una proteína altamente antigénica. Esto es por la potencia del reconocimiento del anticuerpo ( puede reconocer 100 ng de proteína en una dilución 1:2000 y 5 ng de proteína en una dilución 1:1000) y por su alto grado de especificidad, solo reconoce una banda de 38 KDa en un extracto proteico crudo de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* y la proteína recombinante expresada en *E. coli*, tanto en extracto crudo de bacteria como la proteína purificada por la columna de NiNta. Esto es una evidencia indirecta de que los epitopes, contra los cuales se crearon los anticuerpos son muy específicos, y no se encuentran en otras proteínas del extracto crudo de plantas ni de bacterias, a menos que existan isoformas con pesos moleculares iguales y diferencias muy sutiles que no los anticuerpos no puedan detectar. Por otra parte se debe tomar en cuenta que estamos trabajando con un suero policlonal donde diferentes clones de linfocitos generan anticuerpos contra diferentes sitios de la proteína. Se estima que una proteína del tamaño de FLOR 1 genere anticuerpos contra 4 o 5 sitios de toda la proteína. Todas estas características perfilan a FLOR 1 como una herramienta confiable en técnicas inmunohistoquímicas.

### **Regulación de la expresión genética de FLOR 1 ( coincidencia espacial y temporal del mRNA y la proteína en diferentes tipos celulares).**

Las técnicas inmunohistoquímicas en conjugación con la localización del mRNA, nos permiten determinar si la traducción de los transcritos es contrascriptoral, o bien, si existen tejidos o tipos celulares que actúen como reservorios de mRNA, que no se traducen en el momento de su transcripción, sino en estadios posteriores del desarrollo, tal como ocurre con muchas proteínas involucradas en procesos morfogénicos. El patrón de expresión de *FLOR 1* fue determinado por hibridación *in situ* empleando cortes histológicos. Tanto el mRNA de FLOR 1 como la proteína se expresan en etapas tempranas del desarrollo floral; cuando emerge el meristemo inflorescente FLOR 1 se localiza preferentemente en los derivados histológicos de la túnica (L1 y L2) y menos en el corpus (L3), mientras que el mensajero se localiza preferentemente en el corpus. En etapas posteriores del desarrollo, cuando emerge el meristemo floral y aparecen los primordios de los órganos, el mRNA

y la proteína, se localizan de manera generalizada en los primordios del tercer y cuarto verticilio (estambres y carpelos respectivamente). Posteriormente cuando ocurre la diferenciación tisular de las estructuras reproductivas, ambas moléculas se restringen a tipos celulares específicos, definidos en la siguiente tabla.

#### ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO FLORAL.

Estructura	mRNA	Proteína
Meristemo Apical (SAM)		
Túnica (L1, L2)	-	+
Corpus (L3)	+	+
Meristemo Floral		
Primordio de sépalo	-	+
Primordio de pétalo	-	-
Primordio de estambre	+	+
Primordio de carpelo	+	+

#### ESTAMBRE.

Tejido	mRNA	Proteína
Tejido conectivo	+	+
Endotecio	+	+
Epidermis	+	+
Microesporocito	-	-
Tétrada	-	-
Microgametofito maduro	-	-
Capas medias	+	+
Tapetum	+	+
Filamento de la antera	+	+ *

\*: la marca aparece generalizada excepto en el tejido vascular, donde no hay marca.

## CARPELO

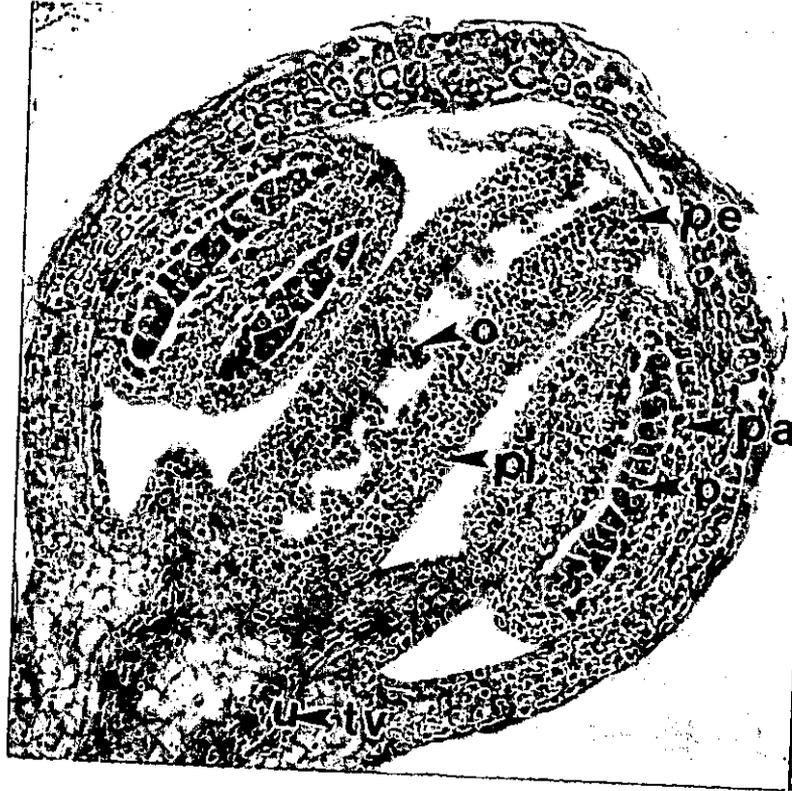
Tejido	mRNA	Proteína
Pared del ovario	+	+
Placenta	+	+
Óvulo	+	+
Papila estigmática	-	+
Tejido de conducción del septo	-	-
Estigma	+	+

De acuerdo a estos resultados tanto el mensajero como la proteína se expresan en diferentes tipos celulares con diversos grados de diferenciación, por lo que no es una proteína de un tipo celulares específico. Por otra parte FLOR 1 se traduce y se transcribe concomitantemente a lo largo del desarrollo, es decir, que la traducción ocurre en el mismo tipos celulares que se transcribe el mensajero, excepto en las tres capas clonales del meristemo inflorescente, donde la expresión del mensajero se observa en el corpus pero no en la túnica, sin embargo el anticuerpo revela como positivo en la túnica. Se ha descrito previamente ( Rinne & van der Shoot 1999) que en el meristemo, las células están interconectadas entre sí, vía plasmodesmos, que pueden ser utilizados para el intercambio de moléculas. Estas células pueden actuar como un sincicio con citoplasma continuo llamado sinplasma. Inyectando tinciones marcadoras en las capas externas, se ha determinado que existe una un campo simplásmico que podría restringir la difusión de moléculas morfógenas, a sus respectivos límites. De esta manera FLOR 1 podría se catalogada como una proteína morfógena cuyo mensajero se expresa preferencialmente en el corpus, ahí se traduce y es exportada a las capas L1 y L2, vía plasmodesmos, donde solo se almacena FLOR 1 pero no se transcribe su mensajero. Otro tejido donde el anticuerpo revela como positivo y no hay expresión del mRNA es en la papila estigmática, esto puede obedecer a dos razones: la primera es que exista una reacción cruzada del anticuerpo con una molécula muy similar a FLOR 1 y la sonda de RNA sea lo suficientemente sensible para no hibridar, y por otra parte, se sabe que las células de la papila estigmática poseen muchas vacuolas y los espacios citoplásmicos son muy pequeños, por lo que el sistema de amplificación del anticuerpo secundario acoplado a

peroxidasa y rebelado con diamino-bencidin, sea mas sensible que el sistema de amplificación del sistema de hibridación *in situ*. Otro sitio donde no se expresa el mensajero y el anticuerpo revela como positivo es en los sépalos. El anticuerpo contra FLOR 1 reconoce una proteína que se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo de los sépalos, desde que estos emergen del meristemo floral, hasta estado tardíos. Esto sugiere que puede existir una proteína con características estructurales muy similares a FLOR 1 y por lo tanto comparten epitopes reconocidos por el anticuerpo, pero tienen diferentes funciones al expresarse en tipos celulares distintos.

### **Posibles escenarios de interacción entre AGAMOUS y FLOR 1 *in planta*.**

El objetivo de la tesis fue la producción de anticuerpos policlonales contra FLOR 1 para establecer el patrón de expresión de la proteína, compararlos con los patrones de expresión reportados previamente para *AGAMOUS* y establecer de manera preliminar el posible escenario celular donde interactúan FLOR 1 y *AGAMOUS* en las diferentes etapas del desarrollo floral. Los patrones de expresión de *AGAMOUS* fueron reportados detalladamente por Bowman en 1991. *AG*, se detecta desde el estadio 3 del desarrollo floral, en la región central del domo del meristemo floral, que posteriormente da origen al tercer y cuarto verticilio. Del estadio 4 al 7 cuando los órganos empiezan a emerger, *AG* se acumula en los primordios de estambres y carpelos. Cuando se lleva a cabo la diferenciación tisular del estambre y el carpelo, *AG* se expresa en tipos celulares específicos de ambos órganos. En el estadio 9, *AG* se expresa en la pared del ovario y en los primordios de óvulos. En el estadio 12, *AG* se expresa en la papila estigmática, óvulo, estilo, pared del ovario y placenta. Cuando la fertilización ocurre *AG* se detecta en el endotelio, que conforma las capas celulares que rodean al saco embrionario, pero no se expresa en el saco embrionario ni en el integumento. En la antera madura *AG* se expresa en la pared de la antera ( epidermis, endotecio, capas medias, taptum) pero nunca en el grano de polen. De esta manera los sitios donde coinciden ambas proteínas son: en estadios tempranos del desarrollo floral, en el estadio 3, en la región del domo del meristemo floral que da origen a estambres y carpelos, en el estadio 4 al 7 en los primordios de ambos órganos, en estadios avanzados del carpelo en la papila estigmática, en los primordios de óvulos, en la placenta, en el estilo y la pared del ovario. En la antera ambas proteínas coinciden en todos los tejidos de la pared de la antera, pero preferencialmente en tapetum.

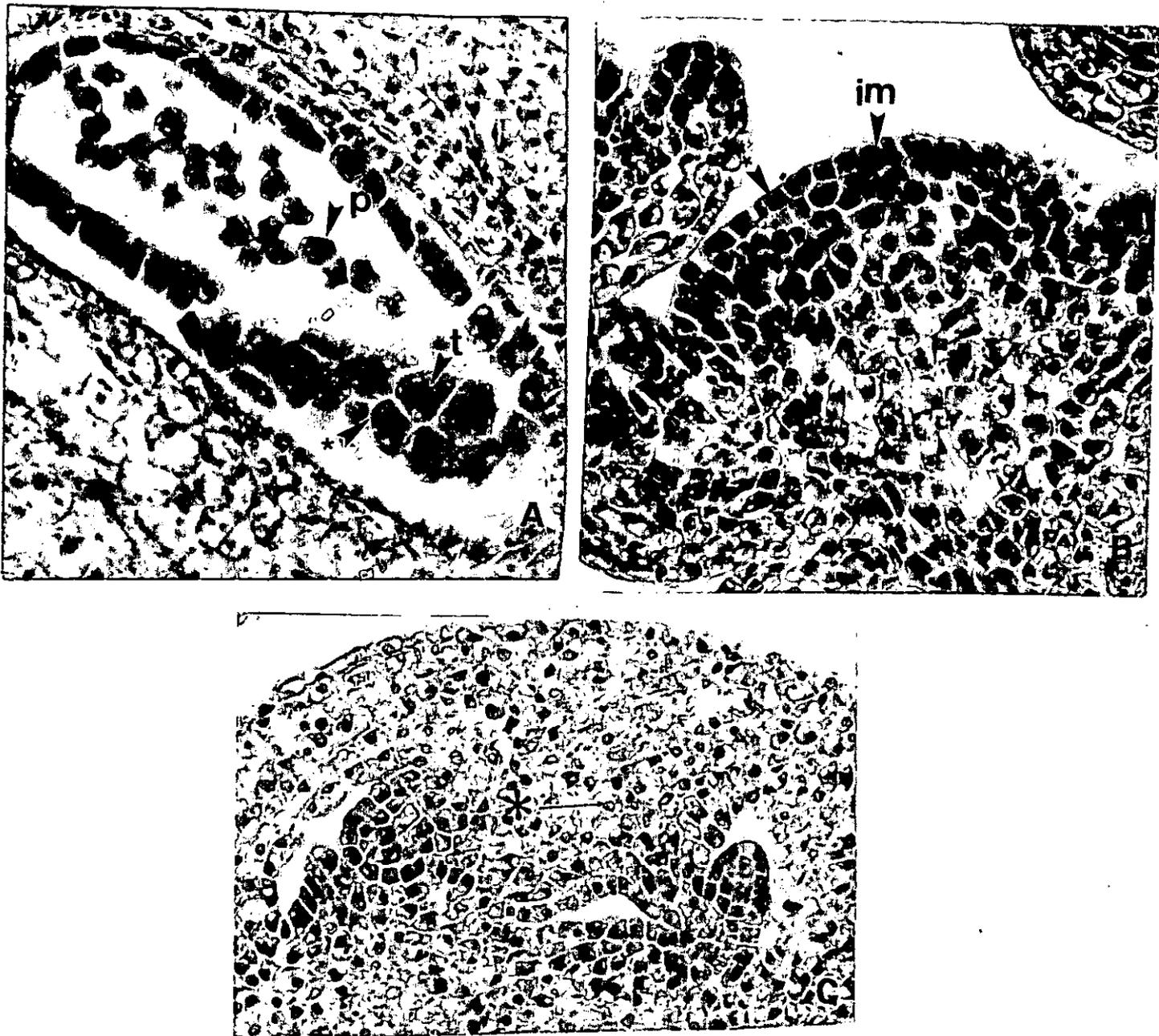


**Figura 5.** Tipos celulares del estambre y del carpelo donde coinciden FLOR 1 y *AGAMOUS* en estadios tardíos del desarrollo floral; pe, papila estigmática; o, óvulo; pl, placenta; es, estilo; pa, pared de la antera.

### **FLOR 1 extracelular o intracelular?**

El principal criterio para establecer la localización de las proteínas con motivos repetidos ricos en leucina, es la presencia de ciertas secuencias consenso dentro de la estructura primaria y fueron establecidas por Kajave (1998) como dogmática. La secuencia consenso responsable de la localización extracelular de las proteínas LRR específicas de plantas es: **LxxLxxLxLxxNxL t/s GxIPxxLGx**, misma que se encuentra en FLOR 1. Alguna de las proteínas que presentan esta secuencia son: CLAVATA, una proteína con actividad de cinasa de *Arabidopsis thaliana*; la proteína inhibidora de

poligalacturonasa de *Phaseollus vulgaris*; y el producto de gen *FIL 2* de *Anthirrinum majus*. Esta última, es la única proteína específica de flor, con motivos repetidos ricos en leucina, de la que se cuenta con inmunohistoquímica como herramienta para caracterizar su localización subcelular. El principal cuestionamiento es la inmunohistoquímica hecha sólo en el filamento de la antera, cuyos tejidos son muy similares al de los órganos vegetativos donde se expresan LRRs con motivos compartidos que se han determinado como proteínas extracelulares por medio de estrategias bioquímicas (ej, el inhibidor de poligalacturonasa del *Phaseollus vulgaris*), por lo tanto es muy factible una reacción cruzada de los anticuerpos empleados. En este trabajo presentamos evidencias de la localización subcelular de FLOR 1, empleando microscopía de luz. En tipos celulares específicos de estambre como el tapetum, la marca se observa totalmente citoplásmica; los espacios extracelulares están libres de marca y se observan los dos núcleos teñido solo por la hematoxilina. En tejidos no diferenciados como el meristemo inflorescente la marca del anticuerpo revela como citoplásmica, mientras que en el carpelo, en tejidos como la placenta y el óvulo la marca es nuclear.



**Figura 6.** Localización subcelular de FLOR 1 en tipos específicos del estambre y del carpelo.

(A) Corte longitudinal del antera , los granos de polen están liberados de su pared de calosa, el tapetum es binucleado, y FLOR 1 se expresa preferencialmente en el citoplasma de estas células y se observan los dos núcleos solo teñidos por la hematoxilina.

(B) Corte longitudinal de meristemo inflorescente, donde FLOR 1 se localiza en el citoplasma de la túnica y el corpus.

(C) Corte transversal de carpelo, el anticuerpo revela como positivo en los núcleos de la placenta y en el citoplasma de los primordios de óvulo.

### **Conclusiones.**

FLOR 1 es una proteína antigénica capaz de generar anticuerpos policlonales en conejos, con la especificidad y la potencia necesaria para ser empleados en pruebas inmunohistoquímicas. La coincidencia del mRNA de *FLOR1* con la proteína, indica que se expresa en diferentes tipos celulares del estambre y del carpelo a lo largo del desarrollo, y la traducción del transcrito es en el mismo tipo celular. Los sitios donde FLOR 1 puede interactuar con AGAMOUS son : en el domo del meristemo floral que da origen a estambres y carpelos, en los primordios de ambos órganos, y en tipos celulares específicos del estambre como tapetum, capas medias, epidermis y endotecio, en carpelo la interacción sería en los óvulos, pared del carpelo, placenta, papila estigmática y estilo. La localización subcelular es dependiente del tejido, en estructuras indiferenciadas es citoplásmica, lo mismo que en el tejido vegetativo de la pared de la antera, en la placenta y los óvulos es preferentemente nuclear. En este sentido FLOR 1 podría contribuir a la translocación nuclear de AGAMOUS en óvulo, mientras que en citoplasma podría dar especificidad a reguladores de AGAMOUS como fosfatasa o cinasas, elementos esenciales de la regulación en cascadas de transducción de señales, o bien mediar interacciones entre AGAMOUS y otros componentes del aparato transcripcional necesarios para prender genes responsables de la fisiología y estructura del tejido vegetativo de la antera. Estos interactores podrían ser AP3, PI y SEP, componentes del tetrámero perfilado como el responsables de la formación del estambre.

## **Bibliografia.**

- Angenet GC, Colombo. (1996). Molecular control of the ovule development. **Trends Plant Sci.** 1:228-232.
- Bauman F.(1984). The ovule. In Embryology of the angiosperms. BM. Jhori, ed ( New York Springer Verlag).
- Bhandari NN. (1984)The microesporangium. In Embyorlogy of angiosperms BM Jhori ed (New York Springer Verlag).
- Black BL, Olson EN. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF-2)proteins. **Annu Rev Cell Dev Biol.**14:167-196.
- Bowman J, Drews GN, Meyerowitz EM (1991) Expression of *Arabidopsis* floral homeotic gene *agamous* is restricted to specific cell types late in flower development. **Plant Cell.**285:749-758.
- Bowman J.(1994) *Arabidopsis* an atlas of morphology and development. Springer-Verlag.
- Bowman JL, Eshed I. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends Plant Sci.** 5:110-115.
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E (1997) Inflorescence commitment architecture in *Arabidopsis*. **Science.** 275:80-83.
- Brand U, Hobe M, Simon R (2001) Funtional domains in plant shoot meristems. **BioEssays.** 23:134-141.
- Buchner P, Boutin JP (1998) A MADS-box transcription factor of the *API/AGL9* subfamily is also expressed in the seed coat of pea ( *Pisum sativum*)during development. **Plant Mol Biol.** 38:1253-1255.
- Cervone F, Castoria R, Lackie F, De Lorenzo G (1997) Perception of fungal elicitor and signal trnasduction. In Aducci, P (ed). Signal transduction in plants. Birkauser Verlag, Basel, Switzerland, pp153-177.
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM (1995) *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same process a *CLAVATA 1*. **Development.** 121:2057-2067.
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The *CLAVATA 1*, gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meritem size in *Arabidopsis*. **Cell.** 89-575-585.

- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**. 353:31-37.
- Colassanti J, Vankatesan S (2000) "Florigen" enters the molecular age: long distance signal that cause plant to flower. **Trends Biochem Sci**.25:236-240.
- Croissant JD, Kim HH, Eichele G, Goering L, Lough J, Prywes R, Schwartz RJ (1996) Avian serum response factor expression restricted primarily to muscle cell lineages is required for  $\alpha$ -actinin gene transcription. **Dev.Biol**.177:250-264.
- Chuang CF, Running MP, Williams RW, Meyerowitz EM (1999) The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. **Genes Dev**. 13:334-344.
- Davies B, Egea-Cortines M, Andrade Silva E, Seadler H, Sommer H (1996) Multiple interaction amongs floral homeotic MADS box proteins. **EMBO J** , 15:4330-4343.
- Drews GN, Lee D, Chistensen CA (1998) Genetic Analysis of female gametophyte development and function. **Plant Cell**. 10:5-17.
- Dumenil G, Rubini M, Dubois G, Baserga R, Fellous M, Pellegrini S (1997) Identification of signalling components in tyrosine kinase cascades using phosphopeptide affinity chromatography. **Biochem Biophys Res Commun**.23: 4748-753.
- Egea-Cortines M, Seadler H, Sommer H (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. **EMBO J**. 18:5370-5379.
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen P, Bardford (1997) Structural basis for recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. **EMBO J** 16:1876-1887.
- Ellis J, Jones D (1998) Structure and function of protein controlling strain-specific pathogen resistance in plants. **Curr Opin Plant Biol**. 1:288-293.
- Esau K (1977). *Anatomy of Seed Plants* ( New York: John Wiley).
- Falnagan CA, HuY, Ma H (1996) Specific expression of the AGL1 MADS-box gene suggest regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. **Plant J**. 10:343-353.
- Fan H, Hu Y, Tudor M, Ma H (1997) Specific interaction between the K domains of AG and AGLs members of the MADS domain family of DNA binding proteins. **Plant J**.12:999-1010.
- Ferrar S (1998) A rapid purification protocol for the mitogen activated p70  $S_6$  kinase. **Protein Expr Purif**. 13: 170-176.

- Flük Martin, Booth FW, Waxham MN (2000) Skeletal muscle CaMKII enriches in nucleus and phosphorylates myogenic factor SRF at multiple sites. **Biochem Biophys Res Commun.**270:488-494.
- Fry MJ, Panayotou G, Dhand R, Ruiz-Larrea F, Gout I, NguyenO, Courtneidge SA, Waterfield MD (1992) Purification and characterization of phosphatidylinositol 3-kinase complex from bovine brain by using phosphopeptide affinity columns. **Biochem J.** 288:383-393.
- Gamboa A, Acevedo G F, Páez-Valencia J, Izaguirre S, Vázquez-MorenoL, Álvarez-Buylla E (2001) FLOR 1, a novel *Arabidopsis thaliana* leucina-rich repeat protein that is flower-specific interacts in vitro with the MADS-domain protein AGAMOUS and VSP. Enviado.
- Gasser C. Robinsion-Beers K (1993) Pistil Development. **Plant Cell.**5:1231-1239.
- Gasser CS. Broadkvest J, Hauser BA ( 1998) Genetic Analysis of ovule development. **Annu Rev Plant Mol Bio.** 49: 1-24.
- Gilbert SV (1999) Developmental Biology, Sinauer Associates Inc. Publisher Souderlan Massachusette.
- Goldberg RB, Beals TB, Sander PM (1993) Anther development: basics principles and practical application. **Plant Cell.** 5:1217-1229.
- Grossinklaus U, Schneitz K (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. **Semin Cell Dev Biol.** 9:227-238.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.**48:575-607.
- Han TH, Prywes R (1995) Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter. **Mol Cell Biol.** 15:2907-2915.
- Haughn GW, Schultz EA, Martínez Zapater JM (1995) The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristem, morphogenesis and mutant. **Can J Bot.**73:959-981.
- Haughn GW,Someriville CR (1988) Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Dev Genet.**9:73-89.
- Heard J, Dunn K (1995) Symbiotic induction of a MADS-box gene during development alfalfa root nodule . **Proc. Natl Acad Sci USA.**92:5273-5277.
- Iozzo RV (1997) The family of leucine-rich repeat proteoglycans key regulators of matrix assembly and cellular growth. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** 32 :141-174.
- Irish V.F (1991) Cell lineges in plant development. **Curr Opin Cell Biol.** 3:983-987.

- Kajava AV (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. **J Mol Biol.**277:519-527.
- Kajava AV, Vassart G, Wodak SJ (1995) Modelling of three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. **Structure.**3:867-877.
- Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. **EMBO J.** 16:7054-7066.
- Kato Y, Molkenin JD, Dave V, Olson EN, Periasamy M. (1998) MEF2B is a component of a smooth muscle-specific complex that binds an A + T- rich element important for smooth muscle myosin heavy chain gene expression. **J Biol Chem.** 273:1511-1518.
- Kaushal S, Schneider JW, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1994) Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperate with Myo D. **Science.**266:1236-1240.
- Kayes JM, Clark SE (1998) *CLAVATA 2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. **Development** 125:3843-3851.
- Kobe B, Deisenhofer J (1994). The leucine rich repeat: a versatile binding motif. **Trends Biochem Sci.**19:415-421.
- Kobe B, Deisenhofer J. (1995) Protein with leucine rich repeats. **Curr Opin Struct Biol.** 5:409-416.
- Leckie F, Mattei B, Capodicasa C, Hemmings A, Nuss L, Aracri, De Lorenzo G, Vervone F, (1999) The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed  $\beta$ -strand/ $\beta$ turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. **EMBO J.** 18:2352-2363.
- Lenhard M, Laux T (1992) Shoot meristem formation and maintenance. **Curr Opin Plant Biol.** 2:44-50.
- Li JM, Chory J (1997) A putative leucine rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. **Cell.** 90:929-938.
- Lilly B, Zhao B, Ranganayakulu G, Paterson BM, Schulz RA, Olson EN. (1995) Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophilla*. **Science**, 267:688-693.
- Lin Q, Lu J, Yanagisawa H, Webb R, Lyons GE, Richardson JA; & Olson EN (1998) Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. **Development.** 125:4565-4574.

- Lin Q, Schwarz, J, Bucana C, Olson EN (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. **Science**.276:1404-1407.
- Liu S, Liu P, Borrás A, Chatila T, Sepck SH (1997) Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein- Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. **EMBO J**. 16:143-153.
- Liu Z, Meyerowitz EM (1995) *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. **Development**.121:975-991.
- Lyndon RF (1998) The shoot apical meristem: its growth and development. Cambridge University Press.
- Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1991) *AGL-1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. **Genes Dev**.5:484-495.
- Mandel MA; Gustafson-Brown C, Sadvidge B, Yanofsky MF. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA 1*. **Nature**. 360:273-277.
- Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF 2 . **Science**. 286:785-790.
- Matsushima N, Ohyanagi T, Tanaka T, Kretsinger R (2000) Super motifs and evolution of tandem leucine-rich repeats within the small proteoglycans-biglycan, decorin, lumican, fibromodulin, PRELP, keratan, osteoadherin, epiphykan and osteoglycin. **Prot Struct Funct Gen**. 38:210-225.
- Mattei B, Berlanda MS, Federici L, Ropstorff R, Cervone F, Boffi A. (2001) Secondary structure and post-translational modifications of the leucine-rich repeat protein PGIP (Polygalacturonase-inhibiting protein) from *Phaseolus vulgaris*. **Biochemistry**.40:569-576.
- Misra RC (1962) Contribution to the embryology of the *Arabidopsis thaliana* ( Gay and Monn). **Agra. Univ. J. Res.Sci**. 11:191-199.
- Ohyanagy T, Matsushima N (1997) Classification of tandem leucine-rich repeats within a great variety proteins. **FASEB J**.11: A949.
- Owen HA, Makaroff CA (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). **Protoplasma**. 185:7-21.
- Pan Q, Wendel J, Fluhr R (2000) Divergent evolution of plants NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **J Mol Evol**. 50:203-213.
- Papageorgiou AC, Shapiro R, Acharaya KR (1997) Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor and X-ray crystallographic study at 2.0 Å. **EMBO J**. 16:5162-5177.

- Parcy F, Nilsson O, Bush MA, Lee I, Weigel D (1998) A genetic framework for floral patterning. **Nature**.395:561-566.
- Pelaz S, Ditta GS, Bauman E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity function require *SEPALATA* MADS-box genes. **Nature**. 405:200-203.
- Pellegrini L, Tan S, Richmond T, (1995) Structure of serum response factor core bound to DNA. **Science**. 376:490-497.
- Pnueli L, Abu-Abeid M, Zamir D, Nacken W, Schwartz-Sommer Z, Lifschitz E. (1991). The MADS-box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. **Plant J**.1:255-266.
- Purugganan MD, Rounsley SD, Schnidt RJ, Yanofsky M. (1995) Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. **Genetics**.140:345-356.
- Reichman JL, Krizec BA, Meyerowitz EM (1996) Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA 1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. **Proc. Natl Acad Sci USA**.93:4793-4798
- Reichmann JL, Meyerowitz EM (1997) MADS domain proteins in plant development. **J Biol Chem**. 378:1079-1101.
- Reiser L, Modrusan Z., Margossian L, Samach A. Ohad N, Haughn GW, Fisher R (1995) The BEL 1 gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. **Cell**. 83:735-742.
- Rinne PL, van der Schoot C ( 1998) Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. **Development**125:1477-1485.
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, Mc Intire KN, Hsu YC, Lee PY, Troung MT, Beals TP, Golberg RB (1999) Anther development defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutant. **Sex. Plant. Repord**. 11:297-322.
- Savidege B, Rounsley SD, Yanofsky MF (1995)Temporal relationships between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. **Plant Cell**. 7:721-733.
- Schenitz K, Balasubramanian S, Shiefthaler U (1998) Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. **Trends Plant Sci**. 3:468-472.
- Schneitz K, Hulskamp M, Pruitt RE (1997) Wild type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: A light microscopy study of cleared-mount tissue. **Plant J**. 7:731-749.

- Schulz Ra, Chromey C, Lu Mf, Zhao B, Olson EN (1996) Expression of the D-MEF2 transcription in the *Drosophila* brain suggests a role in neuronal cell differentiation. **Oncogene**.12:1827-1831.
- Schwartz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Seadler H, Sommer H. (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. **Science**.250:931-936.
- Sharroks AD, Gille H, Shaw PE ( 1993) Identification of amino acids essential for DNA binding and dimerization in p67SRF: implication for a novel DNA-binding motif. **Mol Cell Biol**.13:123-132.
- ShevchenkoD, Akins D, Robinson E, Li M, Popova T, Cox D, Radolf J (1997) Molecular Characterization and cellular localization of TpLRR, a processed leucine-rich repeat, protein of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **J Bacteriology**, 179:3188-3195.
- Shore P, Sharrocks AD (1995) The MADS-box family transcription factors . **Eur J Biochem**. 229:1-13.
- Soulez M, Tuil D, Kahn A, Gilgenkrantz H (1996) The serum response factor (SRF) is needed for muscle-specific activation CarG boxes. **Biochem Biophys Res Commun**.219:418-422.
- Steeves TA, Sussex IM (1989) Patterns in plant development. Cambridge University Press.
- Strayer L (1994) Bioquímica (Reverte Barcelona).
- Stinmayr M, Patrick M, Sommer H, Heinz Seadler Schwarz-Sommer Z (1994) FIL-2 and extracellular leucine-rich repeat protein, is specifically expressed in *Antirrhinum* flowers.**Plant J**,5:459-467.
- Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW (1985) Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine rich  $\alpha$ -glycoprotein of human serum. **Proc. Natl Acad Sci USA**.82:1906-1920
- Theissen G (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Curr Opin Plant Biol**. 4:75-85.
- Theissen G, Kim J Seadler H (1996) Classification and phylogeny of the MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. **J Mol Evol**.43:484-516.
- Theissen G, Kim JT, Seadler H. (1995) MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's biogenetic law revisited. **Curr Opin Genet Dev**.5:628-639.
- Tilly JJ, Allen DW, Jack T (1998) The CarG boxes in the promoter of the Arabidopsis floral organ identity gene *APETALA 3* mediate diverse regulatory effects. **Development**.125:1647-1657.

- Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996) The *Arabidopsis* *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. **Plant Cell**.8:735-746.
- Vaughan JG. Structure of the Angiosperm Apex. **Nature**. 169:458-459.
- Webb MC, Gunning BES (1990) Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. I. Megasporogenesis, including the microtubular cytoskeleton. **Sex Plant Reprod**.3:244-256.
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. **Cell**.69:848-859.
- Weigel D, Meyerowitz EM. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. **Cell** 78:203-209.
- Wigel D, Meyerowitz EM. (1993). Genetic hierarchy controlling flower development. In: Bernfield M editor. Molecular basis of morphogenesis. New York: John Wiley & Sons. Inc.p91-105.
- Withmarsh AJ, Davis RJ. (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. **Cell Mol Life Sci**.57:1172-1183.
- Woodgett JR (1991) Use of synthetic peptides mimicking phosphotyrosine sites for affinity purification of protein-serine kinases. In : **Methods in Enzymology** 200 pp169-178.
- Yang SH, Galanis A, Sharrocks AD (1999) Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factor. **Mol Cell Biol**. 19:4028-4038.
- Zachgo S, de Andra Silva E, Motte P, Tröbner W, Seidler H, Schwerz-Sommer Z. (1995). Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene *in vivo* and *in vitro* by using sensitive-temperature mutant. **Development**.121:2861-2875.
- Zao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J. (1999) Regulation of the MEF 2 family of transcription factor by p38. **Mol Cell Biol**.19:21-30
- Zetser A, Gredinger E, Bengal E ( 1999) P38 mitogen -activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the MEF2C transcription factor. **J Biol Chem**.274:5193-5200.
- Zhang H, Forde BG (1998) An *Arabidopsis* MADS-box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**.279:407-409.
- Zondlo, SC, Irish VF ( 1999) CYP78A5 encodes a cytochrome P450 that marks the shoot apical meristem boundary in *Arabidopsis*. **Plant J**. 19:259-268.

## APÉNDICE 1

### Purificación de FLOR 1 a partir de flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana*.

#### Método.

1. Recolectar flores e inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* (20g), congelar en nitrógeno líquido y almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
2. Macerar el tejido vegetal con 30mL de amortiguador de extracción ( Tris-HCl 50 mM pH=7.5 ,  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM, PMSF 1mM),.
3. Centrifugar el homogenizado a 15,000 r.p.m. durante 30 minutos, recuperara el sobrenadante.
4. Equilibrar una columna de DEAE-Sephacell con amortiguador de extracción (15-20 volúmenes).
5. Pasar el sobrenadante por la columna de DEAE-Sephacell, previamente equilibrada, para remover proteínas constitutivas como la RUBISCO (a  $4^{\circ}\text{C}$ ), recuperar el eluido.
6. Equilibrar la resina que contiene el decapeptido acoplado a sefarosa, con amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 20 mM pH=7.5 ,  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM, PMSF 1mM).
7. La fracción resultate obtenida en el paso 5, se pone en agitación constante, durante 1 hora con la resina equilibrada. Se usa una proporción de 10 mL de extracto/0.2mL de resina.
8. Transferir la resina a una columna y lavar con amortiguador de equilibrio (30 volúmenes) para separar las proteínas que se pegaron de manera inespecífica.
9. Eluir las proteínas que se pegan al péptido con 1 mL de amortiguador de equilibrio 1M de NaCl.
10. Correr las proteínas es geles de SDS-PAGE al 12%.

La proteína de 38 kDa fue identificada como una proteína con motivos repetidos ricos en leucina y se empleó como fuente de antígeno para la producción de anticuerpos policlonales en conejo.

Nota:Las proteínas que son difíciles de purificar en su forma nativa, se pueden separa en geles SDS-PAGE. Las bandas que interesan se cortan y son homogeneizadas para ser empleados como antígenos. En ciertos casos las proteínas desnaturalizadas pueden ser mejores antígenos que las proteínas nativas.

## APÉNDICE 2.

### Cortado de las bandas de geles de acrilamida fijados y teñidos.

#### Método.

1. Correr los geles de manera normal.
2. Teñir y fijar los geles en Azul de Commassie 0.25%, isopropanol 45%, ácido acético glacial 9.25% en agua durante 15-30 minutos.
3. Desteñir los geles en ácido acético glacial al 5%, isopropanol 7.5% en agua durante 15-30 minutos.
4. Cortar cuidadosamente las bandas teñidas con un escarpelo o navaja de rasurar. Las bandas cortadas y desteñidas pueden guardarse a 4° C.
5. Equilibrar los pedazos de gel en PBS (ph=7.5) ( lavar tres veces, cada 5 minutos) para neutralizar y mover parcialmente el ácido acético.
6. Triturar las bandas con una navaja de rasurar en un volumen mínimo de PBS.
7. Emulsificar las bandas con un volumen igual de adyuvante de Freund.
8. Aplicar el protocolo rutinario de inoculación de conejos por vía escapular.

Nota: La fijación de los geles con isopropanol y ácido acético puede ayudar a retardar la liberación de las proteínas del gel. La desventaja de este método es que la acrilamida puede causar granulomas estériles en los sitios de la inyección. Para evitar esto las proteínas pueden ser electroeluidas de los pedazos de geles. Sin embargo la pérdida de la proteína durante la electroelución puede ser de un 70% y las proteínas eluidas por lo general no generan una buena respuesta inmune.

## APÉNDICE 3

### Inmunización de conejos por vía escapular.

#### Componentes tóxicos de la solución antigénica.

Todas las proteínas que se emplean en la inmunización deben de ser disueltas a amortiguadores no tóxicos, como el PBS, Tris-HCl, HEPES, amortiguador de malato. Todos los iones o compuestos tóxicos (azida, CN<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, 2-mercaptoetanol, PMSF, cacodilato) deben ser removidos o inactivados. Las siguientes sustancias pueden estar en bajas concentraciones, en un total de 200mL de la solución emulsificada con adyuvante de Freund, para las inyecciones locales: SDS (0.25%), urea (2mM) EDTA (10mM).

#### Método.

1. Tomar suero preimmune del conejo que va ser inmunizado (2-5mL) y almacenar en frío. En esta etapa se recomienda analizar el suero preimmune para determinar la existencia anticuerpos contra la preparación de proteínas o estructuras celulares y tisulares que son objeto de estudio.
2. Inmunizar con 200µL de antígeno, emulsificado en adyuvante de Freund completo (el volumen final de la mezcla antígeno-adyuvante debe de ser 2mL).
3. Inyectar la mezcla antígeno-adyuvante por ruta escapular.
4. Administrar una inyección potenciadora una tres semanas después en la otra escapula con la misma cantidad y volumen de antígeno emulsificado con adyuvante de Freund incompleto.
5. Diez días después tomar muestras de sangre para analizar los anticuerpos. El antisuero puede emplearse en una dilución 1:30 para inmunofluorescencia o 1:100 en inmunoblot o dot-blot, se recomienda tomar 10mL de sangre. Es posible que durante las siguientes inyecciones potenciadoras la especificidad y afinidad del anticuerpo cambie.
6. Tres semanas después de la primera inyección se repite el proceso con el mismo volumen de la mezcla antígeno-adyuvante, disminuyendo las cantidades de antígeno (100µg en conejos).
7. Analizar el título de anticuerpos 10 días después. Si el título es satisfactorio tomar 10 mL de sangre.
8. Repetir el paso 3 y seis semanas después de la segunda inyección potenciadora, analizar el título de anticuerpos. Tomar muestras de sangre si el título es satisfactorio o bien desangrar totalmente al conejo.

## **APÉNDICE 4**

### **Desangramiento del conejo.**

Una manera para desangrar al conejo es haciendo punciones en la cámaras del corazón, a través del cuarto espacio intercostal izquierdo cercano al esternón. Puede ser empleada una aguja más pequeña que 5 cm, acoplada a un émbolo de 50 mL. Este método requiere de experiencia, y se realiza mas fácilmente con un control visual adecuado, una vez que se abre el tórax. Primero se hace una extracción de la cámara izquierda y después una extracción de la cámara derecha. La circulación de la sangre en los pulmones se ve dañada debido a la contracción de los pulmones cuando se abre la caja torácica.

### **Preparación y almacenamiento del suero.**

La sangre que se colecta coagula espontáneamente en un periodo de 5-30 minutos a temperatura ambiente. Incubar la sangre en tubos de recolección de sangre (tubos de centrífuga) durante 60 minutos a 37 °C para permitir la coagulación completa. En este periodo se puede llevara a cabo la contracción del coágulo. Tratar de separar el coágulo de la pared del tubo con una espátula o una pipeta Pasteur. Dejar que la reacción de coagulación se lleve completa en las siguientes 12-24 horas. En este periodo el suero, amarillento o rosado, se separa de la sangre colectada. Mover cuidadosamente el suero con una pipeta Pasteur. Tener cuidado de no mover o romper el coágulo. Después centrifugar el suero a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento esta formado por material del coágulo, Remover el sobrenadante (suero) y desechar el botón de centrifugación. Generalmente el suero tiene un color rosado o incluso rojo, causado por la hemólisis de los eritrocitos o por la aspiración de material no coagulado del sedimento. En este caso recomienda centrifugar otra vez para remover las partículas.

El suero puede ser almacenado en frío (-20 °C) por algunos años sin pérdida aparente de la actividad. Si se almacena a 4°C es necesario adicionar 0.1% de azida de sodio para prevenir el crecimiento de hongos y bacterias. Si las muestras (de 10mL) son descongeladas, se recomienda hacer 10 alícuotas de 1 mL para evitar el congelamiento y descongelamiento de la misma muestra. Si la alícuota inicial es de 1mL hacer alícuotas con 100µL, de esta manera, los ciclos de congelamiento-descongelamiento se reducen de 3 a 5 veces hasta el uso final del anticuerpo. Repetir este ciclo mas de 10 veces puede causar la desnaturalización gradual de las inmunoglobulinas.

## APÉNDICE 5

### **Purificación de las inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio.**

Las proteínas son solubles en solución acuosa por que sus grupos polares e iónicos forman puentes de hidrógeno con moléculas de agua. Para poder precipitar una proteína disuelta es necesario reducir el número de puentes de hidrógeno entre el solvente (agua) y las proteínas. La adición de altas concentraciones de sales como el sulfato de amonio remueve las moléculas de agua de las proteínas, decreciendo los el número de puentes de hidrógeno y aumentando la tendencia de las proteínas a precipitar. Las diferentes fracciones de proteínas se precipitarán exitosamente con un incremento en las concentraciones de sales. La mayoría de las inmunoglobulinas de conejo pueden ser precipitadas con una o solución saturada de sulfato de amonio (40%).

#### **Método.**

1. Preparar una solución saturada de sulfato de amonio adicionando 800 g de sulfato de amonio sólido a 1000 mL de agua. Calentar hasta que se disuelva completamente, filtrar cuidadosamente mientras esté caliente, y dejar enfriar ( los cristales formados durante el enfriamiento deben mantenerse en la botella). A temperatura ambiente la solución saturada es 4.1M (767g/1000mL) ajustar el pH 7.4 con hidróxido de amonio.
2. Centrifugar el antisuero durante 30 minutos 3000g a 4°C, desechar el sobrenadante.
3. Transferir el sobrenadante a un tubo y adicionar un volumen igual de PBS a 4°C.
4. Bajo agitación constante, adicionar un volumen, lentamente, un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio (equilibrada a temperatura ambiente).
5. Dejar que las inmunoglobulinas precipiten toda la noche a 4 °C.
6. Centrifugar el precipitado ( de color blancuzco) durante 30 minutos a 3000g, 4°C y remover el sobrenadante.
7. Si ocurre el atrapamiento de proteínas del suero (coprecipitación) la cual se hace evidente por un color amarillento o rosado del precipitado, se puede lavar cuidadosamente el botón, con sulfato de amonio al 40%, pero este tiene que estar muy frío. Este paso es con el objeto de remover la labúmina, haptoglobina, hemoglobina y otros componenetes del suero.
8. Resuspender el botón en PBS (menos de 5 volúmenes del volumen inicial del suero) y dializar contra 15 litros de PBS, (tres cambios) toda la noche 4 °C toda la noche.

La precipitación con sulfato de amonio resultará en una purificación parcial de las inmunoglobulinas. Típicamente la pureza de las inmunoglobulinas es del 80% y se puede constatar con un gel de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. La banda predominante de la inmunoglobulina será la cadena ligera (20-25kDa) y la cadena pesada (50-55 kDa). Las bandas de 150-180 kDa pueden resultar de la reducción incompleta de los puentes disulfuro durante la preparación de la muestra para SDS-PAGE.

## **APÉNDICE 6**

### **Titulación del anticuerpo por dot-blot.**

El principio de este método consiste en adsorber al antígeno en una fase sólida. La cantidad de inmunoglobulinas capturadas por el antígeno inmovilizado en la fase sólida puede ser determinado indirectamente por la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a enzimas o componentes radioactivos. La cantidad de marca, emitida por el componente acoplado al anticuerpo secundario, es una medida indirecta de la cantidad total de moléculas de inmunoglobulinas primarias, capturadas por el antígeno.

#### **Método.**

1. Cortar las membranas de nitrocelulosa del tamaño requerido.
2. Usar un lápiz para marcar la membrana con puntos que puedan guiar la aplicación subsecuente de las muestras. La distancia mínima entre las muestras es de 1 cm y un volumen de 5  $\mu$ l por cada una.
3. Humedecer las membranas con metanol (1 minuto), después enjuagar durante 5 minutos en agua destilada seguida por PBS o TBS.
4. Diluir la muestra (proteína) en un amortiguador apropiado, de acuerdo a la concentración requerida.
5. Aplicar las muestras sobre la membrana, cuidando que las puntas de la pipeta no la toquen.
6. Bloquear la membrana con una solución que contenga 5% de leche en polvo en PBS. Dejar secar la membrana durante 10 minutos.
7. Remover la solución bloqueadora y enjuagar tres veces con PBS (5 minutos cada uno).
8. Incubar las membranas en 0.5 mL de suero diluido 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, en solución bloqueadora. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
9. Remover el anticuerpo que se pegó de manera inespecífica, lavando 3-5 veces con PBS o TBS.
10. Visualizar las inmunoglobulinas que se pegaron al antígeno con un anticuerpo secundario.

### **Pruebas de reactividad cruzada empleado Western-blotting.**

El Western blotting es un procedimiento en cual, se produce una réplica de un gel separador transfiriendo las proteínas de un gel a una membrana de nitrocelulosa. Esta réplica del gel es incubada con un anticuerpo. Esta técnica produce información acerca del antígeno como los pesos de las subunidades de antígeno, pureza del antígeno; si tenemos más de una banda a la que se une el anticuerpo, contaminación, etc. Los pasos básicos de un Western-blotting son

1. Separar las proteínas de interés en un gel mono o bidimensional.
2. Transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa.
3. Bloquear las membranas con proteínas (como la albúmina y la caseína) para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos.
4. Incubar la membrana con el anticuerpo primario para permitir la unión al antígeno.

5. Lavar la membrana para remover los anticuerpos que se unieron de manera inespecífica.
6. Incubar la membrana con un anticuerpo secundario acoplado a una sustancia indicadora para que se una al anticuerpo primario.
7. Lavar la membrana para remover el anticuerpo secundario inespecífico.
8. Revelar o exponer la sustancia indicadora para localizar la posición del anticuerpo primario.

### **Método.**

1. Separar las proteínas de la muestra usando un gel de electroforesis o de punto isoelectrico.
2. Enjuagar el gel en amortiguador de transferencia (Tris 0.05M, glicina .384M, 0.01% SDS, metanol 20%) durante 10-20 minutos.
3. Preparar las membranas. Cortar tiras del tamaño del gel.
4. Humedecer las membranas en metanol al 100% durante 10 minutos.
5. Lavar las membranas en agua destilada durante 5 minutos.
6. Ensamblar el cassette de electroblotting y orientar de manera adecuada.
7. Transferir una hora a 100 V en frío.
8. Seguido de la transferencia, remover las membranas del cassette marcar la orientación del gel sobre la membrana y enjuagar suavemente.
9. Las membranas pueden ser usadas inmediatamente o almacenadas hasta su uso.

Note: es importante manipular la nitrocelulosa con guantes. Se recomienda emplear amortiguadores de transferencia de baja fuerza iónica. La manera adecuada de armar el cassette para la transferencia es: una rejilla orientada hacia el cátodo, una fibra, dos tiras de papel filtro, una membrana de nitrocelulosa, el gel, dos tiras de papel filtro, una fibra y la otra rejilla orientada hacia el ánodo.

### **Inmunodetección empleando el sistema ECL (Amersham farmacia)**

La quimioluminiscencia es definida como la emisión de luz que resulta de la disipación de energía de una sustancia en estado excitado. En la quimioluminiscencia la excitación es afectada por una reacción química. Las reacciones químicas de los diacilhidrácidos como el luminol, han sido ampliamente usados en análisis químicos. Uno de los sistemas mejores entendidos es el peroxidasa de rábano/peróxido de hidrógeno catalizado por la oxidación del luminol en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol entra en un estado de oxidación el cual decae a un estado basal vía la emisión de luz. La potenciación qui

mioluminica ocurre cuando el luminol es oxidado por el peroxidasa de rábano en presencia de potenciadores químicos como los fenoles. La luz producida por esta reacción tiene su pico máximo después de 5-20 minutos y decae lentamente, teniendo una vida media de 60 minutos. La emisión máxima de luz es en una longitud de onda de 428nm y puede ser detectada por una corta exposición de una película autorradiográfica sensible a luz azul.

### **Método.**

1. Realizar la electroforesis y la transferencia.

2. Incubar la membrana en solución bloqueadora ( Tris-HCl pH=7.4 15mM, leche svlety 5%) toda la noche a 4 °C.
3. Lavar la membrana con solución de lavado (Tris-HCl pH 7.4, NaCl 0.15M, tween-20 0.05%) tres veces por 5 minutos.
4. Diluir el anticuerpo primario ( la concentración óptima puede ser determinada por dot-blot).
5. Incubar la membrana con el anticuerpo primario, diluido en PBS o solución bloqueadora, durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lavar la membrana como se detalló en el paso 3.
7. Diluir el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (1:1000) en PBS o solución bloqueadora.
8. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 hora.
9. Lavar la membrana (ver paso 3).
10. Detección: es necesario trabajar rápidamente una vez que las membranas han sido expuestas a la solución de detección. Todos los pasos deben hacerse en el cuarto oscuro, con un equipo para películas de rayos X, rollo de papel plástico para microondas cronómetro y película de exposición ECL (RNP 2103)
11. Mezclar un volumen igual de solución de detección 1 y solución de detección 2 (el volumen total debe cubrir toda la membrana).
12. Secar el exceso de amortiguador de lavado de la membrana y ponerla sobre un pedazo de papel plástico para microondas, con el lado que tiene las proteínas hacia arriba. Adicionar los agentes de detección, de tal manera que sean retenidos por tensión superficial sobre la superficie de las membranas, cuidando que estas no queden descubiertas.
13. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente sin agitación.
14. Secar el exceso de los agentes de detección y envolver las membranas en papel plástico para microondas. Quitar con cuidado las burbujas entre la membrana y el plástico.
15. Poner las membranas, que con la cara que contiene las proteínas hacia arriba, en el cassette.
16. Apagar la luz y poner cuidadosamente la película e exposición sobre la membrana durante 1-15 minutos según la intensidad de la marca.
17. Revelar de manera tradicional.

## APÉNDICE 7

### Fijación e incusión de tejido vegetal en parafina.

1. Fijar durante 1 hora el tejido en FAA ( Formaldehído 37%, etanol a
2. absoluto 50%, ácido acético 5% en agua destilada) a 4 °C.
3. Deshidratar el tejido de alcoholes de diferentes grados:

#### Día I

EtOH 50% (10-15 minutos)

EtOH 50% (10-15 minutos)

EtOH 50% (10-15 minutos)

EtOH 50% (30 minutos)

EtOH 100% (Toda la noche)

Todos los pasos de deshidratación se hacen a 4°C.

#### Día II

EtOH 70% (30 minutos)

EtOH 95% (30 minutos)

EtOH 100% (1 hora)

EtOH 100% (1 hora)

Histoclear 25% EtOH 75% (1 hora)

Histoclear 50% EtOH 50% (1 hora)

Histoclear 75% EtOH 25% (1 hora)

Histoclear 100% (1 hora)

Histoclear 100% (1 hora)

Todos los pasos del día II se hacen a temperatura ambiente.

#### Día III (Infiltración en parafina)

Histoclear 50% Parafina 50%

Histoclear 25% Parafina 75%

Histoclear 10% Parafina 90%

Parafina 100% ( se hacen tres cambios diarios de parafina al 100% durante 3 días).

## **APÉNDICE 8**

### **Inmunohistoquímica empleando el sistema de detección ABC ( DAKO).**

1. Cortar los bloques (4-8  $\mu\text{m}$  de grosor) de parafina en microtomo.
2. Montar los cortes en portaobjetos e incubarlos a una estufa a 60 °C durante 30 minutos.
3. Poner las muestras en xilol 10 minutos
4. Poner las muestras en xilon 3 minutos
5. Pasar las muestras por trenes de alcoholes de diferentes gradaciones (30%, 50%, 70% y 100%) durante 10 segundos en cada alcohol.
6. Poner las muestras en agua destilada 10 minutos.
7. Bloquear las muestras con solución bloqueadora (DAKO)
8. Cubrir las muestras con PBS ( a partir de aquí todos los pasos se hacen en una cámara fría)
9. Incubar las muestras en solución bloqueadora de peroxidasa (DAKO) durante 10 minutos.
10. Incubar en solución bloqueadora de biotina (DAKO) durante 10 minutos.
11. Incubar las muestras con anticuerpo primario (anti FLOR 1) diluido 1:100, 1:500, 1:1000 durante 30 minutos.
12. Lavar con PBS 10 minutos.
13. Incubar con anticuerpo secundario biotinilado (DAKO) 20 minutos.
14. Lavar con PBS 5 minutos.
15. Incubar con el conjugado estreptavidina-peroxidasa (DAKO) 20 minutos.
16. Revelar con diamino-bencidina (DAKO) 2 minutos.
17. Contrateñir con hematoxilina 1 minuto.
18. Remover el exceso de la tinción con alcohol ácido 0.5% 1 minuto.
19. Deshidratar en alcoholes de 50%, 75% y 100%.
20. Enjuagar con xileno
21. Montar permanentemente
22. Observar al microscopio.