

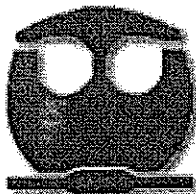
005519
UNAM
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE BENCILADENINA EN EL ESTADO DE
FOSFORILACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS 1 Y 2
DE MAÍZ Y DETERMINACIÓN DE LAS CINASAS QUE
PODRÍAN ESTAR INVOLUCRADAS EN EL PROCESO**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA)
PRESENTA
EDURNE GÓMEZ ROIG



MÉXICO D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

Morirse debe ser dejar de caminar.

J.S.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Doctor Jorge Vázquez Ramos y fue aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas por el siguiente jurado:

Presidente Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Vocal Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Secretario Dr. Jorge Nieto Sotelo
Suplente Dra. Martha Robles Flores
Suplente Dr. Eleazar Martínez Barajas

Agradecimientos

-Al Dr. Jorge Vázquez por la dirección de este proyecto.

-A los doctores Alejandro Zentella y Rogelio Rodríguez por el seguimiento que le dieron a este proyecto.

-A los miembros del jurado por la revisión de este texto.

-A CONACyT por la beca otorgada durante el desarrollo de este trabajo (No. 129708).

CONTENIDO

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
GERMINACIÓN Y FITOHORMONAS	1
Proceso Germinativo	1
<i>Metabolismo durante la Germinación</i>	1
Citocininas	3
EL CICLO CELULAR Y LA REPLICACIÓN DEL DNA	4
Cinasas dependientes de ciclinas (Cdks)	4
Ciclinas	6
Control en la fase G1	7
Transición G1/S	9
Fase S	9
Transición G2/M y Fase M	11
Replicación del DNA	12
Regulación de la Replicación por Fosforilación	16
EL CICLO CELULAR EN PLANTAS	20
Cinasas dependientes de ciclinas (Cdks)	21
Ciclinas	22
Otras Proteínas Homólogas	23
ANTECEDENTES	25
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
Material Biológico	31
Obtención de los extractos celulares	31
Ensayos de fosforilación	35
Determinación de la actividad de las DNA polimerasas	38
RESULTADOS	40
Inmunodetección de ciclina A y actividad de cinasa	40
Actividad de cinasa que co-eluye con la DNA polimerasa 2	52
Fosforilación y actividad de DNA Polimerasa	62
Fosforilación por inmunoprecipitados de PCNA y actividad de DNA Polimerasa	67
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	87
APÉNDICE: SOLUCIONES	94

RESUMEN

En maíz se han encontrado dos actividades de DNA polimerasas replicativas, pol1 y pol2, tipos δ y α respectivamente; ambas incrementan su actividad cuando las semillas son embebidas en presencia de citocininas. La DNA pol 2 está conformada por varios polipéptidos, de los cuales el de mayor tamaño es el que contiene la actividad catalítica de polimerasa. Esta enzima se fosforila diferencialmente durante la germinación.

Para conocer si esta fosforilación era causada por complejos ciclina-Cdk se intentó la inmunoprecipitación de ciclina A con la subunidad catalítica acompañante, mediante el uso de anticuerpos heterólogos. Se logró el reconocimiento e incluso la inmunoprecipitación de una ciclina A putativa; sin embargo, a pesar de detectarse en estos inmunoprecipitados una proteína reconocida por un anticuerpo dirigido contra la región PSTAIRE de las Cdk, no logró encontrarse una actividad de cinasa.

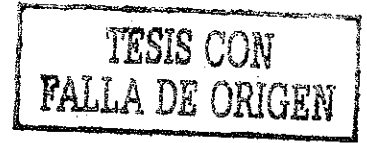
Por otra parte se llevaron a cabo experimentos de fosforilación de la DNA pol2 con inmunoprecipitados de la proteína PCNA, que traen consigo una actividad de cinasa tipo Cdk-A y una ciclina D putativa que desaparece después de las primeras 15 h de la germinación; en estos inmunoprecipitados se encontró también la presencia de la ciclina A putativa en diferentes tiempos de la germinación. Los ensayos de fosforilación de la pol2 por inmunoprecipitados de PCNA mostraron, no solo que efectivamente la subunidad catalítica de la pol 2 (de aproximadamente 103 kDa) es fosforilada por estos inmunoprecipitados, sino también que se dan diferencias al obtener los inmunoprecipitados de diferentes tiempos de la germinación.

Cuando los inmunoprecipitados fueron obtenidos a partir de semillas incubadas en presencia de benciladenina (BA), se encontraron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la fosforilación de la proteína de 103 kDa, encontrándose que el periodo de fosforilación se vio acelerado, por la presencia de esta hormona.

Esta modificación, a pesar de que si parece ser relevante dentro del ciclo celular, no tuvo efecto directo en la actividad catalítica de la enzima.

INTRODUCCIÓN

GERMINACIÓN Y FITOHORMONAS



Proceso Germinativo

Durante la maduración de las semillas, éstas sufren un proceso de desecación en el que pierden entre 80-90% de agua y disminuyen su metabolismo prácticamente a cero. Es durante la germinación, que las semillas abandonan su estado de latencia y reanudan un metabolismo activo que las lleva a desarrollarse y formar una nueva planta. Desde el punto de vista bioquímico y según la definición de este grupo de investigación, la germinación consiste en una serie de eventos moleculares entre los que se encuentran: hidratación de moléculas preexistentes, así como reconstitución de estructuras celulares y síntesis de macromoléculas, los cuales anteceden a la primera división celular, momento en el que termina el proceso de germinación y comienza el desarrollo.

Para que una semilla germine se necesita que tenga integridad metabólica y genética; cumpliéndose esto, generalmente sólo se requerirá de la entrada de agua en condiciones adecuadas de temperatura, concentración de oxígeno y bióxido de carbono (Bewley y Black, 1994).

Metabolismo durante la Germinación

Aunque el metabolismo de las semillas latentes es prácticamente nulo y la síntesis de proteínas no se lleva a cabo, se sabe que todos los elementos que se requieren para ésta, permanecen en la semilla en cantidades suficientes y de una

manera potencialmente activa: ribosomas, tRNAs, factores de iniciación y elongación, aminoácidos, aminoacil-tRNA sintetasas (Simon,1984; Bewley y Black,1994), e incluso mRNAs (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981). De esta manera, la síntesis proteica puede comenzar en cuanto los tejidos se hidratan. Se ha visto que durante la germinación se da un aumento en la demanda de proteínas; experimentos en trigo demostraron un incremento en el número de polisomas, así como una disminución en el número de ribosomas libres, durante los primeros minutos de la germinación (Sánchez de Jiménez *et al.*,1981). Al menos durante las primeras horas de la germinación, la síntesis de novo de proteínas es independiente de la de mRNA (Spiegel *et al* , 1975), debido a que los mensajes almacenados son los que se emplean para reiniciar la actividad metabólica (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Esta síntesis se vuelve dependiente de nuevos mensajes de manera progresiva, conforme la cantidad de mensaje acumulado en la semilla seca se degrada (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

En las semillas de maíz, al reactivarse el metabolismo por medio de la imbibición, se ha observado que dentro de las primeras horas de la germinación tiene lugar una primera etapa de síntesis de DNA, en donde ocurren la reparación y la síntesis organelar (Zaraín *et al.*, 1987; Zlatanova *et al.*, 1987; Bewley y Black, 1994) y una segunda etapa dentro de la que se lleva a cabo la síntesis replicativa del DNA, en la cual hay un aumento neto en la cantidad de DNA (Baiza *et al.*,1989).

Citocininas

El proceso germinativo requiere de condiciones externas propicias de temperatura, concentración de O₂, luz, cantidad de agua y minerales, entre otros (Raven, 1992), así como también de factores internos que modulen las respuestas a los factores externos. Los principales factores internos que regulan el desarrollo de las plantas son las fitohormonas (Bewley y Black, 1994).

Las fitohormonas o fitorreguladores son sustancias químicas, activas en muy pequeñas cantidades y que pueden ejercer un efecto estimulante o inhibitor. La respuesta a su estímulo depende de la estructura química y de la "receptividad" de los tejido(os) sobre él(los) que actúen (Raven, 1992).

Las citocininas son una clase de fitorreguladores, derivados N⁶ de la adenina, cuyo papel general es el de promover la división celular; para ello promueven la síntesis de proteínas, de RNA y de DNA (Bewley y Black, 1994). Otros de los efectos que promueven estas hormonas son el retardo de la senescencia (Yokoyama *et al.*, 1981) y el de fungir como estimulantes de la germinación

La benciladenina (BA) es una citocinina sintética, cuyo efecto estimulante sobre la síntesis de RNA y DNA se ha visto en frijol (Yokoyama *et al.*, 1980) y en maíz (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990). Este efecto se relaciona directamente con la actividad mitogénica que promueve la hormona, la cual se refleja en un acortamiento de los tiempos dentro del ciclo celular durante la germinación

EL CICLO CELULAR Y LA REPLICACIÓN DEL DNA

El ciclo celular es el proceso por el cual una célula madre se divide y hereda a las dos células hijas una copia fiel de su material genético, de este modo la información se perpetua y las especies logran la sobrevivencia. Dicho proceso está constituido por cuatro etapas bien definidas: G1, S, G2 y M, cuya consecución es estricta. Aunque estas fases tienen características particulares, conforman un proceso continuo.

Si se consideran todos los factores y procesos involucrados en este ciclo de duplicación celular, se puede comprender que para que este proceso ocurra exitosamente muchos factores deben estar controlados, tales como: la síntesis y degradación de las proteínas, su localización celular, su ensamblaje y actividad y el hecho de que estos eventos se lleven a cabo en los momentos adecuados. Los mecanismos por los cuales se controlan todos estos procesos fueron inicialmente descritos en levaduras y posteriormente se han ido encontrando mecanismos y proteínas homólogas en otros sistemas.

Cinasas dependientes de Ciclinas (Cdks)

En los organismos eucariontes el control del ciclo celular recae principalmente en una familia de cinasas dependientes de ciclinas (Cdks), conservada en la escala evolutiva. Se trata de un grupo de cinasas de serina y treonina, que a su vez son reguladas por la asociación con diferentes proteínas, denominadas ciclinas (dado que su concentración fluctúa durante el ciclo celular), por eventos de fosforilación y desfosforilación y por unión con proteínas

inhibidoras (Sheer y Roberts, 1999; Miller y Cross, 2001). Estas cinasas actúan sobre una secuencia consenso S/TPXK/R presente en la proteínas blanco y a través de estas modificaciones se regulan las interacciones y degradación de proteínas que ejercen importantes acciones en cada una de las fases.

La primera Cdk encontrada fue el producto del gene CDC28 en *S. cerevisiae* o bien *cdc2* en *S. pombe* (Reed *et al.*, 1985; Simanis y Nurse, 1986); posteriormente, un homólogo de esta proteína fue reportado por Lee y Nurse (1987) en células humanas y fue más tarde denominado Cdk1. El porcentaje de identidad entre las proteínas de levadura y las de humano es alto, siendo una de las regiones más conservadas una secuencia de 16 aminoácidos localizada hacia el extremo amino terminal, después del dominio de unión de ATP. Dentro de esta región se encuentra el motivo PSTAIRE, secuencia de aminoácidos más altamente conservada entre todas las Cdk's reportadas, a la cual se unen las ciclinas y que ha servido como base para clasificar las distintas variantes de estas proteínas (Mironov *et al.*, 1999). A través del uso de PCR, se han ido descubriendo genes relacionados con *cdc2* en gran variedad de organismos (Lehner y O'Farrell, 1990; Milarski *et al.*, 1991; Paris *et al.*, 1991). Estas proteínas presentan variantes a la secuencia consenso PSTAIRE y cubren funciones diferentes a las que se han reportado para *cdc2*. En mamíferos, las proteínas que conservan la secuencia PSTAIRE son Cdk1, Cdk2 y Cdk3 (para esta última no se ha encontrado una función dentro del ciclo celular) y entre las que tienen variaciones a dicha secuencia están Cdk4, Cdk5 y Cdk6.

Por lo que respecta a la regulación de estas enzimas por eventos de fosforilación y desfosforilación, se sabe que la fosforilación de un residuo de treonina dentro del asa T, por una cinasa activadora de Cdks (CAK), es uno de los factores que contribuyen particularmente a la actividad de las Cdks. Por otra parte, la fosforilación de los residuos Tyr 15 y Thr 14, que participan en el sitio de unión del ATP, ejerce un efecto inhibitorio en la actividad de las Cdks; por lo tanto se establece un balance entre actividades de CAKs y fosfatasas para activar o inhibir a los complejos que regulan la entrada a la fase S o a la fase M del ciclo celular (Morgan, 1997).

Ciclinas

Las ciclinas son proteínas que influyen espacial y temporalmente en la actividad de las Cdks; además son mediadoras de interacciones específicas con las proteínas blanco (Miller y Cross, 2001).

Estas proteínas se regulan tanto a nivel de su transcripción como a nivel de su degradación (por ello la regulación temporal de las Cdks es tan específica) y su localización celular varía conforme al ciclo celular (Morgan, 1997).

En cuanto a las ciclinas descritas hasta este momento, se han encontrado dos grandes categorías: las ciclinas de G1 (D y E) y las ciclinas mitóticas (A y B). Todas contienen una secuencia conservada de aproximadamente 100 aminoácidos denominada caja de ciclinas, que media la asociación y activación de la Cdk; es esta misma secuencia la que sirve como base para la especificidad de los diferentes complejos ciclina-Cdk (MacLachlan *et al.*, 1995)

Las ciclinas mitóticas A y B son proteínas estables comparadas con las ciclinas de G1; sin embargo, se sabe que estas ciclinas son degradadas rápidamente en la fase M por un proteasoma sumamente específico, en el que está implicada la vía de ubiquitinación (King *et al.*, 1996) Estas proteínas tienen en su secuencia otra región hacia el extremo amino terminal, denominada caja de destrucción. Esta región contiene una zona de residuos conservados seguida de una secuencia rica en lisinas, así que probablemente la caja de destrucción provea la secuencia de reconocimiento para una enzima conjugadora de ubiquitina, mientras que la secuencia rica en lisinas provee las secuencias blanco para la ubiquitinación.

Por otra parte las ciclinas de G1, D y E son proteínas bastante inestables y se ha atribuido esta inestabilidad a la presencia en el extremo carboxilo, de regiones ricas en aminoácidos PEST, que sirven de blanco para fosforilación y proteólisis durante las primeras etapas del ciclo celular (Rechsteiner y Rogers, 1996).

Control en la Fase G1

En levaduras, el control tanto de la transición G1/S como de la G2/M, es llevado a cabo por la Cdk cdc2/CDC28 formando complejos con ciclinas de G1 y G2 respectivamente (Nasmyth, 1996; Stern y Nurse, 1996) En mamíferos en cambio, el control de la fase G1 es llevado a cabo por dos de las Cdks con secuencia diferente a PSTAIRE, unidas a ciclinas de G1.

Esta fase G1 es la etapa en la cual factores mitogénicos, de crecimiento, nutrientes, hormonas, etc. son percibidos e integrados como señales de

proliferación, lo que lleva a la célula a superar un punto de restricción o compromiso, después del cual no hay retorno y por ello deberá concluirse el ciclo celular.

El progreso a través de la fase G1 del ciclo celular es controlado por complejos ciclina D/Cdk4 ó 6, cuya función es fosforilar a la proteína del retinoblastoma (pRb). En un estado hipofosforilado, esta proteína une y secuestra factores transcripcionales del tipo E2F/DP, cuya función es necesaria para la transcripción de proteínas que se requieren en la fase S, tales como: DNA polimerasa α , DNA ligasa, ciclina E, ciclina A, ribonucleótido reductasa (Dutta y Stillman, 1992; Sherr, 1994).

Estos complejos ciclina/cinasa también cumplen la función de secuestrar y fosforilar a los inhibidores p21 y p27 (este último actúa sobre el complejo ciclina E/cdk2 impidiendo su acción), para con su posterior degradación, permitir la transición hacia la fase S (Sherr y Roberts, 1999)

Una vez fosforilado Rb, el cambio conformacional permite la liberación de los factores transcripcionales y el ciclo puede seguir su avance (Nevins, 1998). Se han encontrado tres tipos de ciclina D: D1, D2 y D3, cuyas actividades no son redundantes, participando solo dos de ellas de manera activa en la fosforilación de Rb (Sherr, 1993); además se han visto diferencias en el nivel de expresión de cada una de ellas dependiendo del tejido (Lew *et al.*, 1991).

Transición G1/S

La transición hacia la fase S es un paso regulado parcialmente por los complejos ciclina D/Cdks que persisten en G1 tardío y principalmente por el complejo ciclina E/Cdk2; entre las funciones que se le han atribuido a este complejo está la de cooperar con los complejos de ciclina D/Cdk4 para continuar la fosforilación de Rb (Koff *et al.*, 1992; Taya, 1997; Lundberg y Weinberg, 1998). El pico máximo de síntesis del mRNA y de la proteína de la ciclina E se ha encontrado en G1 tardío (Lew *et al.*, 1991) y la actividad máxima del complejo durante la transición G1/S (Dulic *et al.*, 1992), por lo que se le atribuye un papel en la capacidad de las células de entrar a la fase S. La microinyección de anticuerpos contra la ciclina E en células de mamífero, inhibe parcialmente la síntesis de DNA (Ohtsubo *et al.*, 1995).

Fase S

Una vez superada la transición G1/S, la ciclina E comienza a degradarse rápidamente y principia la acumulación de la ciclina A, que va en aumento durante la fase S y permanece hasta antes del comienzo de la metafase (Pines y Hunter, 1991). Durante la fase S, la ciclina A se asocia con Cdk2; en la fase G2 y hasta la metafase se asocia con Cdk1. Se han reportado dos clases de ciclina A: A1 y A2. Inicialmente se había descrito el papel de ciclina A como eminentemente vinculado a la fase M, dado el rol que desempeña en la parte inicial de esta fase (Nurse, 1994), pero nueva evidencia le ha dado un papel importante en la fase S. Al parecer, aunque el complejo no es indispensable para el inicio de esta fase, su disrupción o la de su función inhibe la replicación del DNA (Pagano *et al.*, 1992;

Zindy *et al.*, 1992), por lo cual se le ha atribuido la función del mantenimiento de la fase S hasta que se completa la replicación del material genético

Existen evidencias de que ciclina A, al igual que ciclina E, interacciona con miembros de la familia de E2F y con Rb y sus homólogos p107 y p130, lo cual confirma que una de las funciones de la ciclina es la de ubicar a la Cdk2 cerca del sustrato que va a fosforilar (Mudryj *et al.*, 1991) Es interesante el hecho de que la fosforilación que lleva a cabo el complejo ciclina A/Cdk2, inhibe la capacidad de unión del factor transcripcional E2F/DP1 al DNA (Dymlacht *et al.*, 1997)

Se ha propuesto que esta asociación de las ciclinas con los factores transcripcionales, lejos de reprimir su actividad, la modulan, llevando incluso a la fosforilación de proteínas del aparato basal de transcripción (Hisatake *et al.*, 1993).

En cuanto a la localización celular de la proteína, estudios inmunocitológicos e histoquímicos mostraron que la ciclina A se interna al núcleo desde que comienza su síntesis (Pines y Hunter, 1991). El patrón de localización nuclear de ciclina A colocaliza con los focos de replicación del DNA y con PCNA, lo que da evidencia de su probable participación en el proceso de replicación (Sobczak-Thepot *et al.*, 1993). Estas evidencias dieron lugar a la búsqueda de proteínas de la horquilla de replicación que pudieran estar interaccionando con los complejos de ciclina A/Cdk 2. Para poder determinar esto, se han hecho ensayos *in vitro* empleando como modelo de estudio la replicación del DNA del virus SV40 en extractos de células humanas, adicionándoles los complejos ciclina A/Cdk2 purificados; estos estudios mostraron que el antígeno T requiere de fosforilación en un residuo de treonina para adquirir la capacidad de unirse al origen de

replicación del DNA viral, aunque esta modificación no es la responsable de la actividad replicativa (Ramachandra *et al.*, 1993; D'Urso *et al.*, 1990); también la subunidad de 34 kDa de la proteína de replicación A (RPA) es fosforilada (Dutta y Stillman, 1992). Esta fosforilación es específica de ciclina A/Cdk2 y no de ciclina E/Cdk2 (Horton y Templeton, 1997), lo cual promueve la síntesis del DNA por la DNA polimerasa α y estimula la formación del complejo de la cadena continua (polimerasa δ , PCNA y RFC).

Transición G2/M y Fase M

Una vez pasada la fase S, la ciclina A empieza a asociarse con Cdk1 para ejercer su acción en la fase M. Aunque no se tiene claramente establecido el papel de este complejo en dicha fase, se cree por la localización del mismo durante este periodo, que podría estar involucrada en la reorganización del citoesqueleto en preparación para la mitosis (Verde *et al.*, 1992).

Por otra parte, la ciclina B forma un complejo específico de la mitosis al asociarse con Cdk1, es decir el factor promotor de la mitosis o MPF. A pesar de que la transcripción y síntesis de esta ciclina empiezan en la fase S, los datos reportados muestran que la activación del complejo no afecta en modo alguno la fase S (Pines y Hunter 1991; Sherr, 1993).

Como ya se vio, en general el ciclo celular es la consecución de una etapa de síntesis y una de segregación del material genético duplicado. Puede verse que

se trata de las dos etapas más importantes del ciclo celular y por lo tanto las que están más reguladas. La fase S es de suma importancia dado que el material genético debe ser copiado de manera fiel, completamente y una sola vez por cada ciclo celular para que las generaciones subsiguientes sean exitosas.

Replicación del DNA

La replicación del DNA de los eucariontes se lleva a cabo a partir de numerosos orígenes de replicación y existen orígenes de encendido temprano o tardío. Cuando dos horquillas de replicación que parten de orígenes contiguos se encuentran en un punto, se ha completado la duplicación del material genético en esa región. En este proceso interviene un gran número de proteínas cuyas funciones se complementan y regulan.

Para que se lleve a cabo el proceso de duplicación del material genético, se requiere en primer lugar del reconocimiento de los orígenes de replicación y de la formación de complejos pre-replicativos (preRCs); ésta es la parte de la iniciación del proceso replicativo.

El reconocimiento de los orígenes de replicación en levaduras y mamíferos es un proceso secuencial de unión de proteínas (ORCs, Cdc6/Cdt1 y MCMs).

Primeramente se da la unión, mediante ATP, de un complejo de proteínas ORC (origin recognition complex) a las regiones del DNA consideradas como orígenes de replicación. Estas proteínas forman una plataforma de interacción proteína-proteína y marcan el sitio al cual habrán de llegar todas las demás proteínas que intervienen en el proceso de apertura de la doble cadena y del

proceso replicativo en sí (Liang *et al.*, 1995). Las proteínas ORC permanecen unidas a los orígenes a lo largo del ciclo celular y las proteínas como Cdc6 y el grupo de las 6 MCMs (mini-chromosome maintenance proteins) se unen a la salida de M o durante G1 temprano, para separarse nuevamente una vez disparados los orígenes (Liang y Stillman, 1997).

Cdc6 es la proteína reconocida por el hexámero que forman las diferentes MCMs, para poder montarse sobre el DNA y formar los preRCs. Al parecer también juega un papel central en la prevención del re-encendido de los orígenes, mediando la regulación negativa que ejercen las Cdks (Liang y Stillman, 1997). La localización del hexámero de MCMs sobre los orígenes se da en la fase G1; estas proteínas tienen la función de marcar y volver competentes a los orígenes para que pueda empezar la replicación (Coverley y Laskey, 1994), por lo cual se les ha atribuido la función del factor de licenciamiento. En cuanto los orígenes se encienden, las MCMs, 2, 3 y 5 se separan de los preRCs, mientras que las MCMs 4, 6 y 7 en cambio, permanecen unidas a la horquilla de replicación (Ishimi, 1997).

Una vez marcados los orígenes de replicación, se requiere de la actividad de Cdks de fase S así como del complejo Cdc7/Dbf4 que convierte los complejos de preiniciación en una horquilla activa (Dehde *et al.*, 2001); estos complejos ciclina/Cdk de fase S, también actúan inhibiendo la reasociación del complejo de las 6 MCMs a los orígenes encendidos para evitar la re-replicación (Hua *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997) La replicación depende de un periodo de baja actividad de Cdks durante el cual la síntesis de Cdc6 puede promover el ensamblaje de los pre-RCs, seguido de un periodo de alta actividad de Cdks, que permite el

encendido de los orígenes (Nasmyth, 1996). Por otra parte las Cdks de fase M inhiben la formación del pre-RC, por ello no pueden volver a ensamblarse hasta que estas Cdks son degradadas al final de M.

Posteriormente entra a la horquilla la actividad de helicasa, la cual logra separar las dos cadenas del DNA, parte de este trabajo lo realizan las MCMs 4, 6 y 7, formando un hexámero en el cual participan dos unidades de cada una de estas proteínas (Ishimi, 1997). Además de estas proteínas, es indispensable la presencia de RPA (proteína de replicación A), heterotrímero con actividad de unión a cadena sencilla de DNA, lo que contribuye a la separación de las cadenas y a mantenerlas en forma lineal (Brill y Stillman, 1989).

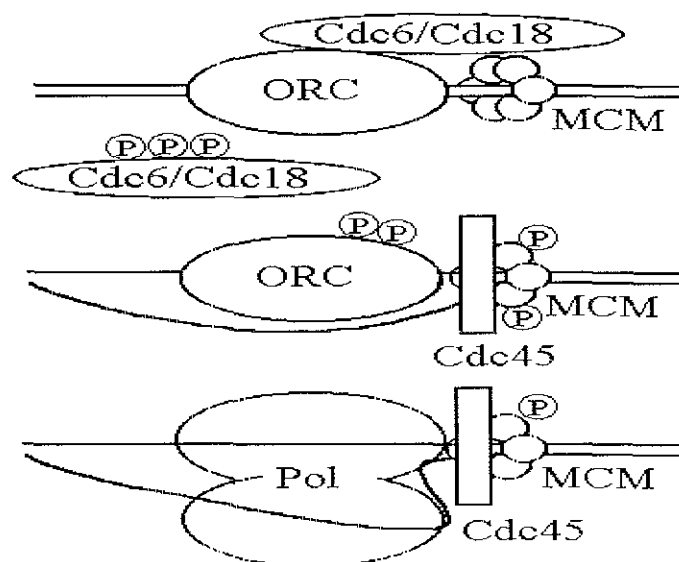
Se tienen evidencias de que la asociación de RPA a los orígenes depende de la presencia del complejo funcional de las MCMs y que está regulada por las actividades de cinasa de fase S. Además, el tiempo en el que RPA se asocia a los orígenes, determina el encendido temprano o tardío de los mismos (Tanaka y Nasmyth, 1998). Sobre un mismo origen se da el ensamblaje de dos horquillas de replicación, que correrán bidireccionalmente.

La proteína RPA une a la DNA polimerasa α -primasa, quien una vez en la horquilla sintetiza los cebadores de RNA-DNA de aproximadamente 30 nucleótidos sobre las cadenas continua y retrasada, en dirección 5'-3', para que pueda llevarse a cabo la síntesis del DNA. En el cargado de la polimerasa α a los

orígenes activados, se ha visto involucrada la proteína Cdc45, quien es regulada por las Cdk's de fase S (Mimura y Takisawa, 1998).

El intercambio de polimerasas α y δ que se da posteriormente, es mediado por el factor de replicación C (RFC) (Tsurimoto y Stillman, 1991)

Una vez sintetizados los cebadores, RFC reconoce la zona de interfase entre doble cadena y cadena sencilla, uniéndose a esta última en el extremo 3' y en una acción dependiente de ATP, desplaza a la polimerasa α -primasa compitiendo con ella por la unión a RPA (Yuzhakov *et al.*, 1999). Con esta unión se logra el cargado del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) a las horquillas de replicación; la función de esta proteína es contribuir a incrementar la procesividad de la DNA polimerasa δ para que pueda llevar a cabo su función eficientemente. Para montar sobre el DNA a la DNA polimerasa δ , esta enzima compite con RFC por unirse a RPA (Yuzhakov *et al.*, 1999); este reclutamiento da la pauta para el paso a la etapa de elongación.



Ya formados los cebadores sobre las cadenas molde, prosigue la etapa de elongación, que es aquella en la cual se sintetizan las dos cadenas complementarias del DNA. La síntesis llevada a cabo por el complejo DNA polimerasa δ -PCNA es procesiva y continua por al menos 5-10 kb. El intercambio de polimerasa α y polimerasa δ se lleva a cabo durante la formación del cebador de la cadena continua y en cada uno de los fragmentos de Okazaki y es así en gran medida debido a la propiedad sintética distributiva de la polimerasa α -primasa (Waga y Stillman, 1996). En la síntesis de los fragmentos de Okazaki, actúa la polimerasa δ y la síntesis se da de manera procesiva hasta que esta enzima se topa con el cebador del fragmento anterior.

Una vez que dos horquillas de replicación convergen en un punto, se da la terminación. Para que se lleve a cabo la maduración de los fragmentos de Okazaki, se tienen que remover los cebadores de RNA, rellenar con desoxirribonucleótidos los huecos que quedan después de eliminar los cebadores y finalmente unir estos fragmentos. En el proceso de remoción de los cebadores se han postulado dos modelos, en el primero actúan la RNasa H1 y FEN1 (Murante *et al.*, 1996), en el segundo participan: Dna2 y FEN1 (Bambara *et al.*, 1997). En cuanto al proceso de completar los huecos y sellar los tramos independientes, participan las DNA polimerasas δ o ϵ y la DNA ligasa I

Regulación de la Replicación por Fosforilación

Como se puede observar, el proceso de replicación es bastante complejo y su regulación dentro del ciclo celular también lo es

Dado que una célula no puede comenzar a duplicar su material genético hasta que se tiene certeza de que todo en el entorno es adecuado y de que están disponibles los elementos necesarios para que se lleve a cabo de manera continua y eficiente, se requiere de un control muy efectivo y la etapa sobre la que hay mayor regulación, es la de iniciación.

Como ya se vio anteriormente, el encendido de los orígenes de replicación requiere la participación de complejos ciclina/Cdk de fase S. Dados los tiempos en que se cree que deberían de ocurrir los eventos de fosforilación de las diferentes proteínas, se ha propuesto que sean los complejos de ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2 los que estén involucrados en la etapa de iniciación.

Aunque los datos son contradictorios en ocasiones, el complejo de ciclina E/Cdk2 parece jugar un papel central en el control de la entrada a la fase S, mientras que el complejo formado con la ciclina A, se asocia con el mantenimiento de esta misma fase (Sherr, 1994).

Por lo que respecta a otras proteínas involucradas en los complejos de iniciación e inclusive durante las etapas de elongación y terminación, se ha encontrado evidencia de cambios en el estado de fosforilación en varias de ellas, lo que lleva a cambios en su capacidad de interaccionar con las demás proteínas. Una de ellas es precisamente la DNA polimerasa α -primasa, cuya actividad se ha

encontrado implicada tanto en el proceso replicativo, como en el control del ciclo celular (Foiani *et al.*, 1997)

Esta enzima, aislada a partir de diferentes especies, se ha encontrado que está compuesta por cuatro subunidades de aproximadamente 180, 70, 58 y 48 kDa, de las cuales, la subunidad de 180 kDa es la que posee la capacidad catalítica de polimerasa, la de 70 kDa se piensa que tiene una función regulatoria y las de 58 y 48 kDa tienen asociada la actividad de primasa (Wang, 1996). Se ha reportado que la concentración de la enzima es constante a través del ciclo celular (Wahl *et al.*, 1988).

Varios reportes muestran que las subunidades de 180 y 70 kDa se fosforilan *in vitro* por complejos ciclina/Cdk en ciertos residuos, que coinciden perfectamente con los que se han encontrado fosforilados *in vivo* (Nasheuer *et al.*, 1991; Voitenleitner *et al.*, 1999). En general estos estudios muestran que la actividad de polimerasa no se afecta; sin embargo, la actividad de primasa sí se incrementa (Voitenleitner *et al.*, 1997). Ensayos mas específicos empleando como modelo la replicación del DNA del SV40, han mostrado que la fosforilación de la polimerasa α por complejos ciclina E/Cdk2 afecta a las subunidades de 180 kDa y 70 kDa y estimula el inicio de la replicación. Por otra parte, la fosforilación por complejos ciclina A/Cdk2 también afecta a ambas subunidades, encontrándose que el tratamiento de la subunidad de 70 kDa con tripsina, genera un fosfopéptido que comprende los residuos 141-160 y parece jugar un papel determinante en la actividad replicativa, ya que al mutar los residuos blanco de Cdk2 comprendidos

en este péptido, dicha actividad se inhibe (Voitenleitner *et al.*, 1997; Schub *et al.*, 2001)

Los resultados de estos trabajos de fosforilación *in vitro*, parecen mostrar que cuando la fosforilación ocurre sobre la subunidad de 180 kDa o bien sobre las subunidades de 180 Y 70 kDa, la capacidad de la holoenzima para iniciar la replicación de SV40 se inhibe; por el contrario, si solamente se fosforila la subunidad de 70 kDa, la capacidad de iniciación se activa (Schub *et al.*, 2001) La forma hiperfosforilada de la enzima (ambas subunidades), muestra menor afinidad por DNA de cadena sencilla.

Además, datos *in vivo* han revelado que la polimerasa en las células en G1/S presenta un patrón de fosforilación igual al encontrado al someter a la polimerasa a ensayo de cinasa con complejos ciclina E/Cdk2, mientras que en las células de G2 el patrón es igual al encontrado al someter a la enzima a fosforilación por complejos ciclina A/Cdk2 (Voitenleitner *et al.*, 1999)

Por otro lado, se ha visto la existencia de dos subpoblaciones de la DNA polimerasa α inmunológicamente diferentes; una de ellas se trata de una forma hipofosforilada de la polimerasa que se asocia con la fosfatasa PP2A y con complejos ciclina E/Cdk2 en G1 y la otra es una forma fosforilada que se asocia con complejos ciclina A/Cdk2 en S y G2. Importantemente, la forma hipofosforilada colocaliza con MCM2 (quien solo participa en el encendido de los orígenes y después es excluida de ellos) en núcleos obtenidos de células en fase S y su

presencia precede a la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), mientras que la forma fosforilada colocaliza con los focos de replicación, pero no con MCM2 (Dehde *et al*, 2001), lo que sugiere que la forma hipofosforilada participa en los orígenes de replicación y la forma fosforilada en la síntesis de los cebadores para el comienzo de la replicación.

Otra proteína de gran importancia por su participación en las horquillas de replicación (y en otros procesos celulares como reparación) es PCNA. Varias evidencias han mostrado a PCNA asociada a p21, un inhibidor de Cdks, en complejos con diversos pares ciclina/Cdk, por lo cual se ha sugerido que tiene un papel de conector o adaptador de sustratos a la cinasa que habrá de modificarlos. Este es el caso del complejo ternario que forma con ciclina A/Cdk2, el cual fosforila la región de unión a PCNA de la subunidad mayor de RFC y también fosforila a la DNA ligasa (Koundrioukoff *et al.*, 2000).

También, como ya se mencionó antes, se sabe que dos de las tres subunidades que componen a RPA se fosforilan; en el modelo de replicación de SV40 se ha visto que esta fosforilación es dependiente del ciclo celular y necesaria para la interacción con el antígeno T y la unión de ambas proteínas al origen (D'Urso *et al.*, 1990; Dutta y Stillman, 1992); a diferencia de los sistemas eucarióticos, en que la fosforilación de las MCMs inhibe su reensamblaje, la fosforilación del antígeno T promueve su unión al origen de replicación del SV40 (Hua *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Al parecer RPA también se fosforila por acción de la DNA-PK y esta fosforilación promueve su actividad como enzima reparativa, mientras que inhibe su función replicativa (Brush *et al.*, 1994).

EL CICLO CELULAR EN PLANTAS

El ciclo celular es un proceso vital y a pesar de no ser idéntico en todos los organismos estudiados hasta ahora, muchas de las proteínas o al menos de las funciones se han conservado desde las levaduras hasta los mamíferos. Desde la década pasada se han hecho grandes esfuerzos por dilucidar si estas funciones también se encuentran representadas en las plantas.

Hasta hoy, se han encontrado en células vegetales diversas ciclinas y Cdks por su parecido en secuencia con las de mamíferos y, al parecer, cubren funciones similares a las encontradas en estos organismos (Huntley y Murray, 1999; Mironov *et al.*, 1999).

Cinasas dependientes de Ciclinas

Por lo que respecta a las ciclinas se han encontrado y clonado un gran número de proteínas relacionadas a cdc2/CDC28, ejemplos de ello se han encontrado en tabaco (Setiady *et al.*, 1996), maíz (Colasanti *et al.*, 1991), arroz (Umeda *et al.*, 1999) y alfalfa (Magyar *et al.*, 1993).

Se han clasificado en tres grupos: tipo A, las que poseen la secuencia PSTAIRE, tipo B las que tienen secuencias relacionadas pero no iguales y el tercer grupo lo conforman las que no tienen secuencias relacionadas pero se les ha encontrado asociación con ciclinas (Mironov *et al.*, 1999).

Este hecho contrasta con lo reportado para mamíferos, dado que las Cdks de plantas que actúan preferentemente en G2 y M son las tipo B (no poseen secuencia PSTAIRE), mientras que las tipo A presentan alta actividad en S, G2 y M; estas Cdks se ubican en núcleo durante la interfase y la profase temprana (Mironov *et al.*, 1999) No se han encontrado homólogos con las cinasas de G1 de mamíferos.

Aunque no se tiene bien establecido el papel que juegan estas Cdks en cada una de las especies en que se han aislado, en *A. thaliana* se ha visto que la regulación negativa de CDC2aAt, es suficiente para comprometer la velocidad de proliferación y otros aspectos de la división como la orientación de los planos de división y el control del tamaño celular (Hemerly *et al.*, 1995).

Ciclinas

En cuanto a las ciclinas, pasa algo similar a lo que se describió para las Cdks. Se han encontrado diversos homólogos en organismos como: alfalfa (Dahl *et al.*, 1995), *Arabidopsis* (Day *et al.*, 1998; De Veylder *et al.*, 1999) y maíz (Renaudin *et al.*, 1994). Estas proteínas han sido clasificadas en nueve tipos de acuerdo a la caja de ciclina que presentan: A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3 y D4 (Renaudin *et al.*, 1996). En general, la expresión de estas ciclinas corresponde en tiempos del ciclo celular con sus contrapartes en mamíferos; al parecer la ciclina D3 en *Arabidopsis* está involucrada en la percepción del estímulo generado por citocininas y se sugiere que cumple un papel en la transición G1/S (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999).

Las ciclinas A y B se expresan en S/G₂/M y G₂/M respectivamente, de manera similar a como ocurre en mamíferos (Huntley y Murray, 1999) De cualquier manera y como ocurre en estos sistemas, se siguen encontrando genes con secuencias de ciclinas cuya participación en el ciclo celular no es clara y al mismo tiempo, aspectos de las ya clasificadas que no son los que se esperarían para ese tipo de ciclina. Las diversas formas encontradas dentro de cada clase de ciclinas han mostrado no ser redundantes, por ejemplo Cyc B1;1 tiene una localización predominantemente nuclear mientras que Cyc B1;2 presenta un comportamiento sumamente parecido a la ciclina B de humanos, permaneciendo en citoplasma hasta un poco antes del desensamblaje de la membrana nuclear (Mironov et al., 1999).

Otras Proteínas Homólogas

En plantas también se han encontrado otras proteínas que guardan homología y corresponden en función a las de humano. En *A. thaliana* se ha encontrado un homólogo de Cks1/Suc1 (subunidad de Cdks) que es capaz de unirse *in vitro* a Cdks tipos A y B, rescatando una mutante termosensible de *cdc2* cuando se expresa en concentraciones bajas a moderadas; en concentraciones altas, esta proteína detiene el ciclo celular (De Veylder *et al.*, 1997) También en *Arabidopsis thaliana* se han reportado CKIs (inhibidores de Cdks) que han mostrado tener la misma actividad de unión a complejos ciclina/Cdk e inhibición de la actividad de la cinasa y por lo tanto de la progresión del ciclo celular, que se ha visto previamente en mamíferos (Wang *et al.*, 1997)

De importancia especial fue el hallazgo en maíz, de cDNAs homólogos de Rb de humano (Grafi *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996; Ach *et al.*, 1997). El producto de una de estas clonas interacciona *in vitro* con ciclinas D de *A. thaliana* (Huntley *et al.*, 1998), así como con homólogos de E2F en trigo (Gutiérrez, 1998). Se ha visto que el papel de este factor transcripcional en plantas, es al parecer igual al que se ha demostrado en metazoarios (Helin, 1998).

De esta manera, se tiene un panorama muy general y aún incipiente de la regulación de ciclo celular en plantas; sin embargo, las evidencias muestran que en gran medida los mecanismos se han conservado a lo largo de toda la escala evolutiva de los eucariontes.

ANTECEDENTES

Los tiempos en los que se llevan a cabo algunos eventos del ciclo celular en maíz han sido determinados. Se ha visto que la fase de síntesis del DNA comienza entre las 12-15 h de imbibición y que las primeras figuras mitóticas aparecen entre las 24-28 h (Baiza *et al.*, 1989). Cuando se emplea la citocinina sintética, benciladenina (BA), el tiempo en el que comienza la fase de síntesis del DNA se acorta notablemente, principiando entre las 4-6 h y al mismo tiempo la aparición de figuras mitóticas también ocurre mucho antes, entre las 15-18 h (Reyes-Jiménez *et al.*, 1991).

Se ha visto que la BA estimula el metabolismo de DNA promoviendo la actividad de las DNA polimerasas (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990). El efecto estimulante de la síntesis de DNA, no se presenta cuando se adiciona α -amanitina junto con la hormona, indicando que el efecto probablemente no se debe solo a la activación de las enzimas, sino también a la expresión de los genes correspondientes (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990).

En ensayos de actividad de polimerasa, se encontró que tanto la DNA polimerasa 1 como la DNA polimerasa 2 se estimulaban en presencia de citocininas. Para la DNA polimerasa 1 se encontraron incrementos en la actividad de 294% a las 6 h de germinación y 145% a las 20 h de germinación, con relación a la actividad presente en ejes control a las mismas horas de germinación,

mientras que para la DNA polimerasa 2 los incrementos en la actividad fueron de 475% y 285% a las 6 y 20 horas respectivamente (Gómez-Roig, 1998)

En la literatura se ha reportado la existencia de modificación de polimerasas tipo α por fosforilación, entre ellas la de maíz (Nasheuer *et al.*, 1991; Ramachandra *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1995; Coello y Vázquez-Ramos, 1995). El estado de fosforilación de la enzima de maíz, cambia conforme la germinación avanza, alcanzando el pico máximo de incorporación de marca radioactiva en ejes control, entre las 11-14 h, lo que corresponde al tiempo en el que se inicia la replicación (Baiza *et al.*, 1989). Este fosfato incorporado permanece al menos hasta las 24 h, después de las cuales ocurre desfosforilación, para volver a observarse fosforilación hacia las 48 h (Coello y Vázquez-Ramos, 1995)

Como se menciona en la introducción, no hay un consenso acerca de cómo el estado de fosforilación de las polimerasas afecta a la actividad catalítica. En el caso de maíz, la fosforilación *in vitro* de la enzima de 3 h de germinación con caseína cinasa II, no causó alteración alguna en la actividad o procesividad de esta enzima (Coello y Vázquez-Ramos, 1995). Sin embargo, el tipo de cinasa empleado podría no haber fosforilado los residuos críticos y ello deja abierta la posibilidad de probar otro tipo de cinasas, especialmente las Cdks por su papel regulatorio dentro del ciclo celular

En maíz se ha visto que inmunoprecipitados de PCNA con anticuerpos homólogos, traen consigo una actividad de cinasa que fosforila tanto a la histona H1 como, y muy importantemente, a la proteína Rb. La fosforilación de Rb disminuye cuando los inmunoprecipitados son preincubados en presencia de cualquiera de dos análogos de purina, roscovitina u olomoucina, que inhiben selectivamente la actividad de las Cdk's (Sánchez *et al.*, 2002).

En estos mismos inmunoprecipitados se ha encontrado una ciclina D putativa (reconocida por anticuerpos heterólogos) (Herrera-Teijeiro *et al.*, 2000) La formación del complejo se observa hasta las 15 h de germinación y posteriormente a este tiempo, la ciclina D se degrada (Cruz-García *et al.*, 1998)

Anticuerpos dirigidos contra la región PSTAIRE reconocen en estos inmunoprecipitados dos bandas de alrededor de 32 kDa y 36 kDa. Ensayos de curso temporal mostraron que la banda de 36 kDa se incrementa conforme avanza la germinación, mientras que la de 32kDa disminuye y desaparece hacia las 15 h (Sánchez *et al.*, 2002).

Se comparó la actividad de los inmunoprecipitados de PCNA con la de precipitados con la proteína p13^{Suc1}, que une fuertemente a las Cdk's. Estos ensayos mostraron que los inmunoprecipitados de PCNA presentaban actividad en las primeras horas de la germinación, mientras que los precipitados de p13^{Suc1} presentaban actividad en tiempos tardíos de la germinación. Curiosamente, sólo la proteína de 36 kDa se une a p13^{Suc1} (Sánchez *et al.*, 2002). Esto correlaciona con lo reportado por Grafi y Larkins (1995) acerca de una cinasa de endospermo de maíz, que fosforila a la histona H1 y se une a E2F y E1A, pero no se une a Suc1;

esta cinasa no aparece en células mitóticas del endospermo. También Magyar *et al.* (1993) reportaron la presencia de una cinasa que no une a p13^{Suc1}, en inmunoprecipitados de ciclina A de células de alfalfa en fase S temprana

HIPÓTESIS

Dado que la benciladenina adelanta los eventos del ciclo celular, se espera que la fosforilación de la DNA polimerasa 2 de maíz ocurra en tiempos anteriores en los ejes tratados si se les compara con los ejes control. Esta fosforilación podría correlacionarse con los cambios en la actividad de las polimerasas, estando involucradas Cdks que se expresan en la transición G1/S y en S.

OBJETIVOS

- ◆ Buscar complejos ciclina/Cdk de la transición G1/S o de fase S y para determinar si pudieran estar involucrados en la fosforilación de las DNA polimerasas 1 y 2.
- ◆ Determinar si el patrón de fosforilación de la DNA polimerasa 2 cambia por la acción de posibles complejos ciclina/Cdk, obtenidos a partir de extractos proteicos de diferentes tiempos de germinación control y estimulada.
- ◆ Establecer si se dan cambios en la actividad de las enzimas replicativas, que correlacionen con el cambio en el estado de fosforilación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico:

Se emplearon semillas de maíz variedad chalqueño, obtenidas de un proveedor en el Valle de Chalco, Edo de México

Durante este estudio se emplearon ejes embrionarios, los cuales fueron obtenidos por disección manual y almacenados a 4°C hasta su utilización

Obtención de los extractos celulares

-Prueba de actividad estimulante de benciladenina

Esta prueba se hizo por triplicado tanto para ejes control como para ejes tratados con BA $1 \times 10^{-6} \text{M}$, para determinar si la solución de la citocinina a emplear en los experimentos de actividad, era capaz de estimular la proliferación celular. Se incubaron 10 ejes embrionarios con 100 μL de solución amortiguadora de imbibición y 20 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H]-timidina en una caja Petri, durante 6 h (tiempo en el cual se detecta un pico de incorporación) a 25°C.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los ejes con citrato de sodio al 1% y se homogeneizaron en un Polytron con 1.2 mL de solución amortiguadora de homogenado para prueba de incorporación de [^3H]-timidina. Al homogenado se le adicionó TCA al 10% y se incubó en hielo durante una h para precipitar los ácidos nucleicos. Una vez transcurrido el tiempo, el homogenado se filtró al vacío a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C, Whatman), lavando dos veces el tubo con TCA 2% y después con etanol. Los filtros se secaron

completamente en una estufa a 54°C y por último se transfirieron a frascos viales con 2.5 mL de líquido de centelleo; la lectura de la marca incorporada al DNA fue detectada por un contador de centelleo.

-Imbibición de ejes embrionarios.

Para preparar los extractos a partir de los cuales se obtuvo la fuente de cinasa, se emplearon 25 ejes por tiempo y condición (control o estimulada por BA). Todos los pasos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, bajo una campana de flujo laminar. Los ejes se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 0.1% durante 30 seg y posteriormente se lavaron con agua destilada y desionizada estéril para eliminar los restos de la solución anterior. Después del paso de desinfección, los ejes se dejaron secar sobre un papel filtro estéril durante 20 min. Posteriormente, se colocaron en cajas Petri con un papel filtro Whatman 3 mm (también estéril) y se les adicionó 1.2 a 1.5 mL de solución amortiguadora de imbibición, suficiente para cubrirlos sin llegar a quedar flotando. En el caso de los experimentos con hormona (benciladenina), la concentración final empleada en el amortiguador de imbibición fue $1 \times 10^{-6} M$.

Los ejes se incubaron a 25°C durante los tiempos requeridos, verificando que siempre tuvieran suficiente cantidad de la solución amortiguadora de imbibición.

Se usaron ejes embrionarios de semilla seca para la purificación parcial de las DNA polimerasas. En este caso se emplearon 3 g de ejes embrionarios dado

que el extracto proteico tuvo que pasarse a través de dos columnas cromatográficas para su semipurificación

-Obtención del extracto proteico

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C y en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas para evitar la degradación proteica.

Una vez embebidos los ejes embrionarios por el periodo de tiempo deseado, se molieron manualmente en mortero con 1 mL de solución amortiguadora de homogenado igual para todos los tiempos manejados. El homogenado obtenido se centrifugó a 10,500 g durante 15 min con el fin de eliminar la mayor parte de los restos celulares y de lípidos. El sobrenadante fue pasado a otro tubo y posteriormente centrifugado a 130,000 g durante 1 h con el fin de eliminar completamente restos celulares y lípidos que pudiesen interferir en los ensayos de fosforilación *in vitro* y actividad de las enzimas en estudio. Después de este último paso, los sobrenadantes fueron alícuotados y congelados a -70°C hasta su utilización

Es importante hacer notar que una misma alícuota no se empleó mas de tres veces para evitar resultados inciertos debido a la descongelación.

-Semipurificación de las DNA polimerasas

El extracto proteico para la obtención de las polimerasas se preparó bajo el mismo procedimiento de homogeneización y centrifugaciones descrito antes. Dicho extracto fue sometido a una cromatografía de intercambio iónico a través de DEAE-sefarosa; se empleó una columna de 30 mL de resina, que se fue

empacada manualmente. Todos los pasos del proceso cromatográfico (lavados, cargado y elución) se llevaron a cabo de manera automatizada en un FPLC.

La columna se lavó con 10 volúmenes de cama de la solución amortiguadora A, posteriormente se cargó el extracto proteico obtenido a un flujo de 0.5 mL/min; la columna se lavó con 5 volúmenes de cama de la solución amortiguadora A, en esta fracción no retenida eluye la DNA polimerasa 1. Para eluir las proteínas unidas a la resina, se hizo pasar un gradiente de 40-400 mM de fosfatos (solución amortiguadora A y solución amortiguadora B), la DNA polimerasa 2 eluye en estas fracciones, a una concentración aproximada de 120mM de fosfatos. Esta polimerasa 2 fue posteriormente pasada a través de una columna de pseudoafinidad de heparina-sefarosa; se empleó una columna preempacada de Heparin-HiTrap (Pharmacia) de 1 mL. La columna se lavó con 5 volúmenes de cama de la solución amortiguadora C, posteriormente se cargó un concentrado de las fracciones de DEAE donde había aparecido la actividad de la enzima, a un flujo de 0.5 mL/min; la columna se lavó con 5 volúmenes de cama de la solución amortiguadora C. Para eluir a la polimerasa 2 que se queda unida, se hizo pasar un gradiente de 150-1500 mM de NaCl (solución amortiguadora C y solución amortiguadora D), la polimerasa 2 eluye a una concentración aproximada de 830 mM de NaCl.

el método de Bradford

Se determinó la absorbancia de los extractos proteicos a 280 nm, tanto los crudos, como los semipurificados de las DNA polimerasas, para tener una noción de la cantidad de proteína presente en ellos

Por otra parte, se preparó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de 0-20 μg de proteína/mL, empleando el reactivo Bio-Rad protein assay (Bio-Rad), 200 μL del reactivo, volúmenes crecientes de la solución concentrada de BSA y el agua necesaria para llegar a 1mL, las absorbancias fueron determinadas a 595 nm. En la determinación de la cantidad de proteína total contenida en los extractos y las fracciones se tomaron 200 μL del reactivo, 1 μL del extracto o fracción proteica y 799 μL de agua destilada; los datos obtenidos fueron interpolados en la curva, obteniéndose una estimación cuantitativa de proteína en cada extracto. Con estos datos se hizo una calibración espectrofotométrica de todos los extractos de diferentes tiempos a usar en las inmunoprecipitaciones.

Ensayos de fosforilación

-Acoplamiento de anticuerpos contra ciclinas A o D a la proteína A-agarosa

Para este protocolo, se acopló un volumen de entre 5-10 μL de un anticuerpo heterólogo dirigido contra las ciclinas A de humano (Santa Cruz Biotechnologies H-432) o D₁ de humano (Santa Cruz Biotechnologies H-295) a 50 μL de proteína A-agarosa (Boehringer); en los casos en que se empleó un volumen pequeño de anticuerpo, se diluyó éste con 5 μL de solución A. La reacción de acoplamiento se incubó durante 12 h a 4°C en agitación suave. Se retiró el sobrenadante y se lavó la resina con solución A tres veces durante 10 min cada una. La resina fue conservada en solución A a 4°C hasta el momento de su uso.

-Inmunoprecipitación de ciclinas A o D

Se tomaron volúmenes de resina de entre 50-80 μ L (según la eficiencia del acoplamiento) y se pusieron en tubos eppendorf, se retiraron los sobrenadantes y se les adicionó un volumen equivalente a 100 g de proteína total de extracto de los diferentes tiempos empleados. Las reacciones se incubaron durante 12 h en agitación a 4°C. Al término de la incubación se lavaron los inmunoprecipitados con solución TSA, tres veces durante 15 min cada una, una vez lavados se emplearon para los ensayos de fosforilación.

-Acoplamiento de anticuerpos contra PCNA a la resina CNBr-sefarosa

Para este proceso se acopló un anticuerpo homólogo dirigido contra la proteína PCNA de maíz, a una resina CNBr-sefarosa (Amersham). Se resuspendieron 0.2 gr. de la resina en 1 mL de HCL 1 mM y se incubó durante 30 min a 4°C; la resina fue lavada 15 veces de manera rápida a la misma concentración de HCl y finalmente con amortiguador de acoplamiento pH 8.3. Los anticuerpos fueron diluidos en proporción 1:3 con solución de acoplamiento y la reacción se dejó proceder durante 12 h a 4°C, en agitación suave. En cada ocasión que se llevó a cabo este proceso de acoplamiento se realizó una comprobación de la eficiencia de unión del complejo PCNA-ciclina-Cdk, que permitió establecer la cantidad de resina a emplear para bajar una cantidad suficiente del complejo para los ensayos de fosforilación.

-Inmunoprecipitación de PCNA

Se tomaron volúmenes de 50 μL de resina acoplada con el anticuerpo contra PCNA en tubos eppendorf, se les retiró el sobrenadante y se les adicionó una cantidad de extracto proteico equivalente en todos los casos a 100 μg de proteína total de los extractos control y con BA de los diferentes tiempos empleados. Las reacciones se incubaron durante 12 h en agitación a 4°C. Al término de la incubación se lavaron los inmunoprecipitados con solución TSA, tres veces durante 15 min cada una, una vez lavados se emplearon para los ensayos de fosforilación.

-Ensayos de fosforilación *in vitro* con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP

Los inmunoprecipitados de PCNA fueron lavados con solución amortiguadora para ensayo de cinasa, antes de someterlos al ensayo de fosforilación. Todos los ensayos se llevaron a cabo en un volumen final de 40 μL ; se emplearon 4 μg del concentrado de fracciones de DNA polimerasa 2 o 40 μg de histona H1, 20 μM de ATP frío, 5 $\mu\text{Ci/mL}$ de ATP marcado con [$\gamma^{32}\text{P}$] y se emplea un volumen de solución amortiguadora para ensayo de cinasa, que tenga las concentraciones establecidas en el apéndice de soluciones. Para completar el volumen hasta 40 μL , se empleó agua destilada y desionizada. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se desnaturalizaron las proteínas adicionando solución amortiguadora de carga y calentando las muestras a 90°C. Las proteínas fueron cargadas en geles de poliacrilamida y sometidos a SDS-PAGE; los geles fueron transferidos a papel de

nitrocelulosa (Immobilón, Millipore) para realizar las inmunodetecciones y posteriormente fueron secados para exponerlos a autorradiografía.

-Acoplamiento de anticuerpos contra la DNA polimerasa 2 a la proteína A-agarosa

Para este protocolo, se acopló un anticuerpo homólogo dirigido contra la holoenzima de la DNA polimerasa 2 de maíz a proteína A-agarosa (Boheringer); para hacerlo, se emplearon 10 μ L del anticuerpo y 60 μ L de proteína A-agarosa. La reacción de acoplamiento se incubó durante 12 horas a 4°C en agitación suave. Se retiró el sobrenadante y se lavó la resina con solución A tres veces durante 10 minutos cada una. La resina fue conservada a 4°C en solución A, hasta el momento de su uso.

-Inmunoprecipitación de DNA polimerasa 2

La resina acoplada con el anticuerpo contra la polimerasa 2 (60 μ L) fue incubada con un volumen de 10 μ L del concentrado de polimerasa eluída de heparina; la reacción de inmunoprecipitación se dejó transcurrir por un periodo de 12 h a 4°C en agitación suave. Los inmunoprecipitados de la polimerasa 2 fueron lavados tres veces con solución A, durante 15 min cada uno.

Determinación de la actividad de las DNA polimerasas

-Activación de DNA de alto peso molecular

Se solubilizaron DNA de timo de ternera (Sigma) o de DNA de espermatozoos de salmón (Boehringer) y albúmina sérica bovina (BSA), ambos en concentración

final de 0.5 mg/mL, en solución amortiguadora para activación de DNA. El proceso de solubilización se llevó a cabo en agitación suave a 4°C durante toda la noche. La disolución anterior se hizo reaccionar con 1 µg de DNasaI, a 37°C durante 15 min; finalmente se desnaturizó la nucleasa calentando a 77°C durante 5 min y se guardó la solución a -20°C hasta su utilización.

-Determinación de actividad de DNA polimerasa post-fosforilación *in vitro*

Para estos ensayos se realizó primeramente la fosforilación *in vitro* de las polimerasas, tal y como se describe en el apartado "Ensayos de fosforilación *in vitro* con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP". La actividad de DNA polimerasa fue ensayada en un volumen final de 50 ó 25 µL; para ello se tomó un volumen de 5 ó 10 µL de la fracción previamente fosforilada *in vitro*, y se le adicionaron 20 ó 40 µL respectivamente de la solución amortiguadora para ensayo de actividad de DNA polimerasa. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 min, pasado este tiempo la reacción se detuvo adicionando TCA 10% para desnaturizar a las enzimas y precipitar también los ácidos nucleicos. La radiactividad insoluble en TCA se colectó filtrando al vacío a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C, Whatman); una vez secos los filtros se transfirieron a frascos viales con 2.5 mL de líquido de centelleo y la lectura de la marca incorporada al DNA fue detectada por un contador de centelleo.

RESULTADOS

Los datos presentados en los antecedentes acerca de la fosforilación de las DNA polimerasas de maíz, nos llevaron a proponer que el efecto estimulante de la BA sobre la actividad de polimerasas observado en maíz, podría tener una correlación con la fosforilación específica por Cdks. De ser así, la fosforilación debería acelerarse en ejes tratados con respecto a los ejes control y la fosforilación *in vitro* por complejos ciclina/Cdk debería provocar una modificación en la actividad de las DNA polimerasas.

Inmunodetección de ciclina A y actividad de cinasa

Partiendo de esta idea, se decidió buscar en maíz una ciclina tipo A e intentar su inmunoprecipitación en el complejo con su Cdk, para determinar en ensayos de fosforilación *in vitro* si la fosforilación de las DNA polimerasas 1 y 2 (tipos δ y α respectivamente) por este complejo provocaba cambios en su actividad; además para conocer el probable efecto de la BA. Para llevar a cabo este propósito, se tenía el precedente de que en alfalfa ya se había logrado inmunoprecipitar una ciclina A con anticuerpos heterólogos (contra la proteína de humano), que bajaba consigo una actividad de cinasa sobre histona H1 (Magyar et al , 1993); además, en nuestro laboratorio se había seguido este mismo protocolo para inmunoprecipitar a la ciclina D, obteniéndose resultados exitosos (Cruz-García et al., 1998).

Para lograr el objetivo de inmunoprecipitar a la ciclina A, se contaba con anticuerpos heterólogos contra la proteína de humano preparados en conejo (Santa Cruz Biotechnologies). Lo primero que se hizo fue comparar los cDNAs reportados de dos ciclinas A1 putativas de maíz (Renaudin *et al.*, 1996), con la secuencia de la ciclina A de humano. Se llevó a cabo un alineamiento entre las secuencias de la ciclina A de humano y las ciclinas de maíz, Zeama;CycA1;1 (Renaudin *et al.*, 1994) y Zeama;CycA1;2 (Hsieh y Wolniak, 1998). El porcentaje de identidad entre las dos proteínas de maíz fue de 74.9%, al comparar cada una de ellas con la de humano, los porcentajes de identidad fueron de 30.5% y 31.1% respectivamente. Este porcentaje de identidad hacía pensar que el uso de los anticuerpos heterólogos probablemente llevaría al reconocimiento de las proteínas de maíz.

Teniendo todo esto presente, se determinaron las condiciones para inmunodetectar la o las proteínas homólogas en maíz. Se logró la identificación de una ciclina A putativa en extractos crudos de maíz. La proteína identificada predominante y consistentemente, tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa (figura 1), tamaño que está sólo ligeramente por debajo de las proteínas codificadas por los genes reportados por Renaudin (1994) y por Hsieh y Wolniak (1998).

WB:anti-ciclina A

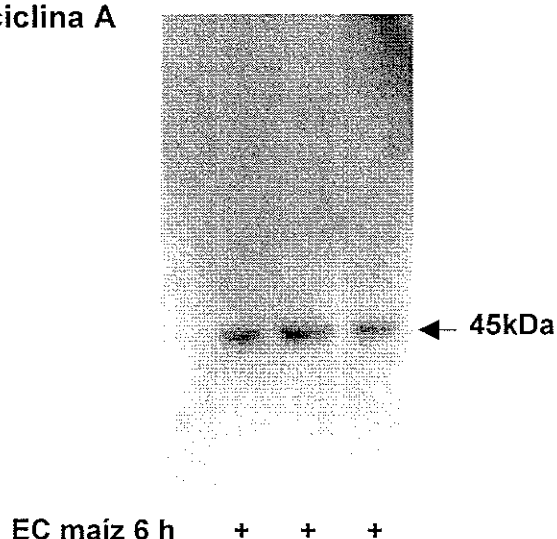


Fig. 1. Inmunodetección de ciclina A de maíz con anticuerpos heterólogos, dirigidos contra la ciclina A de humano. Extracto proteico (EC) de 6 horas de germinación fue separado por SDS-PAGE y transferido a membrana de inmobilón® para hacer el ensayo de detección por “Western-blot”. Los tres carriles corresponden al mismo extracto. El anticuerpo empleado está dirigido contra la ciclina A de humano y fue preparado en conejo; cruza tanto con ciclina A1 como con ciclina A2.

Una vez identificada la ciclina A putativa de maíz con los anticuerpos dirigidos contra la ciclina A de humano, se determinó la cantidad relativa de esta proteína en extractos crudos de maíz, obtenidos a partir de ejes embrionarios embebidos por diferentes periodos (ejes control). También se emplearon extractos obtenidos de ejes embebidos por los mismos periodos, pero en presencia de la hormona benciladenina (BA).

Los resultados sobrepuestos del “Western-blot” contra la ciclina A y contra la ciclina B como control de cantidad de proteína cargada al gel (ya que ésta no varía en condiciones control ni estimuladas (Cruz-García et al, 1998)), se muestran en la figura 2. Se observa el reconocimiento de la proteína de 35 kDa

correspondiente a ciclina B, donde puede verse que la cantidad de proteína presenta sólo algunas pequeñas fluctuaciones; por otra parte se observa también la proteína de 45 kDa que corresponde a la ciclina A putativa.

Se hizo una relación entre la cantidad de proteína (bandas de ciclina B) y la cantidad de ciclina A carril a carril, con lo cual se logró tener datos representativos del comportamiento de la ciclina A, lo que se muestra en la figura 3. Para los extractos obtenidos a partir de ejes control, en semilla seca se detecta una cantidad baja de la proteína, la cual aumenta hacia las 3 h y se mantiene aproximadamente constante hasta las 6 h. Hacia las 15 h se ve otro pequeño incremento en la cantidad de la ciclina A y el nivel se mantiene prácticamente constante hasta las 24 h. Con BA en cambio, a las 3 h se detecta una cantidad de casi el doble de la proteína, la cual se mantiene en niveles semejantes hasta las 15 h y finalmente cae de manera brusca para las 24 h.

En presencia de BA, la mayor cantidad de la ciclina A putativa en tiempos iniciales, estaría de acuerdo con la iniciación temprana de la fase de replicación que provocan las citocininas. La caída brusca después de las 15 h podría tener que ver con el establecimiento de la metafase, durante la mitosis.

WB: anti-ciclina A
WB: anti-ciclina B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

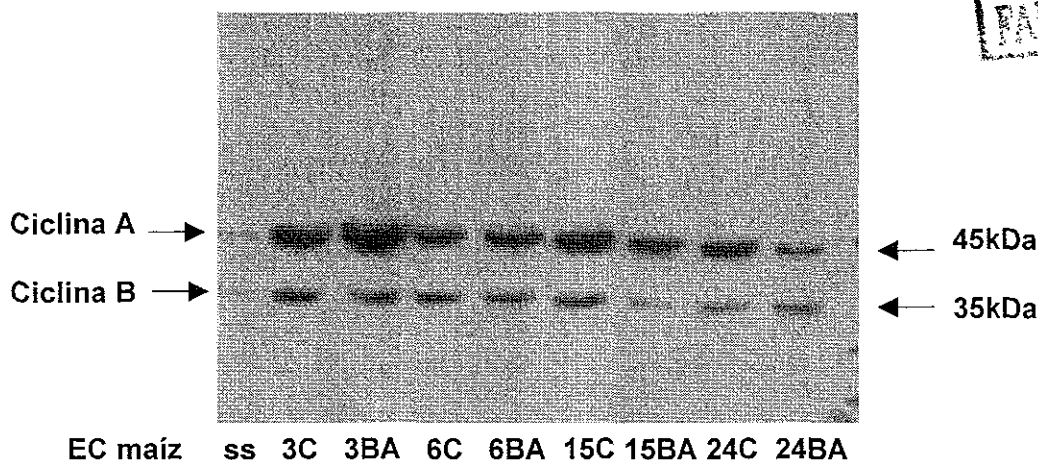


Fig. 2 Determinación de ciclina A y B de maíz durante la germinación. Extractos de maíz obtenidos a partir de ejes sin embeber, semilla seca (ss) o embebidos por periodos de 3, 6, 15 y 24 h control (C) y en presencia de benciladenina (BA), fueron separados en SDS-PAGE y transferidos a inmobilón® para la inmunodetección con anticuerpos heterólogos dirigidos contra la ciclina A; la misma membrana fue lavada durante 1 hora a 55°C con una solución para lavado de membranas y empleada para el "Western-blot" con el anticuerpo contra la ciclina B de humano. Se muestran las dos placas de inmunodetección sobrepuestas.

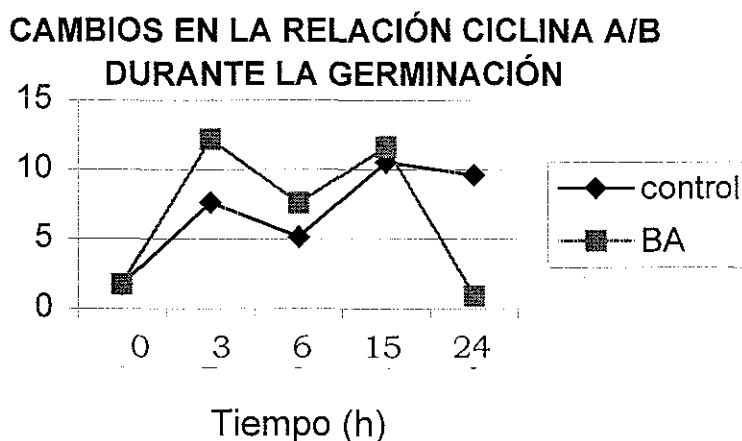


Fig. 3. Determinación del comportamiento de la ciclina A durante la germinación. Se muestra el promedio de dos experimentos de inmunodetección de ciclina A en diferentes tiempos de germinación, los datos fueron normalizados respecto a la cantidad de proteína detectada por el "Western" contra ciclina B en cada carril.

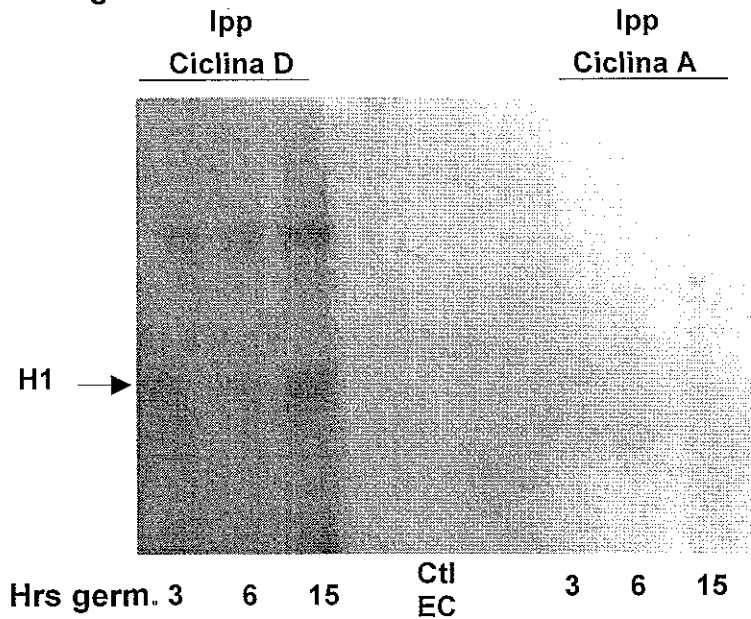
El siguiente paso consistió en intentar la inmunoprecipitación de la ciclina A con estos mismos anticuerpos, partiendo de extractos de 6 h de germinación control, en que ya se vio que la proteína es estable; para ello se tuvo que empezar por montar la técnica de inmunoprecipitación. Después de comprobar que los anticuerpos se unieran a proteína A-agarosa, que fue la matriz con la que se intentó inmunoprecipitar a la ciclina A, se hicieron ensayos variando tiempos de incubación y tiempos y tipos de lavado

Los resultados de los experimentos de inmunoprecipitación no fueron alentadores; se presentó el problema de que para lograr observar la banda de ciclina A, se necesitaba dejar mucho tiempo exponiendo la película a la reacción quimioluminiscente y por la metodología empleada para la inmunoprecipitación, la señal de la cadena pesada de las IgGs enmascaraba la inmunodetección de la ciclina A.

Dado que no se tenía la certeza de estar precipitando a la proteína de interés y sabiendo que en el grupo ya se había logrado este procedimiento con la ciclina D, se procedió a hacer un ensayo de fosforilación *in vitro* con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, con la idea de que si efectivamente se estaba uniendo la ciclina y su Cdk asociada, aunque no se pudiesen reconocer por "Western-blot", podría verse la actividad de cinasa sobre un sustrato exógeno como la histona H1. Para el protocolo experimental se empleó este sustrato y los inmunoprecipitados de ciclina A de diferentes tiempos de germinación, como fuente potencial de cinasa; se incluyeron los inmunoprecipitados de ciclina D de esos mismos tiempos como

control positivo, además de un control negativo de incubación del extracto proteico de maíz solamente con proteína A-agarosa (sin anticuerpo).

Autorradiografía



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4 Fosforilación *in vitro* de histona H1 con inmunoprecipitados de ciclina D y de ciclina A. Extractos de 3, 6 y 15 horas de germinación en condición control, fueron empleados para hacer las inmunoprecipitaciones con anticuerpos heterólogos contra la ciclina D de humano y contra la ciclina A también de humano; se incluyó un control de proteína A-agarosa incubada con extracto crudo de maíz (Ctl EC) como control de unión inespecífica. Los inmunoprecipitados fueron enfrentados a histona H1 en buffer de cinasa durante 30 min a 30°C. Los ensayos fueron resueltos en SDS-PAGE y el gel fue secado para exponer a autorradiografía.

En la figura 4 se puede ver en los tres primeros carriles la fosforilación de histona H1 por los inmunoprecipitados de ciclina D, mientras que ni en el control de proteína A con extracto crudo de maíz ni en los carriles que corresponden a inmunoprecipitados de ciclina A se observan bandas de fosforilación; esto llevó a

pensar que a pesar de que el anticuerpo heterólogo sí estaba reconociendo una banda para la ciclina A putativa, no resultaba eficiente para la inmunoprecipitación de la misma.

Estos problemas metodológicos llevaron a la búsqueda de otra posibilidad de inmunodetección para esta ciclina A putativa. En esta búsqueda se encontró otro anticuerpo contra ciclina A, dirigido contra el carboxilo terminal de la proteína de ratón y preparado en cabra (Santa Cruz Biotechnologies (C-19)-G). El empleo del anticuerpo preparado en conejo en el proceso de inmunoprecipitación y del anticuerpo preparado en cabra en el proceso de inmunodetección, permitiría el no reconocer las IgGs y por lo tanto el que se pudiera ver la ciclina A.

En el panel A de la figura 5 se puede ver el “Western-blot” con el anticuerpo (hecho en conejo) dirigido contra la proteína de humano. Se observa el reconocimiento de la proteína de 45 kDa y además otra proteína de aproximadamente 32 kDa; esta última se reconoce intensamente debido a que el periodo de incubación con el primer anticuerpo fue mas largo y el tiempo de exposición de la placa también fue mayor. En el panel B se puede ver la misma membrana que fue sometida a lavado y después a otro proceso de “Western” en donde se empleó el anticuerpo contra ratón (hecho en cabra); en éste puede verse el reconocimiento de la proteína de 45 kDa de peso molecular que también fue reconocida en el panel A.

El resultado, además de mostrar que sí pueden usarse ambos anticuerpos en el proceso de inmunodetección y posiblemente en el de inmunoprecipitación,

sugiere fuertemente que el reconocimiento de la banda de 45 kDa como ciclina A putativa, es un resultado concreto y no se trata de algún tipo de artefacto.

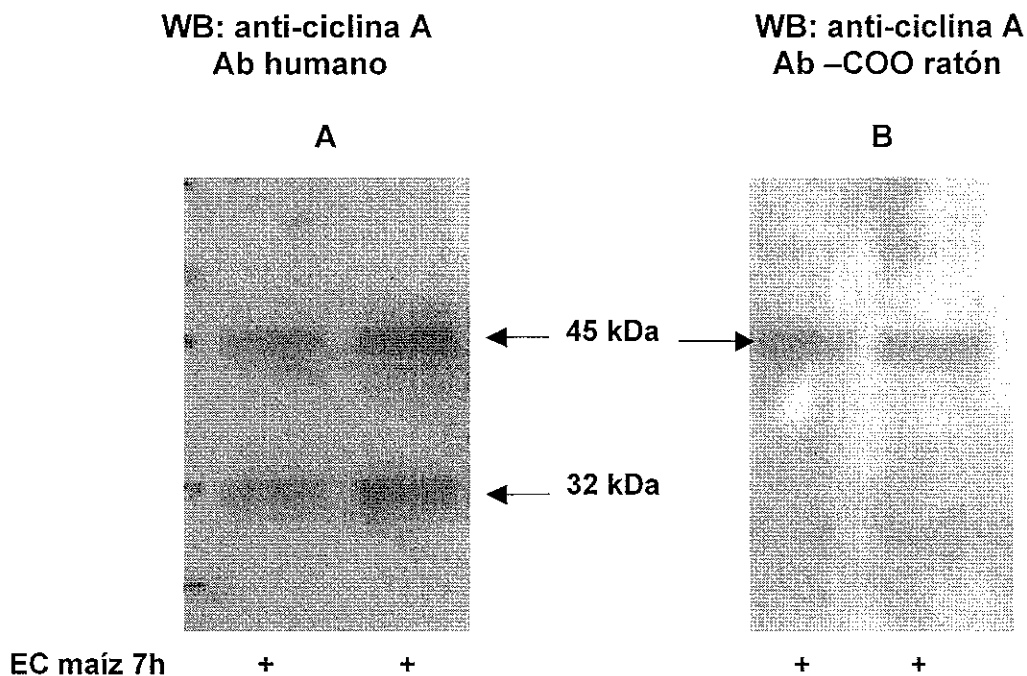


Fig. 5. Inmunorreconocimiento de ciclina A de maíz con dos diferentes anticuerpos. **A:** Ambos carriles fueron cargados con extracto proteico de ejes embebidos durante 7 h de germinación en condición control; el “Western-blot” se llevó a cabo con el anticuerpo dirigido contra la ciclina A de humanos, preparado en conejo (Ab humano). **B:** La misma membrana fue lavada durante 1 h a 55°C con solución para lavado de membranas y se practicó un segundo “Western-blot”, este se llevó a cabo con un anticuerpo preparado en cabra y dirigido contra el extremo carboxilo terminal de la ciclina A de ratón (Ab -COO ratón).

Con la seguridad de que ambos anticuerpos reconocen a la misma proteína, se hicieron nuevamente los ensayos de inmunoprecipitación. En la figura 6A se muestra el resultado de inmunoprecipitar a la ciclina A putativa, a partir de extractos proteicos de 7 y 24 h de germinación con los anticuerpos dirigidos contra

la ciclina A de humano y su posterior reconocimiento con los anticuerpos dirigidos contra la ciclina A de ratón.

En los carriles que corresponden a los inmunoprecipitados de maíz (5 y 6), se da el reconocimiento de la banda de 45 kDa, que se identifica como ciclina A; esta misma banda se reconoce también en los carriles de sobrenadantes (1 y 2) y en el carril control de extracto crudo de maíz (carril 8). Por otro lado, el carril de inmunoprecipitado de células humanas de la línea MCF-7, muestra el reconocimiento de una banda de 52kDa (carril 7), que corresponde con el peso reportado para esta proteína (Yang *et al.*,1997); la banda identificada en el inmunoprecipitado es igual a la que se reconoce en el control de extracto de células MCF-7 (carril 9) y en el sobrenadante respectivo (carril 3). Esto demuestra que efectivamente se puede inmunoprecipitar un homólogo de la ciclina A en maíz con los anticuerpos heterólogos.

Al revelar esta misma membrana con el anticuerpo dirigido contra la región PSTAIRE presente en Cdk-A, figura 6B, se aprecia el reconocimiento de las dos bandas características en maíz, de aproximadamente 32 y 36 kDa, en los inmunoprecipitados de 7 y 24 horas, lo que estaría reflejando que la ciclina A está unida con una cinasa tipo Cdk-A, tanto en tiempos iniciales como en tiempos avanzados de la germinación, lo cual concuerda con sus funciones tanto en S como en principios de M. En cuanto al control de extracto crudo de maíz de 24 h de germinación, sólo se reconoció la banda de alto peso molecular, este comportamiento ya fue reportado por Sánchez *et al.* en el 2002, dado que la proteína de 32 kDa desaparece después de las 6 h. En el inmunoprecipitado de

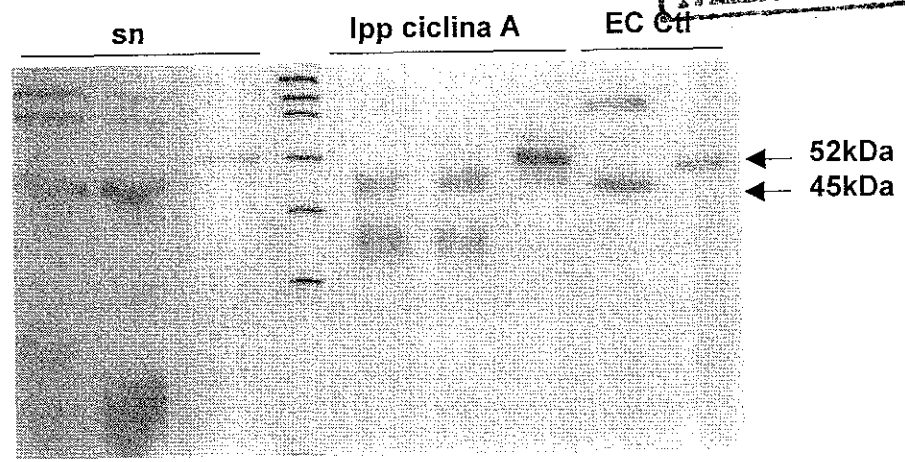
células humanas el reconocimiento de bandas que pudieran corresponder a proteínas tipo PSTAIRE no fue claro y no se detectó ninguna en el control de extracto proteico respectivo.

No obstante, a pesar de detectarse una proteína reconocida por el anticuerpo dirigido contra la región PSTAIRE en los inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-ciclina A, los intentos por detectar una actividad de cinasa en todos los casos resultaron infructuosos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

WB: anti-ciclina A

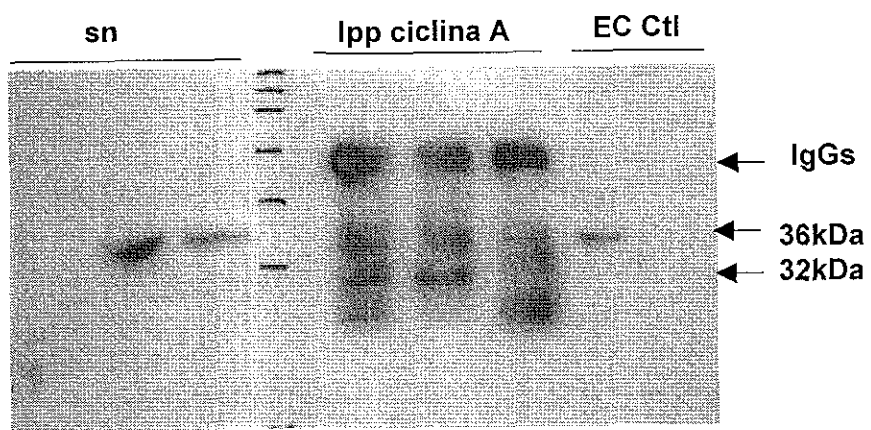
A



Hrs germ.	7	24	-	-	7	24	-	24	-
MCF-7	-	-	+	-	-	-	+	-	+

WB: anti-cdk2 (PSTAIRE)

B



Hrs germ.	7	24	-	-	7	24	-	24	-
MCF-7	-	-	+	-	-	-	+	-	+

Fig. 6 Inmunoprecipitación e inmunodetección de ciclina A con anticuerpos heterólogos **A:** Ipp ciclina A= inmunoprecipitados de ciclina A de extractos de maíz de 7 y 24 horas de germinación o de extracto de células humanas de la línea MCF-7 respectivamente; sn= sobrenadantes de estos inmunoprecipitados; EC Ctl= extracto crudo de maíz de 24h de germinación o extracto de células humanas MCF-7 respectivamente. La inmunodetección se llevó a cabo con el anticuerpo contra la ciclina A de ratón (en cabra). **B:** La membrana fue lavada como se describió en las figuras 4 y 5 y se llevó a cabo el "Western-blot" contra la región PSTAIRE (Cdks), con anticuerpos heterólogos dirigidos contra la proteína de humano

Actividad de cinasa que co-eluye con la DNA polimerasa 2

Debido a los problemas ya descritos, se tuvo que pensar en otra forma de cubrir los objetivos del proyecto.

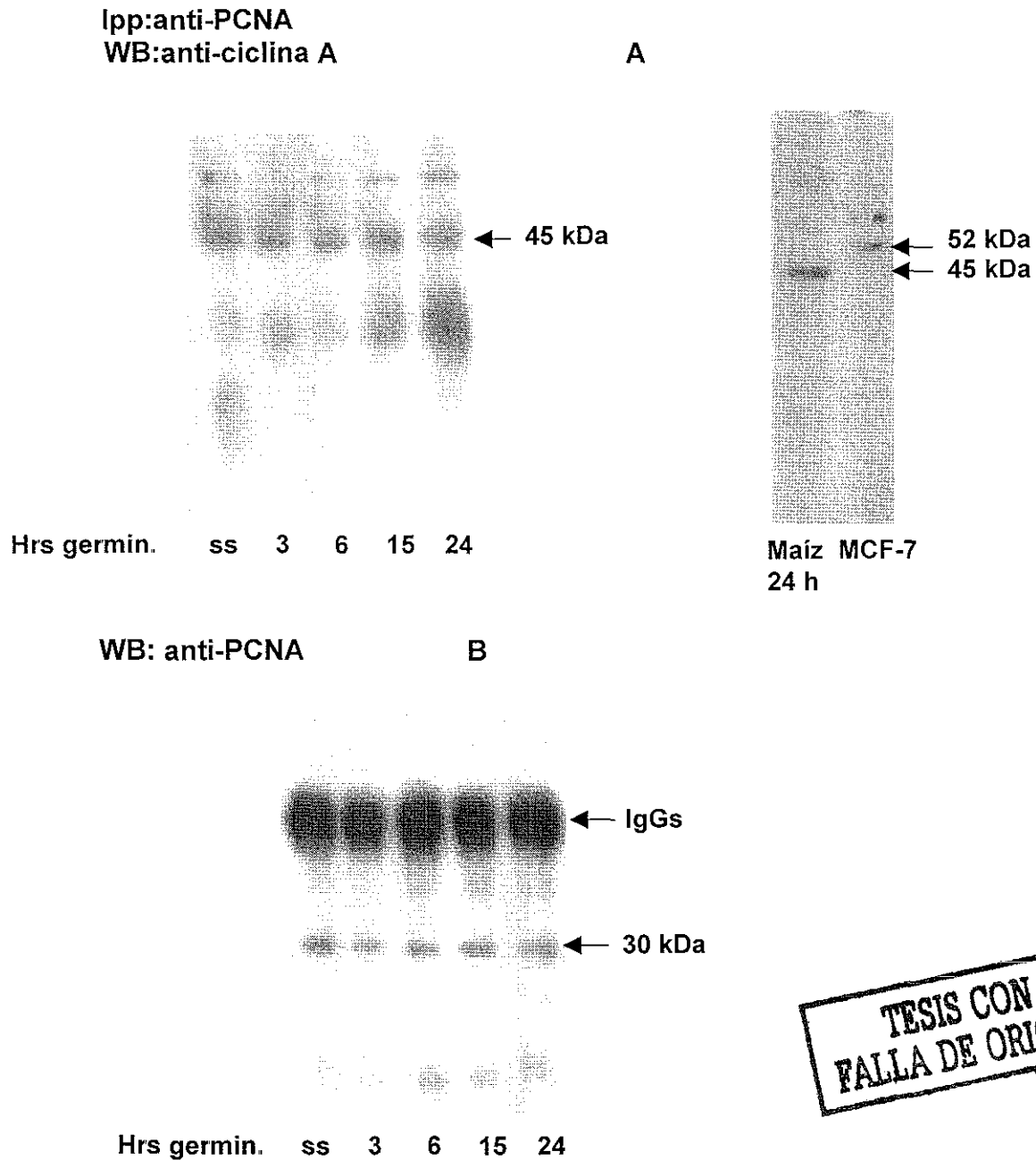
Como se mencionó en los antecedentes, los estudios en maíz habían revelado la presencia de una actividad de cinasa tipo PSTAIRE en los inmunoprecipitados de PCNA (Sánchez *et al.*, 2002). Dadas las características de esta cinasa y dado el papel que desempeña PCNA en la horquilla de replicación, se decidió emplear estos inmunoprecipitados como fuente de cinasa (Cdk) para la fosforilación de las polimerasas. Esta modificación al proyecto planteó, en primer término, el reproducir la técnica para la inmunoprecipitación e inmunodetección de PCNA.

Como se vio en la figura anterior, los inmunoprecipitados de ciclina A traían consigo una proteína reconocida por los anticuerpos contra la secuencia PSTAIRE; por ello surgió la idea de buscar a ciclina A en los inmunoprecipitados de PCNA (especialmente en los tiempos posteriores a 15 h, cuando el complejo con ciclina D ya no aparece).

En la figura 7 se muestra resultado de este experimento. En el panel A se observa el inmunoblot contra la ciclina A, de los inmunoprecipitados de PCNA de diferentes tiempos de germinación. En todos ellos se reconoce la banda de 45 kDa de la ciclina A; se presenta de manera independiente una placa en la que se muestra el inmunorreconocimiento de esta banda de 45 kDa en un extracto de maíz de 24 h de germinación y un control de extracto de células humanas (MCF-

7), en donde se puede ver la banda de 52 kDa. En la figura 7B, se presenta el "Western-blot" contra PCNA llevado a cabo sobre la misma membrana de los inmunoprecipitados, en donde se puede observar el reconocimiento de una banda de 30 kDa aproximadamente, identificada previamente como PCNA de maíz (Herrera et al., 2000). En la placa del control de células humanas, no se pudo detectar dicha proteína con el uso de los anticuerpos homólogos a la de maíz.

El resultado de este experimento es sumamente relevante, ya que demuestra la asociación de PCNA y ciclina A durante la germinación de maíz. Dado que dicha asociación está presente desde semilla seca y al menos hasta las primeras 24 h de germinación, se podría pensar que más que haber un cambio de ciclina en los complejos de PCNA, podrían estar formándose dos subpoblaciones diferentes de complejos con PCNA, lo que se discutirá mas adelante.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 7. Co-inmunoprecipitación de PCNA y ciclina A.
A: Inmunoprecipitados de PCNA de extractos de maíz de: semilla seca (ss), 3, 6, 15 y 24 h de germinación control con anticuerpos homólogos, así como un control de extracto crudo de células humanas MCF-7 (que se muestra independientemente), fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a immobilón® para la inmunodetección de ciclina A con anticuerpos heterólogos (anticuerpos en cabra). **B:** La membrana fue lavada como se especificó anteriormente y posteriormente se le practicó un segundo "Western-blot" con anticuerpos homólogos contra PCNA.

Con el conocimiento de que los inmunoprecipitados de PCNA contienen una actividad de cinasa sobre histona H1 (Sánchez *et al.*, 2002) y la evidencia de que se encuentra asociada una ciclina D (Herrera *et al.*, 2000) y/o una ciclina A, se hizo un ensayo de fosforilación *in vitro* con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, para determinar si este inmunoprecipitado podía fosforilar a la DNA polimerasa 2

Para llevar a cabo los ensayos de fosforilación y actividad de la polimerasa, se necesitaba emplear una enzima que no estuviera previamente fosforilada, por ello se decidió obtener la enzima a partir de semilla seca. Dado que a la embriogénesis sigue un periodo de desecación para dar lugar a la semilla y que esta puede permanecer almacenada por muchos meses, es sumamente improbable que las proteínas permanezcan fosforiladas durante todo el periodo hasta reiniciar su metabolismo con la llegada de la imbibición. Por otra parte, para poder montar los ensayos de fosforilación lo mas eficientemente posible, se optó por semipurificar a las polimerasas, al menos por un primer paso cromatográfico en DEAE-sefariosa. Este paso da un índice de purificación de 45 veces para la polimerasa 1 y 198 veces para la polimerasa 2 (García *et al.*, 1997).

En el ensayo de fosforilación con los inmunoprecipitados con anticuerpos anti-PCNA, se emplearon: histona H1 como control y como problema la DNA polimerasa 2. La figura 8 corresponde a la autorradiografía de este ensayo. Lo primero que puede notarse es que el patrón de fosforilación es igual en todos los carriles que contienen polimerasa 2 como sustrato, mientras que el patrón es muy

diferente al del carril que contiene histona H1, esto parece ser independiente de la presencia del inmunoprecipitado de PCNA, lo cual refleja la presencia de una o mas cinasas en la fracción de polimerasa que eluye de DEAE. Los carriles que contienen polimerasa 2 como sustrato y no así el carril que contiene histona H1 como sustrato, presentan una intensa fosforilación, particularmente destaca una banda de aproximadamente 103 kDa que correspondería a la subunidad catalítica de la DNA polimerasa (Coello et al., 1993) En el carril que tiene histona H1 como sustrato, la intensidad de fosforilación es mucho menor, esto pudo deberse a que el tiempo de exposición requerido para revelar la banda de histona H1 era mayor que el que se necesitó para revelar las de la polimerasa 2

Autorradiografía

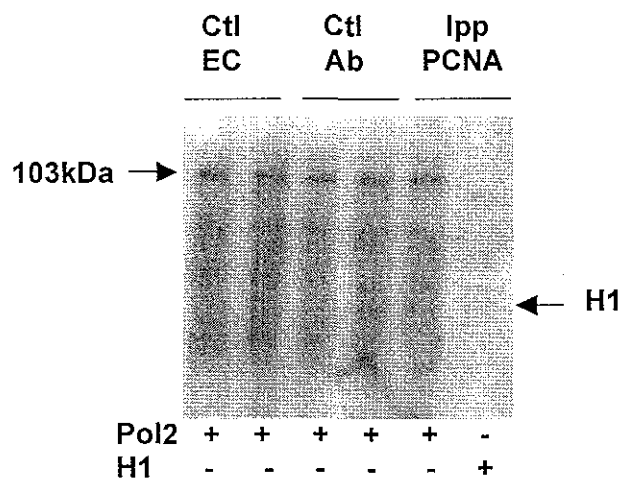


Fig. 8. Fosforilación de histona H1 y DNA polimerasa 2 por inmunoprecipitados de PCNA. Se presenta la autorradiografía de este ensayo, en donde los carriles 1-4 corresponden a controles sin fuente de cinasa externa y tienen polimerasa 2 como sustrato para el ensayo de fosforilación; los carriles 5 y 6 corresponden a inmunoprecipitados de PCNA (6 h de germinación) con polimerasa 2 e histona H1 como sustratos respectivamente. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo en buffer de cinasa a 30°C durante 30 minutos, después de lo cual las proteínas fueron desnaturizadas, separadas en SDS-PAGE y el gel secado para la autorradiografía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

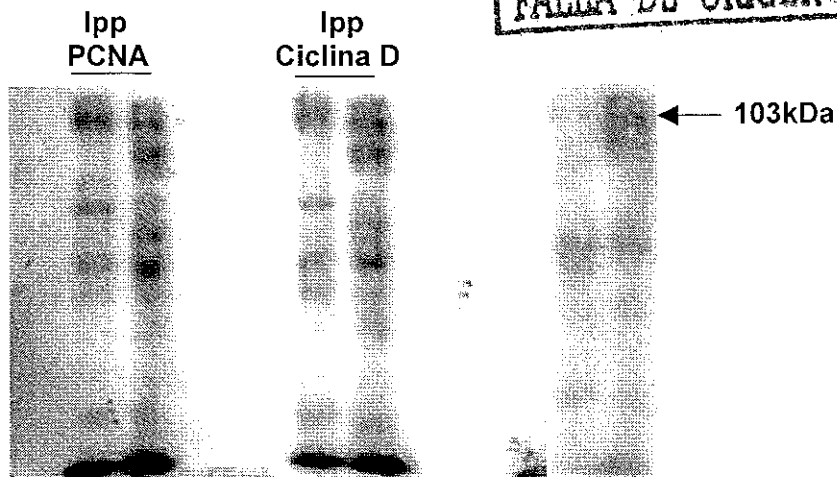
Para tratar de eliminar a esta cinasa que co-eluye en las fracciones de la DNA polimerasa 2, se procedió a hacer un segundo paso de purificación cromatográfica, esta vez a través de una resina de pseudo-afinidad como lo es la heparina-sefarosa.

Inmunoprecipitados con anti-PCNA o con anti-ciclina D, fueron enfrentados tanto con la fracción de polimerasa obtenida de la columna de DEAE, como con la fracción obtenida de la columna de heparina. El resultado de este ensayo se presenta en la figura 9A, donde se observa que hay fosforilación de diversas proteínas, tanto en los inmunoprecipitados enfrentados a fracciones de la columna de DEAE (carriles 2 y 6) como en los enfrentados a las fracciones de la columna de heparina (carriles 3 y 7), aunque el patrón de proteínas fosforiladas es diferente en ambos. Sin embargo, dicha fosforilación también se observa en los carriles donde se tienen como controles las fracciones de polimerasa 2 de DEAE y heparina, sometidas al ensayo de fosforilación sin ninguna fuente de cinasa externa (carriles 11 y 12). Debe observarse particularmente la banda de 103 kDa que, como ocurrió en el ensayo anterior, aparece fosforilada tanto si hay fuente de cinasa exógena como si solamente se encuentran las fracciones del primer (DEAE) y segundo (heparina) pasos de purificación. Esta banda es la misma que se reconoce en el panel B, después de hacer un "Western-blot" con anticuerpos homólogos contra la DNA polimerasa 2, sobre la misma membrana expuesta para autorradiografía.

Autorradiografía

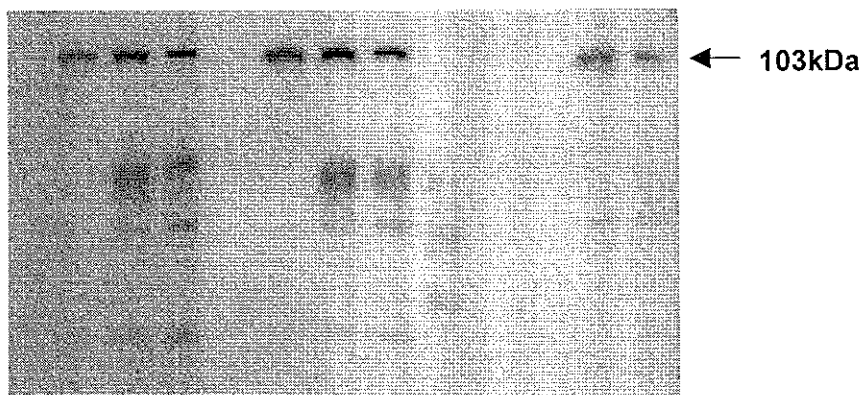
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Po12 DEAE	-	+	-	-	-	+	-	+
Po12 Hep.	-	-	+	-	-	-	+	-
EC maíz	+	-	-	-	+	-	-	-

WB: anti-pol2



Po12 DEAE	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Po12 Hep.	-	-	+	-	-	-	+	-	+
EC maíz	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Fig 9 Fosforilación de la DNA polimerasa 2 de fracciones de DEAE y de heparina por inmunoprecipitados con anti-PCNA o con anti-ciclina D **A:** Autorradiografía de la fosforilación de pol 2 eluída de uno u otro paso cromatográficos por inmunoprecipitados con anti-PCNA o con anti-ciclina D como fuente de cinasa; como control, las fracciones de DEAE y Heparina fueron ensayadas para fosforilación sin fuente de cinasa exógena. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo como se especificó en la figura anterior, después de lo cual las proteínas fueron desnaturizadas, separadas en SDS-PAGE y posteriormente transferidas a inmóvilón® para el inmunoblot, el gel fue secado para la autorradiografía. **B:** Inmunoblot contra la DNA polimerasa 2 con anticuerpos homólogos

De este ensayo se concluye que aún después de un segundo paso de purificación cromatográfica, la DNA polimerasa 2 aún co-eluye con una (o mas) cinasas de tipo desconocido. Cabe destacar que el cambio que se observa en el patrón de fosforilación de ambas fracciones podría deberse a la disgregación de los complejos proteicos en las columnas, lo cual llevaría a la exposición de diferentes sitios de fosforilación en las proteínas; o bien a la fosforilación de diferentes proteínas presentes en las fracciones, o a ambas cosas.

El hecho de que la polimerasa 2 siguiera co-eluyendo con una actividad de cinasa, llevó a pensar que tal vez existiese algún tipo de asociación entre estas proteínas y por lo tanto que la regulación de la actividad de polimerasa se diera por la cinasa asociada. Para comprobar o descartar esta hipótesis, se procedió a hacer una inmunoprecipitación de la DNA polimerasa 2 con anticuerpos homólogos tanto de la fracción eluída de la columna de DEAE como de la fracción eluída de la columna de heparina, para someterla a un ensayo de fosforilación sin fuente de cinasa exógena y comparar la actividad de cinasa en estos inmunoprecipitados, con la de sus sobrenadantes y con un ensayo a la fracción entera (sin inmunosustraer a la polimerasa).

Los resultados de este experimento, se muestran en la figura 10A. En el carril 1, que corresponde a un control de proteína A con la fracción de polimerasa 2, se puede observar una ligera fosforilación, lo cual demuestra que efectivamente hay una cinasa asociada a la fracción de polimerasa, la cual está fosforilando algunas proteínas que vienen en dicha fracción, e incluso podría estar autofosforilándose. No se observa ninguna evidencia de fosforilación en un control

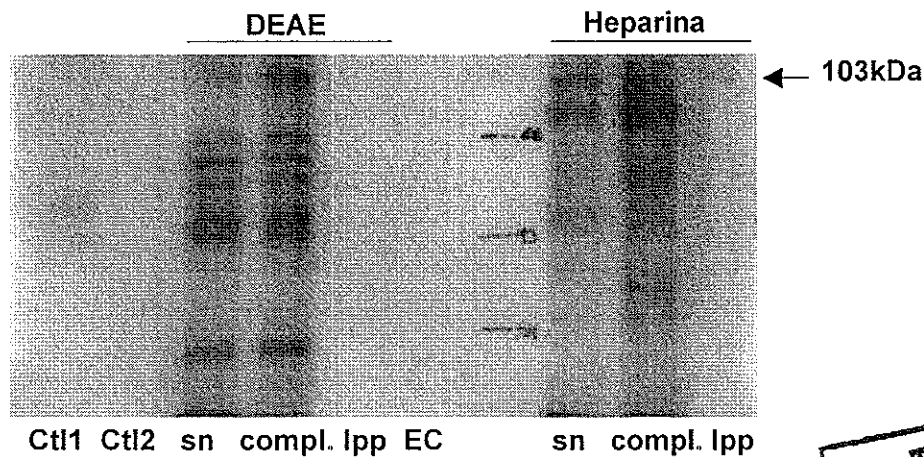
de proteína A con anticuerpo (carril 2). Sin embargo, al observar los carriles problema, se ve la banda de 103 kDa fosforilada, tanto en la fracción no inmunosustraída de la DNA polimerasa 2 de la cromatografía con DEAE (carril 4) como en el sobrenadante (carril 3), en tanto que no se observa en el inmunoprecipitado (carril 5); esto querría decir que la cinasa no co-precipita con la polimerasa 2 y probablemente por ello no se observa la fosforilación de la proteína en este tipo de ensayo. El mismo patrón de fosforilación se repite en los carriles 9, 8 y 10 respectivamente, en los que se empleó la fracción de polimerasa 2 de la cromatografía con heparina.

Para descartar que no se hubiese encontrado la banda de la DNA polimerasa 2 fosforilada porque en realidad no se hubiese inmunoprecipitado, se llevó a cabo un inmunorreconocimiento de la polimerasa 2, sobre la misma membrana que se obtuvo del ensayo. La figura 10B muestra este resultado, en donde se observa que sí hubo inmunoprecipitación de la polimerasa (carriles 5 y 10). En el carril 10 la cantidad de enzima precipitada es muy pequeña, dado que se trata de un segundo paso de purificación y parte de la proteína se perdió.

La sobreposición de la placa de inmunorreconocimiento con la autorradiografía, muestra que las bandas de alto peso molecular que se fosforilan tanto en la fracción cromatográfica con DEAE como en la fracción de la cromatografía con heparina, efectivamente corresponden en tamaño con la que se reconoce en el "Western-blot" contra la DNA polimerasa 2.

Autorradiografía

A



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

WB: ant-pol 2

B

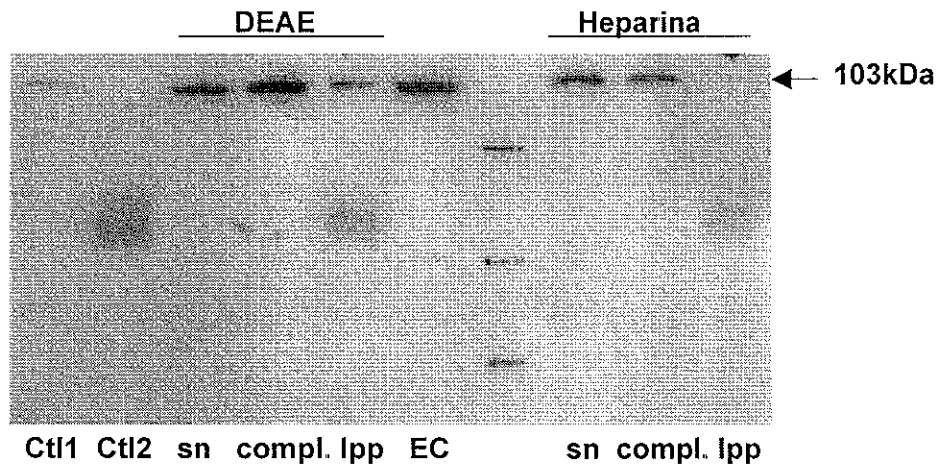


Fig. 10. Fosforilación de DNA polimerasa 2 por la cinasa que co-eluye en las fracciones de DEAE y/o Heparina **A:** Autorradiografía de los ensayos de fosforilación de fracciones de pol2 de DEAE o Heparina. Ctl1: proteína A-agarosa + fracción de pol 2 de DEAE, carril 1; Ctl2: control de proteína A-agarosa con anticuerpo contra polimerasa 2, carril 2; sn, sobrenadantes de las fracciones de DEAE o heparina, inmunosustraídas de pol2, carriles 3 y 8 respectivamente; compl., fracciones completas de DEAE o heparina (sin inmunosustracción), carriles 4 y 9; lpp, inmunoprecipitados de polimerasa 2 de DEAE o heparina, carriles 5 y 10 Carril 6, extracto crudo de maíz. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo como ya se ha especificado, después de lo cual las proteínas fueron desnaturalizadas, separadas en SDS-PAGE y posteriormente transferidas a immobilón® para la inmunodetección y el gel fue secado para la autorradiografía **B:** "Western-blot" contra la DNA polimerasa 2 con anticuerpos homólogos.

No obstante, la ausencia de fosforilación también podría deberse a que la presencia de la resina y/o de los anticuerpos, dificultara el acceso de la cinasa a los sitios de fosforilación, aunque esta explicación parece menos probable

Fosforilación y actividad de DNA polimerasa

Puesto que uno de los objetivos planteados para este trabajo es el de determinar si los cambios en el estado de fosforilación provocan cambios en la actividad de las DNA polimerasas, además de los ensayos ya descritos para determinar si la cinasa que co-eluye con la DNA polimerasa 2 podía fosforilarla, se hizo un ensayo para determinar si de alguna manera la fosforilación por la cinasa acompañante podía alterar su actividad. Para probar esto, se llevó a cabo un ensayo de actividad de polimerasa previa incubación en amortiguador para cinasa, en presencia de concentraciones variables de ATP. Las fracciones con actividad de polimerasa eluidas de DEAE o heparina fueron sometidas a un período de incubación de 30 min a 37°C, en ausencia o presencia de las siguientes concentraciones de ATP: 12.5, 25 y 37.5 μM , antes de determinar la actividad de polimerasa. En la tabla 1 se observan los datos promedio de 2 ensayos de actividad de la DNA polimerasa 2 reportados en cuentas por minuto (cpm), con la desviación estándar asociada a ellos. En ninguna de las 3 concentraciones de ATP probadas, se observa una diferencia significativa en el número de cpms, ni para la fracción eluída de DEAE ni para la eluída de heparina.

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en las cuentas por minuto obtenidas, lo cual apoya que la o las cinasas que coeluyen con

la polimerasa 2 en ambos pasos cromatogáficos, no influyen en la actividad de esta enzima.

Tabla 1

Actividad de pol 2 eluída en fracciones de DEAE o Heparina, previo ensayo de fosforilación *in vitro* con la cinasa que co-eluye en estas fracciones en presencia de diferentes concentraciones de ATP

Fracción	ATP (μM)	cpm \pm DE
DEAE	---	6653 \pm 233
	12.5	7370 \pm 35
	25	8268 \pm 1549
	37.5	7374 \pm 1284
Heparina	---	7891 \pm 545
	12.5	8433 \pm 1829
	25	8183 \pm 132
	37.5	7669 \pm 512

Para conocer si aún así la DNA polimerasa había sido fosforilada en estos ensayos, con los sobrenadantes resultantes, se intentó ver posibles cambios en el corrimiento electroforético de la proteína, debido al estado de fosforilación de la DNA polimerasa 2.

Las fracciones eluídas de DEAE y heparina fueron sometidas a una electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida al 10%, con un tiempo

de corrida largo; el gel fue transferido a una membrana de Inmobilon y sobre ésta se llevó a cabo el inmunoblot en condiciones astringentes.

En la figura 11 se observa este resultado; los carriles 1 y 2, corresponden a la polimerasa 2 en ausencia de ATP; carriles 3 y 4 a polimerasa 2 en presencia de ATP 25 μ M. Los carriles 5 y 6 muestran extractos crudos de maíz de 15 y 6 h de germinación para ver si la diferencia en los tiempos de germinación revelaban alguna diferencia en el estado de fosforilación de la polimerasa.

Como puede verse, no hay ningún cambio aparente en el corrimiento de la subunidad de 103 kDa, reconocida como la subunidad catalítica de la DNA polimerasa 2 de maíz; el aparente corrimiento mayor de las bandas de extractos de 15 y 6 h de germinación (carriles 5 y 6), se debe a que la cantidad de proteína cargada al gel fue mucho mayor que en los otros casos y eso provoca que en el revelado la banda se vea más abajo; de haber algún corrimiento diferencial debería verse en la proteína presente en estos dos tiempos.

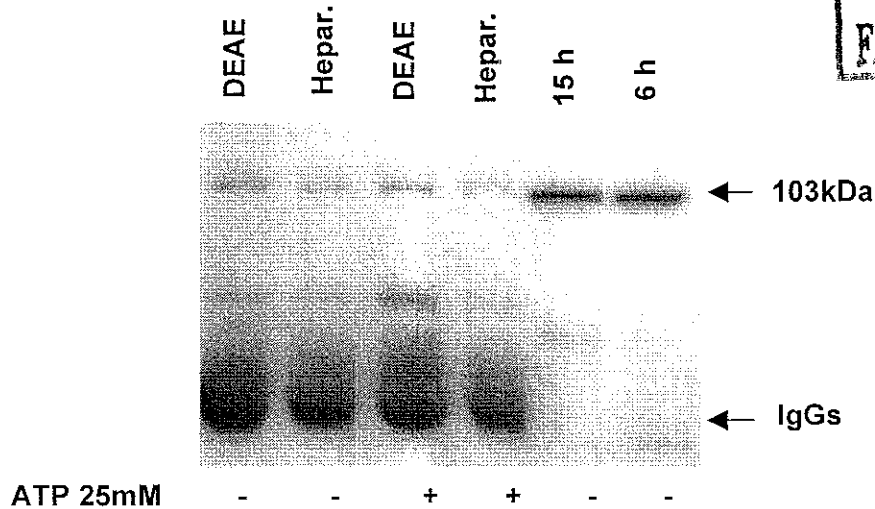


Fig. 11. Cambios en el corrimiento electroforético de la DNA polimerasa 2 debidos a fosforilación. Los extractos empleados para determinar el efecto de variar la concentración de ATP, fueron sometidos a un SDS-PAGE en un gel al 10% corrido durante 6 h. Carriles 1 y 2 corresponden a la polimerasa de DEAE y heparina respectivamente en ausencia de ATP; carriles 3 y 4 corresponden a las mismas fracciones en presencia de 25 μ M ATP; carriles 5 y 6, extractos crudos de 15 y 6 h de germinación control. Las proteínas desnaturalizadas fueron resueltas en SDS-PAGE y transferidas para su inmunodetección con anticuerpos homólogos contra la pol 2.

Hasta este momento se había estado trabajando bajo la premisa de que la DNA polimerasa 2 obtenida de semilla seca y semipurificada se encuentra en un estado desfosforilado; sin embargo, a partir de los experimentos mostrados, aún no puede descartarse que la enzima pudiera venir previamente fosforilada. Intentando descartar esta posibilidad, se llevaron a cabo ensayos de desfosforilación con fosfatasa alcalina. Para probar el tiempo de incubación al cual se tendría que someter el extracto proteico en presencia de la fosfatasa, se hicieron cinéticas con p-nitrofenil-fosfato que demostraron que un tiempo de incubación de 10 min sería suficiente. Los ensayos se llevaron a cabo con una

fosfatasa alcalina acoplada a sefarosa, la cual se elimina por centrifugación y posterior separación del sobrenadante

La actividad enzimática después de incubar por 10 y 30 min en presencia de fosfatasa alcalina (este exceso en el tiempo de incubación, tuvo como finalidad verificar que la actividad no variara), se muestran en la tabla 2, donde se presentan los datos del promedio y la desviación estándar

Se compararon mediante "pruebas t", los dos diferentes tiempos de incubación de las dos fracciones en ausencia y presencia de fosfatasa. Los resultados obtenidos con un 95% de confianza demuestran que no hay diferencias significativas en la actividad de polimerasa en ninguna de las dos fracciones, ni en presencia ni en ausencia de la fosfatasa.

Con esto se tiene una evidencia experimental de que la DNA polimerasa de semilla seca no viene fosforilada, o al menos no en un estado en el que su actividad se vea influida.

Tabla 2

Actividad de pol 2 eluída en fracciones de DEAE o Heparina, previo ensayo de desfosforilación con fosfatasa alcalina.

Fracción	tiempo incubación (minutos)	cpm sin fosfatasa ± DE	cpm con fosfatasa ± DE
DEAE	10	15,310 ± 3689	15,997 ± 932
	30	11,847 ± 1372	13,645 ± 705
Heparina	10	12,429 ± 3674	12,477 ± 4965
	30	16,137 ± 3320	16,732 ± 2128

Fosforilación por inmunoprecipitados de PCNA y actividad de DNA polimerasa

Hasta este momento no se había demostrado o descartado que la cinasa que inmunoprecipita con PCNA tuviera efecto alguno sobre la actividad de las DNA polimerasas. Para llevar a cabo los ensayos de fosforilación *in vitro* que darían la evidencia de si la cinasa en estos inmunoprecipitados de PCNA fosforila a las DNA polimerasas 1 y 2 y provoca alteración en su actividad, se obtuvieron nuevos extractos proteicos de tiempos diferentes de la germinación (3, 7 y 13 horas de germinación control o bien, estimulada por BA). Se consideraron estos tiempos para tener un rango que abarcara desde antes del comienzo de la fase S (0-11 h) hasta entrada esta fase (12-15 h). Se consideran también tiempos en los cuales la fase S ya se inició, dado el efecto de las citocininas (4-8 h).

Previamente se comprobó que PCNA efectivamente estaba bajando a una cinasa activa y esto se comprobó empleando histona H1 como sustrato de fosforilación; el resultado se muestra en la figura 12, donde se observa una banda que corresponde a histona H1 fuertemente marcada, después de ser sometida a un ensayo de cinasa con un inmunoprecipitado de PCNA obtenido a partir de un extracto de 6 h de germinación, cabe mencionar que la exposición de esta placa fue mucho mayor que en experimentos anteriores (Fig.8) cuando se intento ver la fosforilación de histona H1.

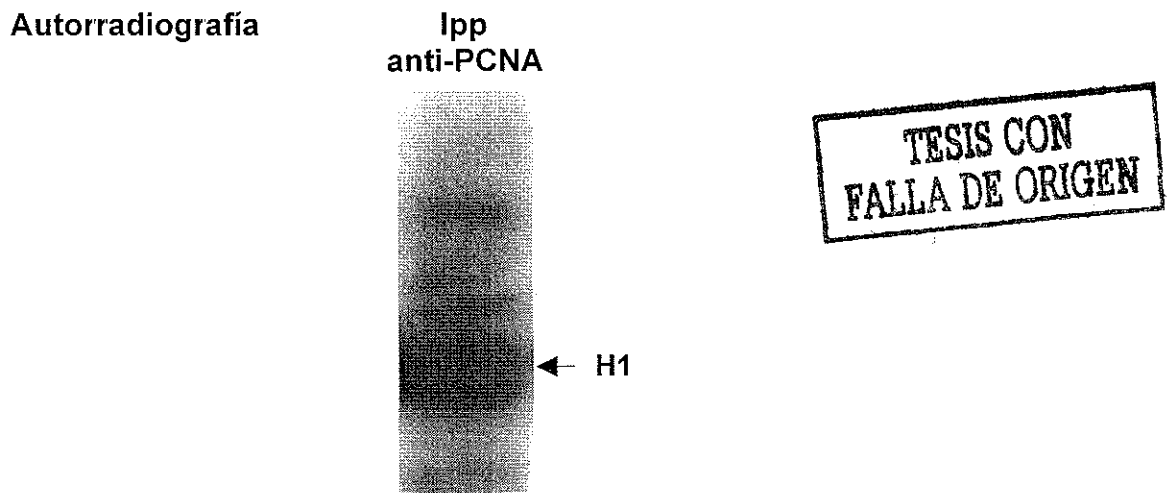


Fig. 12 Actividad de cinasa H1 de los inmunoprecipitados con anti-PCNA sobre histona. Inmunoprecipitado de extractos proteicos de 6 h de germinación, enfrentado a histona H1 en buffer de cinasa durante 30 min a 30°C. La muestra fue separada en SDS-PAGE y transferida a Immobilon® para la autorradiografía.

Una vez teniendo la seguridad de que el inmunoprecipitado con anti-PCNA baja una cinasa activa, se hicieron determinaciones de actividad de las dos DNA polimerasas replicativas (semipurificadas solamente a través de DEAE para la

polimerasa 1 y hasta el segundo paso, a través de heparina, para la polimerasa 2) después de enfrentarlas a la fuente de cinasa (complejos de anti-PCNA) por un periodo de 30 min a 37°C (condiciones que se habían estado empleando en los ensayos anteriores).

Los resultados del promedio de dos experimentos individuales y la desviación estándar de los datos se presentan en la tabla 3. Los controles y problemas que se consideraron para este experimento fueron: *Actividad base*, que es la actividad de las enzimas después de ser diluidas con amortiguador Tris-HCl pH 7.4 tantas veces como se diluyen los problemas; *Control resina-anticuerpo*, que es el ensayo de fosforilación llevado a cabo sobre la resina con el anticuerpo unido sin extracto de maíz, por lo tanto sin inmunoprecipitado, para ver si hay algún efecto del anticuerpo en la actividad; *Control resina-extracto crudo*, es el ensayo de fosforilación sobre la proteína A-agarosa sin anticuerpo enfrentada a extracto crudo de maíz, para ver posible efecto de uniones inespecíficas; *Inmunoprecipitado con anti-PCNA sin ATP* en el medio, para la comparación directa entre la enzima sin fosforilar y la fosforilada en presencia de todo lo demás presente en el medio de reacción; *Inmunoprecipitado de PCNA en presencia de ATP*, para determinar el posible efecto de la fosforilación por la cinasa tipo Cdk presente en este complejo.

Tabla 3

Actividad de polimerasas 1 (eluída de DEAE) y 2 (eluída de Heparina), previo ensayo de fosforilación *in vitro* con inmunoprecipitados con anti-PCNA

	cpm DNA pol 1 \pm DE	cpm DNA pol 2 \pm DE
Actividad base	1004 \pm 58	1599 \pm 230
<i>Control resina + anticuerpo</i>	876 \pm 71	1510 \pm 175
<i>Control resina + extracto crudo</i>	1054 \pm 274	2165 \pm 322
<i>Inmunoprecipitado de PCNA (sin ATP en el medio)</i>	1075 \pm 149	1634 \pm 340
<i>Inmunoprecipitado de PCNA (con ATP en el medio)</i>	926 \pm 28	1484 \pm 264

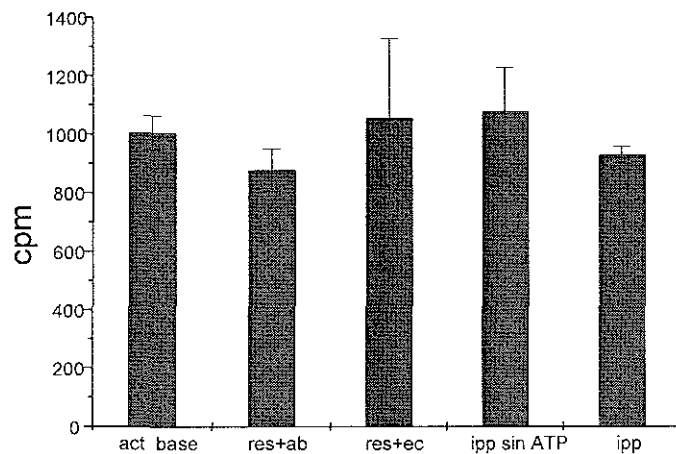
Los datos de cpms de los diferentes tratamientos para la polimerasa 1 y para la polimerasa 2 fueron sometidos a un análisis de varianza, donde los datos de la polimerasa 1 no se ajustaron a una distribución normal y fueron analizados por una prueba de Kruskal-Wallis, que indicó que las diferencias entre los datos no fueron significativas. Para la polimerasa 2, la distribución si resultó normal y el análisis de varianza indicó que el dato promedio del *Control resina-extracto crudo* era diferente del *Control resina-anticuerpo* y del *Inmunoprecipitado de PCNA en presencia de ATP*. Dado que es el dato del control de resina + extracto crudo el que presenta el incremento y se trata de un control negativo, sólo puede argumentarse que no se encontró el efecto esperado de la fosforilación por los

inmunoprecipitados anti-PCNA, sobre la actividad de las DNA polimerasas y que el incremento en la actividad de estas enzimas, que se había visto previamente (Gómez-Roig, 1998), no se debe de manera directa a la fosforilación de las enzimas replicativas.

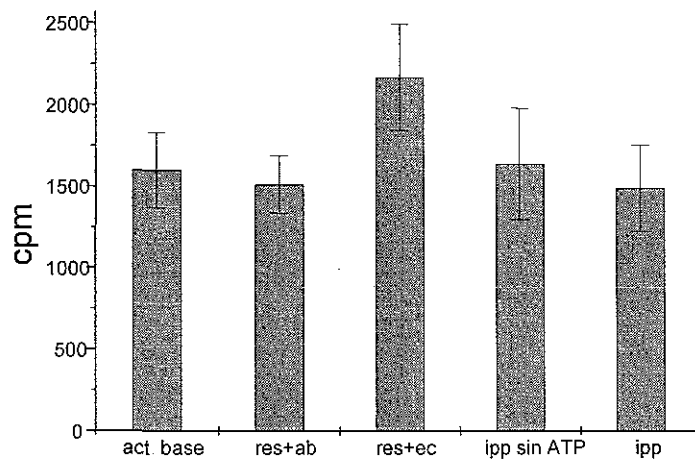
En la figura 13, se presentan esquematizados los datos de actividad (en cpms) de las polimerasas 1 y 2 que se presentaron en la tabla 3 para poder visualizarlos mejor.

Al analizar estos datos se puede concluir que la fosforilación de las DNA polimerasas por la cinasa que baja con PCNA, no afecta directamente su actividad; de las posibilidades que esto conlleva se hablará en la discusión.

Actividad de DNA polimerasa 1



Actividad de DNA polimerasa 2



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 13. Actividad de las DNA polimerasas 1 y 2 después de ser sometidas a ensayo de fosforilación *in vitro*. Los diferentes controles y problemas fueron sometidos a ensayo de fosforilación en amortiguador de cinasa, durante 30 min a 30°C. Inmediatamente después se realizó un ensayo a cada una de las fracciones para determinar la actividad de las enzimas, empleando DNA activado como molde en una mezcla de reacción para actividad de polimerasa; el ensayo se llevó a cabo a 37°C, durante 30 min. EL DNA con la marca radiactiva incorporada fue precipitado con TCA 10%, recuperado por filtración y las cpm se determinaron en un contador de centelleo.

Con el fin de determinar si a pesar de todo, la DNA polimerasa 2 era sustrato de fosforilación por la cinasa que se asocia a PCNA, el siguiente paso consistió en enfrentar la DNA polimerasa 2 eluída de la columna de heparina, con los inmunoprecipitados de PCNA obtenidos a partir de extractos de diferentes horas de germinación control y estimulada por BA en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$, con la finalidad de ver si se observaba alguna diferencia en el grado de fosforilación debido al tiempo y la condición bajo la que se estaba obteniendo la cinasa

Debe recordarse que se estaba trabajando con la DNA polimerasa obtenida a partir de ejes embrionarios de semilla seca y que cualquier variación en el estado de fosforilación de esta enzima, estaría directamente relacionada con la influencia del tiempo de germinación o bien de la adición de citocininas, sobre las semillas a partir de las cuales se prepararon los extractos proteicos de donde se obtuvieron los inmunoprecipitados de PCNA, y por lo tanto la cinasa que viene asociada con esta proteína

En el panel A de la figura 14 se puede observar la autorradiografía de este experimento, en donde los carriles 1-3, corresponden a germinación control y los carriles 4-6 a germinación con BA. En esta placa se observan muchas bandas de proteínas fosforiladas; sin embargo, nos concentramos en la banda de 103 kDa que corresponde a la identificada como la subunidad catalítica de la DNA polimerasa 2. Un primer análisis cualitativo demuestra que en el carril de 3 h de germinación control (carril 1), dicha banda presenta mucho menor intensidad de marca radiactiva, comparando la misma banda en 3 h de germinación con BA

(carril 4). En los carriles de 7 y 13 h de germinación control (2 y 3) se ve el incremento en la cantidad de marca incorporada, mientras que en los mismos tiempos en presencia de BA (5 y 6), la intensidad de la marca disminuye.

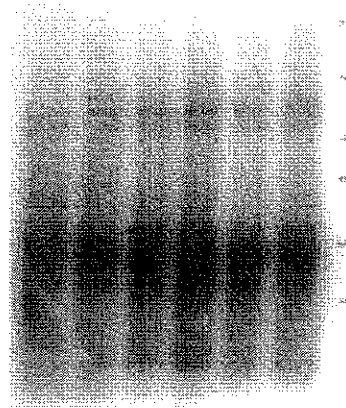
Los cambios que se observan entre los tiempos de germinación control y estimulados, concuerdan con el patrón de comportamiento previamente reportado por Baiza *et al.* (1989) y Reyes-Jiménez *et al.* (1991), en donde la incubación de los ejes embrionarios en presencia de la citocinina, estimula la germinación y adelanta los tiempos del ciclo celular y por lo tanto del comienzo de la fase S, lo cual definitivamente está indicando que la fosforilación de la DNA polimerasa 2 por la cinasa que baja con PCNA, a pesar de no ejercer un cambio en su actividad, si podría estar promoviendo algún cambio de otro tipo.

El panel B de la figura muestra el "Western-blot" de este ensayo, donde se reconoce una banda de 103 kDa, que coincide con la que se fosforila en el panel A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Autorradiografía

A

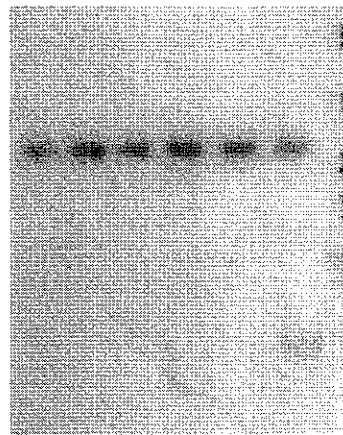


← 103 kDa

Hrs germ.	3	7	13	3	7	13
BA	-	-	-	+	+	+

WB: anti-pol 2

B



← 103 kDa

Hrs germ.	3	7	13	3	7	13
BA	-	-	-	+	+	+

Fig.14. Actividad de cinasa de los inmunoprecipitados de PCNA sobre la DNA polimerasa 2 **A:** Autorradiografía donde la DNA polimerasa 2 de heparina fue enfrentada en ensayos de fosforilación con los inmunoprecipitados de PCNA de 3, 7 y 13 horas de germinación control, carriles 1, 2 y 3; así como con los inmunoprecipitados de 3, 7 y 13 horas de germinación en presencia de BA, carriles 4, 5 y 6. El ensayo se llevó a cabo durante 30 minutos a 30°C. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y transferidas a inmobilón® para la autorradiografía **B:** Inmunoblot contra la DNA polimerasa 2 con anticuerpos homólogos

Con el fin de corroborar dichas observaciones de manera cuantitativa, se hizo un análisis densitométrico de la banda de 103 kDa tanto en la autorradiografía como en el "Western-blot" para poder normalizar los datos de cantidad de marca incorporada, relacionando los datos de intensidad de fosforilación de los diferentes tiempos y condiciones de incubación, con la cantidad de proteína revelada por el inmunorreconocimiento.

En la figura 15 se muestran los valores obtenidos de la normalización, considerando el dato de densidad óptica mas bajo, 7 horas de germinación en presencia de BA, como el 100%. En esta figura se puede ver más claramente la diferencia entre los diferentes tiempos y condiciones de incubación. Para los tiempos control, se ve un aumento gradual del estado de fosforilación de la polimerasa 2, que coincidiría con el hecho de que las células van progresando de G1 hasta entrar a la fase S. En cambio para los tiempos en presencia de benciladenina, se observa un estado inicial de fosforilación mayor que en el control y la intensidad de esta fosforilación cae bruscamente para las 7 h y posteriormente vuelve a incrementarse. Este comportamiento también es consistente con los reportes anteriores, ya que al adelantarse la fase S, se está adelantando la fosforilación de la polimerasa. La caída podría estar coincidiendo con la salida de la fase S y posiblemente el nuevo incremento esté reflejando la entrada de un nuevo grupo de células a fase S.

FOSFORILACIÓN DE POL 2 CON
IPPS DE PCNA

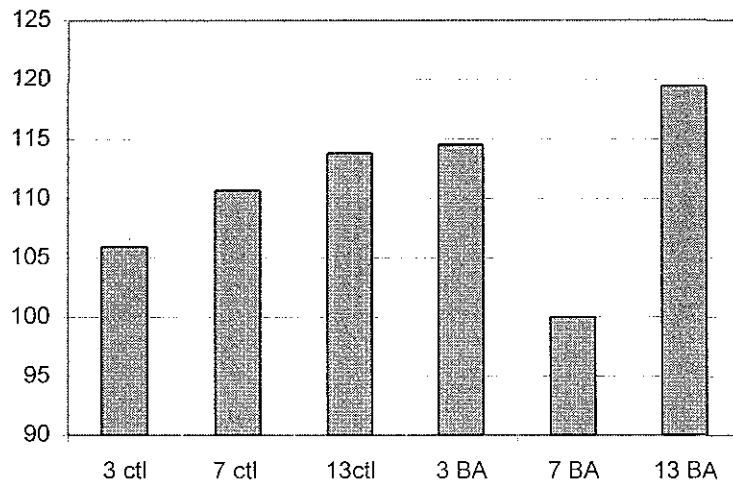


Fig. 15. Análisis densitométrico de la banda de 103 kDa en los diferentes tiempos y condiciones de incubación de la figura 14. La autorradiografía del experimento anterior, fue analizada en el Phosphorimager (Bio-Rad) para obtener los datos de densidad óptica Control (ctl) o tratamiento con benciladenina (BA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El presente proyecto tenía como finalidad tratar de enlazar dos fenómenos que se habían visto durante la germinación de ejes embrionarios de maíz: 1) la modificación del estado de fosforilación de la DNA polimerasa tipo α de manera cíclica y 2) que en presencia de citocininas (BA), el metabolismo del DNA se incrementara probablemente debido al incremento en la actividad de las DNA polimerasas.

Durante la primera fase de este proyecto se intentó encontrar complejos de ciclina A que tuvieran una actividad asociada de cinasa. Se usaron dos diferentes anticuerpos heterólogos, uno de ellos dirigido contra las ciclinas tipo A de humano, A1 y A2; el otro dirigido contra el carboxilo terminal de la ciclina A de ratón, el cual cruza solamente con la ciclina A2 de humano. En ambos casos se tuvo el reconocimiento de una proteína de 45 kDa en semillas de maíz germinadas por diferentes periodos. Este tamaño molecular difiere solo ligeramente del reportado para cualquiera de las dos ciclinas de maíz que pertenecen al grupo Cyc A1 y cuyo tamaño es cercano a los 50 kDa. El anticuerpo dirigido contra la proteína de humano fue capaz de inmunoprecipitar una proteína de 45 kDa. Sin embargo, a pesar de que en estos inmunoprecipitados también se detectaron las dos bandas de Cdk-A características, de 32 y 36 kDa que se habían encontrado previamente en extractos de maíz (Sánchez et al., 2002), no se pudo encontrar una actividad de cinasa.

El cambio de estrategia seguido en este proyecto para lograr cumplir los objetivos planteados, dirigió la investigación hacia el uso de inmunoprecipitados de la proteína PCNA. Estos inmunoprecipitados se obtuvieron a partir del uso de anticuerpos homólogos. En la literatura existe ya información acerca de la formación de complejos entre PCNA y complejos ciclina/Cdk en metazoarios (Xiong et al., 1992; Prosperi et al., 1994; Koundrioukoff et al., 2000), por lo cual no sería extraño que esto también se estuviera presentando en sistemas vegetales. En maíz en particular, nuestro grupo ya había reportado la asociación de PCNA y una ciclina D putativa (Herrera et al., 2000) por ensayos de co-inmunoprecipitación. En estos mismos inmunoprecipitados de PCNA se reportó, además de la ciclina D, la presencia una cinasa tipo PSTAIRE (Sánchez et al., 2002)

Puesto que este complejo está formado enteramente por proteínas de maíz y dado que su actividad se da durante las primeras horas de la germinación, se pensó que sería una opción muy adecuada para intentar seguir la fosforilación de las DNA polimerasas por cinasas de ciclo celular y evaluar el efecto sobre su actividad.

Los datos presentados mostraron que, al menos, la DNA polimerasa 2 es efectivamente fosforilada por una cinasa presente en estos inmunoprecipitados, encontrándose una proteína de aproximadamente 103 kDa identificada como la subunidad catalítica de la DNA polimerasa 2. En sistemas animales se ha postulado como modelo que la DNA polimerasa α debe estar en un estado

desfosforilado para que pueda establecerse el complejo pre-replicative y posteriormente, cuando la actividad de Cdks de fase S se incrementa, la enzima se fosforila y puede actuar en el encendido de los orígenes de replicación (Foiani et al., 1997).

Incidentalmente se encontró que la DNA polimerasa 2 obtenida a partir de ejes embrionarios de semilla seca y semipurificada a través de dos columnas cromatográficas, eluía con una actividad de cinasa; sin embargo, aparentemente no existe una asociación física entre estas proteínas. Esta cinasa es capaz de fosforilar a la polimerasa 2; no obstante, al llevar a cabo ensayos de actividad de la polimerasa en las fracciones del segundo paso cromatográfico, esta modificación no demostró tener repercusión en la actividad catalítica de la enzima.

A pesar de la presencia de la cinasa en las fracciones de la polimerasa 2, lo que dificultaba la apreciación de la fosforilación por los inmunoprecipitados de PCNA, en este trabajo se demostró que la subunidad catalítica de la polimerasa 2 es fosforilada por inmunoprecipitados obtenidos a partir de extractos proteicos de diferentes horas de germinación, ya que el patrón que se observó cambia en los diferentes tiempos probados. Dado que la actividad de cinasa de los complejos de PCNA descritos anteriormente (Sánchez et al., 2002) se presenta solamente durante las primeras 6 h de la germinación, el hecho de haber encontrado fosforilación a las 13 h, nos llevó a pensar que tal vez existan diferentes subpoblaciones de complejos PCNA/cinasa que pudieran estar actuando en diferentes tiempos de la germinación.

Se obtuvo evidencia, por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación, de que la ciclina A se asocia a PCNA de manera constante a lo largo de la germinación. Dado que se tenían datos previos de que la ciclina D se asocia a PCNA en forma dependiente del ciclo celular durante la germinación (Herrera et al , 2000), se reafirma la suposición de que puedan haber dos diferentes subpoblaciones de PCNA en las que aparece asociación a ciclinas. En una de estas subpoblaciones, PCNA forma complejos con ciclina D y Cdk-A, que podrían estar participando en la fase G1 del ciclo celular en maíz, mientras que en la segunda subpoblación PCNA estaría formando complejos con ciclina A y Cdk-A, que podrían participar en la transición a la fase S e incluso en etapas posteriores. Esto estaría apoyado por los datos que demuestran la co-localización de la ciclina A y de PCNA en focos de replicación en células de mamífero (Sobczak et al , 1993). De estas dos posibles subpoblaciones de PCNA, la de ciclina D, la de ciclina A o bien ambas, podrían ser quienes estuvieran implicadas en la fosforilación de las DNA polimerasas. Existe evidencia de que PCNA podría funcionar como conector o adaptador de las Cdk's a sustratos que participan en la horquilla de replicación; por ejemplo, se demostró que un complejo de PCNA-Cdk2/ciclina A en células de mamífero, fosforila la región de unión a PCNA de la subunidad grande de RFC y también a la DNA ligasa I (Koundrioukoff et al , 2000).

La exposición de las enzimas replicativas a la fosforilación por los inmunoprecipitados de PCNA, no causó modificación en cuanto a su actividad comparada con las enzimas no fosforiladas, la única diferencia que se presentó fue en un control negativo, por lo que sólo puede decirse que la modificación por

fosforilación no es responsable directa del cambio en la actividad de las enzimas replicativas. Sin embargo, sí se encontró que la presencia de benciladenina (BA) modifica el patrón de fosforilación (al menos de la polimerasa 2, que es la que podía rastrearse por inmunorreconocimiento), adelantando el periodo en el que se observa la mayor incorporación de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Esto concordaría con el adelanto en los tiempos del ciclo celular que provoca la BA y por lo tanto le estaría dando un papel relevante a la fosforilación de esta enzima replicativa. Aunque dicha modificación no esté directamente involucrada en la alteración de la actividad de la enzima, debe estar regulando de alguna manera el proceso de entrada a la fase S del ciclo celular. Cabe destacar que todos los ensayos que se han reportado acerca del efecto de la fosforilación por complejos ciclina A/cdk2 o ciclina E/cdk2, se han desarrollado en sistemas de replicación virales, probando las consecuencias de la modificación a nivel de iniciación de la replicación; por lo tanto, con los ensayos utilizados en este trabajo, no se podía determinar si el efecto es efectivamente a ese nivel o no.

En mamíferos la DNA polimerasa α puede ser modificada por complejos ciclina E/cdk2 o ciclina A/cdk2; el complejo ciclina E/cdk2 (que temporalmente actúa antes que el complejo de ciclina A) se asocia con una forma hipofosforilada de la polimerasa α y con la fosfatasa PP2A y mediante fosforilación estimula la iniciación de la replicación; esta forma hipofosforilada de la polimerasa colocaliza con MCM2, una proteína marcadora de orígenes en núcleos en fase pre-S, precediendo a la incorporación de BrdU (Dehede, 2001). Por otra parte, el

complejo de ciclina A/cdk2, presente en S y G2 (Voitenleitner et al., 1999), se asocia con una forma fosforilada de la polimerasa α e inhibe su habilidad de iniciar la replicación; esta forma fosforilada de la polimerasa α colocaliza con los focos de replicación, pero no con MCM2 (que se libera una vez encendidos los orígenes). Al parecer, la DNA polimerasa de células mitóticas tiene una menor afinidad por el DNA de cadena sencilla (Dehede, 2001)

Las plantas son organismos que difieren de los metazoarios en cuanto a mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales y en cuanto a los continuos procesos morfogénéticos que sufren. A pesar de ello y aunque el panorama acerca del control de la división celular aun no es claro, si se tiene esbozado un mecanismo que es muy conservado en relación al de mamíferos. Esto lleva a pensar que probablemente los mecanismos de regulación por complejos ciclina/Cdks que intervienen en la entrada a la fase S y la fosforilación de sustratos que participan en las horquillas de replicación, como es el caso de la DNA polimerasa α , funcionen también en plantas. De esta manera, es posible que en el sistema de maíz pase algo similar a lo que ocurre en mamíferos; es decir, que la fosforilación de la DNA polimerasa 2 estuviera afectando su capacidad de unirse al DNA y a las proteínas que conforman los complejos pre-replicativos para evitar el re-encendido de los orígenes de replicación, más que estar modificando la capacidad catalítica de la enzima.

El cambio en la actividad de las dos DNA polimerasas replicativas que se había encontrado previamente al incubar los ejes embrionarios en presencia de

citocininas, podría estar relacionado con algún otro tipo de modificación sobre estas enzimas, o bien con la fosforilación de otras proteínas del replisoma que contribuyeran a facilitar la unión de la polimerasa α -primasa al molde de DNA, como podría ser RPA, lo que favorecería el cebado de la cadena continua y de los fragmentos de Okazaki, e incluso el incremento en la procesividad de la polimerasa tipo δ .

Por lo pronto, en maíz se ha encontrado que la DNA polimerasa 2 (tipo α), se fosforila de manera dependiente del ciclo celular al enfrentarla en ensayos *in vitro* con complejos proteicos de maíz que poseen una actividad de cinasa tipo Cdk-PSTAIRE, que correspondería a la Cdk-A reportada en varios tipos de plantas, cuya actividad se da tanto en G1/S como en G2/M (Herrera et al., 1999; Sánchez et al., 2002). Este patrón de fosforilación se modifica cuando la fuente de cinasa es obtenida a partir de semillas incubadas con BA, lo que refuerza el hecho de que cinasas de ciclo celular están afectando de alguna manera a las enzimas replicativas para que la fase S pueda llevarse a cabo eficientemente

CONCLUSIONES

❖ Se pudo reconocer una proteína de 45 kDa como putativa ciclina A en maíz, mediante el uso de anticuerpos heterólogos contra la ciclina A de humano o bien de ratón

❖ Los anticuerpos contra la ciclina A de humano son capaces de inmunoprecipitar a la proteína de 45 kDa; al parecer también co-inmunoprecipita una proteína tipo Cdk-A.

❖ Inmunoprecipitados de PCNA, co-inmunoprecipitan a la putativa ciclina A de 45 kDa en diferentes tiempos de la germinación.

❖ La cinasa que co-eluye con la DNA polimerasa 2, es capaz de fosforilarla, sin que esto afecte la actividad de polimerasa.

❖ Los inmunoprecipitados de PCNA de diferentes tiempos de la germinación, contienen una actividad de cinasa tipo Cdk-A, que es capaz de fosforilar a la DNA polimerasa 2 de semilla seca de maíz. De hecho se muestra un cambio cuantitativo y cualitativo en los patrones de fosforilación a los diferentes tiempos de germinación.

❖ La actividad de cinasa en los inmunoprecipitados de PCNA obtenidos a partir de semillas embebidas por 3 h en presencia de benciladenina, fosforila a la DNA polimerasa 2 proveniente de semilla seca de maíz con mucho mayor intensidad, comparada con la actividad proveniente de inmunoprecipitados de semillas control germinadas por 3 h, lo que refleja un adelanto en el periodo de fosforilación de esta enzima

❖ La fosforilación de las DNA polimerasas replicativas de maíz observada bajo la condición experimental probada, no parece afectar directamente su actividad.

REFERENCIAS

- ◆ Ach R., Durfee T., Miller A., Taranito P., Hanley-Bowdoin L., Zambryski P. y Grissem W. (1997) RRB1 and RRB2 encode retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell Biol.*, 17:5077-5086
- ◆ Baíza A., Vázquez-Ramos J. y Sánchez de Jiménez E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.*, 135: 426-421
- ◆ Bambara R., Murante R. y Henriksen L. (1997) Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *J. Biol. Chem.*, 272:4647-4650
- ◆ Bewley J. y Black M. (1994) *Seeds Physiology of Development and Germination*, caps. 1-4, 2° ed., Plenum Press N.Y.
- ◆ Brill S. y Stillman B. (1998) Identification and characterization of four single stranded-DNA domain of replication protein A. *Mol. Cell. Biol.*, 18:7225-7234
- ◆ Brush G., Anderson C. y Kelly T. (1994) The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during simian virus 40 DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91:12520-12524.
- ◆ Coello P. y Vázquez-Ramos J. (1995) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasin activity during germination. *Eur. J. Biochem.*, 231: 99-103
- ◆ Colasanti J., Tyers M. y Sundaresan V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3377-3381
- ◆ Coverley D. y Laskey R. (1994) Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:745-76
- ◆ Cruz-García F., Zúñiga-Aguilar J. y Vázquez-Ramos J. (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plantarum*, 102: 573-581
- ◆ D'Urso G., Marraccino R., Marshak D. y Roberts J. (1990) Cell cycle control of DNA replication by a homolog from human cells of the p34^{cdc2} protein kinase. *Science*, 241: 1486-791
- ◆ Dahl M., Meskiene I., Bögre L., Ha D., Swoboda I., Hubmann R., Hirt H. y Heberle-Bors E. (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell*, 7:1847-1857
- ◆ Day I. y Reddy A. (1998) Isolation and characterization of two like-cyclins cDNAs from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 36:451-461
- ◆ De Veylder L., Engler J., Brussens S., Manevski A., Lescure B., Van Montagu M., Engler G. e Inzé D. (1999) A new D-type cyclin of *A. thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta*, 208:453-462
- ◆ De Veylder L., Segers G., Glab N., Casteels P., Van Montagu M. y Inzé D. (1997) The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.*, 412:446-452.

- ◆ Dehde S., Rohaly G., Schub O., Nasheuer P., Bohn W., Chemnitz J., Deppert W y Dornreiter I. (2001) Two immunologically distinct human DNA polymerase α -primase subpopulations are involved in cellular DNA replication. *Mol. Cell Biol.*, 21: 2581-2593
- ◆ Dulic V., Lees E. y Reed S. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, 257: 1958-1961
- ◆ Dutta A. y Stillman B. (1992) cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication. *EMBO J.*, 11: 2189-2199
- ◆ Dynlacht B., Moberg K., Lees J., Harlow E. y Zhu L. (1997) Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell Biol.*, 17:3867-3875.
- ◆ Foiani M., Lucchini G. y Plevani P. (1997) The DNA polymerase α -primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA damage response. *Trends Biochem. Sci.*, 22:424-427
- ◆ García E., Orjuela D., Camacho Y., Zúñiga J., Plasencia J. y Vázquez-Ramos J. (1997) Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.*, 33:445-455
- ◆ Gómez-Roig E. (1998). Activación de DNA polimerasas de maíz por BA durante la germinación. Tesis presentada para la obtención del grado de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- ◆ Grafi G. y Larkins B. (1995) Activity of single-stranded DNA endonucleases in mung bean is associated with cell division. *Plant Mol Biol.*, 29:703-10
- ◆ Grafi G., Burnett R., Helentjaris T., Larkins B., De Caprio J., Sellers W. y Kaelin W. (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8962-8967
- ◆ Gutiérrez C. (1998) The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1:492-497
- ◆ Helin K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8:28-35.
- ◆ Hemerly A., De Almeida J., Bergounioux C., Van Montagu M., Engler G., Inzé D y Ferreira P. (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.*, 14:3925-3936
- ◆ Herrera I., Sánchez M. P., Molina J., Plasencia J y Vázquez-Ramos J. (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plantarum*, 110:127-134
- ◆ Herrera I., Jiménez-García L. y Vázquez-Ramos J. (1999) Benzyladenine promotes early activation of p34cdc2-like kinase(s) during maize germination. *Seed Sci. Res.*, 9: 55-62
- ◆ Hisatake K, Hasegawa S, Takada R, Nakatani Y, Horikoshi M, Roeder RG (1993) The p250 subunit of native TATA box-binding factor TFIID is the cell-cycle regulatory protein CCG1. *Nature*, 362:179-181

- ◆ Horton L. y Templeton D. (1997) The cyclin box and C-terminus of cyclins A and E specify CDK activation and substrate specificity. *Oncogene*, 14: 491-498
- ◆ Hsieh W. y Wolniak S. (1998) Isolation and characterization of a functional A-type cyclin from maize. *Plant Mol. Biol.*, 37: 121-129
- ◆ Hua X., Yan H. y Newport J. (1997) A role for cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle. *J Cell Biol.*, 137:183-192
- ◆ Huntley R. y Murray J. (1999) The plant cell cycle. *Curr. Opin Plant Biol.*, 2:440-446
- ◆ Huntley R. y Murray J. (1999) The plant cell cycle. *Curr. Op. Plant Biol.*, 2:440-446
- ◆ Ishimi Y. (1997) J. B A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem.*, 272: 24508-24513
- ◆ King R., Deshaies R., Peters J-M. y Kischner M. (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, 274: 1652-1659
- ◆ Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D., Franza B. y Roberts J. (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 257: 1689-1694
- ◆ Koundrioukoff S., Jónsson Z., Hasan S., De Jong R., Van der Vliet P., Hottiger M. y Hübscher U, (2000) A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol Chem.*, 275: 22882-22887
- ◆ Lee M. y Nurse P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327: 31-35
- ◆ Lehner C. y O'Farrell P. (1990) Drosophila *cdc2* homologs: a functional homolog is coexpressed with a cognate variant. *EMBO J.*, 9: 3573-3581
- ◆ Lew D., Dulic V. y Reeds S. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell*, 66: 1197-1206
- ◆ Liang C. Weinreich M. y Stillman B. (1995) ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell.*, 81:667-676
- ◆ Liang C. y Stillman B. (1997) Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev.*, 11:3375-3386
- ◆ Lundberg A. y Weinberg R. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell Biol.*, 18: 753-761
- ◆ MacLachlan T., Sang N. y Giordano A. (1995) Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Critical Rev Eukaryotic Gene Expression*, 5:127-156
- ◆ Magyar Z., Bakó L., Bögre L., Dedeoglu D., Kapros T. Y Dudits D., (1993) Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone stimulated alfalfa cells. *Plant J.*, 4: 151-161

- ◆ Magyar Z., Mészáros T., Miskolczi P., Deák M., Fehér A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bakó L., Koncz C. y Dudits D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*, 9: 223-235
- ◆ Milarski K., Dunphy W., Russell P., Gould S. y Newport J. (1991) Cloning and characterization of *Xenopus cdc2*, a component of MPF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 56:377-84.
- ◆ Miller M. y Cross F. (2001) Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? *J Cell Sci.*, 114: 1811-1820
- ◆ Mimura S. y Takisawa H. (1998) *Xenopus Cdc45*-dependent loading of DNA polymerase α onto chromatin under the control of S-phase cdk. *EMBO J.*, 17: 5699-5707
- ◆ Mironov V., De Veylder L., Van Montagu M. e Inzé D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- The nexus. *Plant Cell*, 11: 509
- ◆ Morgan D. (1997) Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 261-291
- ◆ Mudryj M., Devoto S., Hiebert S., Hunter T., Pines J. y Nevins J. (1991) Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*, 65: 1243-1253
- ◆ Murante R., Rumbaugh J., Barnes C., Norton J. y Bambara R. (1996) Calf RTH-1 nuclease can remove the initiator RNAs of Okazaki fragments by endonuclease activity. *J. Biol. Chem.*, 271:25888-25897
- ◆ Nasheuer P., Moore A., Whal A. y Wong T. (1991) Cell-cycle dependent phosphorylation of human DNA polymerase α . *J. Biol. Chem.*, 266:7893-7903
- ◆ Nasmyth K. (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.*, 12: 405-412
- ◆ Nevins J., (1998) Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.*, 9: 585-593
- ◆ Nurse P. (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 79:547-550
- ◆ Ohtsubo M., Theodoras A., Shumacher J., Roberts J. y Pagano M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.*, 15: 2612-2624
- ◆ Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W. y Draetta G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.*, 11: 961-971
- ◆ Paris J., Le Guellec R., Couturier A., Le Guellec K., Omilli F., Camonis J., Mac Neill S. y Philippe M. (1991) Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA coding for a protein highly homologous to *cdc2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1039-1043
- ◆ Park H., Davis R. y Wang T. (1995) Studies on *S. pombe* DNA polymerase α at different stages of the cell cycle. *Nucl. Acid Res.* 23:4337-4344
- ◆ Pines J. y Hunter T. (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell-cycle dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.*, 115: 1-17

- ◆ Ramachandra M., Nakanos R., Mohan P., Rawitch A. y Padmanabhan R. (1993) Adenovirus DNA polymerase is a phosphoprotein. *J. Biol. Chem.*, 268: 442-448
- ◆ Raven P., Evert R. y Eichhorn S., (1992) *Biology of Plants*, 5^{ed}, Worth Publishers, N.Y., pp 545-562
- ◆ Reed S., Hadwiger J. y Lorincz A. (1985) Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4055-4059
- ◆ Reichsteiner M. y Rogers S. (1996) The PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, 21: 267-271
- ◆ Renaudin J., Colassanti J., Rime H., Yuang Z. y Sundaresan V. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7375
- ◆ Renaudin J., Doonan J., Freeman D., Hashimoto J., Hirt H., Inzé D., Jacobs T., Kouchi H., Rouzé P., Sauter M., Saviouré A., Sorrell D., Sundaresan V. y Murray J. (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.*, 32: 1003-1018
- ◆ Reyes-Jiménez J., Jiménez-García L., González M. y Vázquez-Ramos J. (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci. Res.*, 1:113-117
- ◆ Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquard A. y Murray J. (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science*, 283: 1541-1544
- ◆ Sánchez de Jiménez E. y Aguilar R. (1984) Protein synthesis patterns: relevance of old and new mRNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.*, 75: 231-245
- ◆ Sánchez de Jiménez E., Aguilar R. y López S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 99: 445
- ◆ Sánchez M-P., Torres A., Boniotti B., Gutiérrez J. (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.*, 50:165-167
- ◆ Schub O., Rohaly G., Smith R., Schneider A., Dehde S., Dornreiter I. y Nasheuer P. (2001) Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase α -primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem.*, 276: 38076-38083
- ◆ Setiady Y., Sekine M., Hariguchi N., Kouchi H. y Shinmyo A. (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA clone that encodes a Cdc2 homolog from *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* 37:369-376
- ◆ Sherr C. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73: 1059-1065
- ◆ Sherr C. y Roberts J. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 13: 1501-1512
- ◆ Sherr C., (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79: 551-555
- ◆ Simanis V. y Nurse P. (1986) The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell*, 45: 261-268

- ◆ Simon E. (1984) Early events in germination in seed Physiology V; cap II Germination and reserve mobilization. David R. Murray, Academic Press, Australia.
- ◆ Sobczak-Thepot J., Harper F., Florentin Y., Zindy F., Brechot C. y Puvion E. (1993) Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp Cell Res.*, 206:43-48
- ◆ Spiegel S., Marcus A. y Brooker J. (1975) Preformed mRNA and the programming of early embryo development. *Adv. Exp. Med Biol.*, 62:1-19
- ◆ Stern B. y Nurse P. (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.*, 12: 345-350
- ◆ Tanaka T. y Nasmyth K. (1998) Association of RPA with chromosomal replication origins requires an Mcm protein, and is regulated by Rad53, and cyclin- and Dbf4-dependent kinases. *EMBO J.*, 17: 5182-5191
- ◆ Tanaka T., Knapp D. y Nasmyth K. (1997) Loading on an MCM protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell*, 90:649-660
- ◆ Taya Y. (1997) RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 14-17
- ◆ Tsurimoto T. y Stillman B. (1991) Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J. Biol. Chem.*, 266: 1950-1960
- ◆ Umeda M., Umedahara C., Yamaguchi M., Hashimoto J. y Uchimiya H. (1999) Differential expression of genes for cyclin dependent protein kinase in rice plants. *Plant Physiol.*, 119:31-40
- ◆ Vázquez-Ramos J. y Reyes-Jiménez J. (1990) Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination of maize axes. *Can. J. Bot.*, 68: 2590-2594
- ◆ Verde F., Dogterom M., Stelzer E., Karsenti E. y Leibler S. (1992) Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.*, 118: 1097-1108
- ◆ Voitenleitner C., Fanning E. y Nasheuer H. (1997) Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene*, 14: 1611-1615
- ◆ Voitenleitner C., Rehfuss C., Hilmes M., O'Rear L., Liao P-C., Gage D., Ott R., Nasheuer P. y Fanning E. (1999) Cell cycle-dependent regulation of human DNA polymerase alpha-primase activity by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, 19: 646-656
- ◆ Waga S. y Stillman B. (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:721-751
- ◆ Wang H., Fowke L. y Crosby W. (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*, 386: 451-452
- ◆ Wang T. (1996) Cellular DNA polymerases pp 461-493, en "DNA replication in eukaryotic cells", ed. De Pamphilis, Cold Spring Harbor Laboratory Press

- ◆ Whal A , Geis A , Spain B., Wong S., Korn D. y Wang T. (1988) Gene expression of human DNA polymerase α during cell proliferation and the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, 8:5016-5025
- ◆ Xie Q., Suárez-López P. y Gutiérrez C (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J* 15: 4900-4908
- ◆ Yokoyama M., Kunihiro N. y Hiroshi S , (1981) BA-enhanced cell proliferation and suppressed greening in attached young bean leaves. *Plant Cell Physiol.*, 22: 623-627
- ◆ Yokoyama M., Naito K. y Susuki H. (1980) Effect of BA on chlorophyll, DNA, RNA and protein content on attached young bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves *Ann. of Botany*, 45: 649-653
- ◆ Yuzhakov A. Kelman Z. Hurwitz J. y O'Donnell M. (1999) Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *EMBO J.*, 18:6189-6199.
- ◆ Zaráin M., Bernal-Lugo I. y Vázquez-Ramos J. (1987) Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes *Mut. Res.* , 181: 103-110
- ◆ Zindy F., Lamas F., Chenivesse X., Sobczak J., Wang J., Fesquet D., Henglein B. y Brechot C. (1992) Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182: 1144-1154
- ◆ Zlatanova J., Ivanov P. Stoilov L., Chimshirova K. y Stachev B. (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize *Plant. Mol. Biol.* 10:139-144

APENDICE: SOLUCIONES

-Solución amortiguadora de imbibición

Tris-HCl pH 7.4	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
sacarosa	2%

-Solución amortiguadora de homogenado

Tris-HCl pH 7.4	70 mM
MgCl ₂	1 mM
KCl	25 mM
sacarosa	0.25 mM
EDTA	5 mM
2-mercaptoetanol	15 mM
tritón X-100	0.1%

Por cada 50 mL se adiciona una tableta de inhibidores de proteasas Complete^R (Boehringer Mannheim)

Para ensayos de cinasa al amortiguador anterior se le adicionan:

NaF	50 mM
Na ₂ VO ₃	1 mM
β-glicerolfosfato	80 μM

-Soluciones amortiguadoras empleadas en la purificación de las DNA polimerasas:

1) Solución amortiguadora A (DEAE)

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7	40 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
glicerol	20%
2-mercaptoetanol	1 mM

2) Solución amortiguadora B (DEAE)

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7	400 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
glicerol	20%
2-mercaptoetanol	1 mM

3) Solución amortiguadora C (Heparina)

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 7.4	40 mM
NaCl	150 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
glicerol	20%
2-mercaptoetanol	1 mM

4) Solución amortiguadora D (Heparina)		
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 7.4		40 mM
NaCl		150 mM
Na ₂ EDTA		1 mM
glicerol		20%
2-mercaptoetanol		1 mM
- Solución de benciladenina		
6-bencilaminopurina (Sigma)		1 mM
NaOH		4 mM
- Solución amortiguadora de homogenado para prueba de incorporación de ³ H-timidina		
NaCl		150 mM
Na ₂ EDTA		10 mM
SDS		0.5%
- Solución A (para proteína A-agarosa)		
Tris-HCl pH 7.4		10 mM
NaCl		50 mM
EDTA		1 mM
Azida de sodio		0.02%
Por cada 50 mL se adiciona una tableta de inhibidores de proteasas Complete ^R (Boehringer Mannheim)		
- Solución de acoplamiento para la resina CNBr-sepharose (Amersham)		
NaHCO ₃		200 mM
NaCl		500 mM
- Solución para resuspender la resina acoplada		
Tris-HCl pH 7.4		50 mM
NaCl		250 mM
Na ₂ EDTA		5 mM
EGTA		5 mM
NaF		5 mM
tritón X-100		0.1%
Por cada 50 mL se adiciona una tableta de inhibidores de proteasas Complete ^R (Boehringer Mannheim)		
- Solución TSA		
Tris-HCl pH 7.4		10 mM
NaCl		140 mM
Tritón X-100		0.025%
Azida de sodio		0.025%

-Solución amortiguadora para ensayo de cinasa	
Tris-HCl	70 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	150 mM
EGTA	5 mM
2-mercaptoetanol	5 mM
β-glicerolfosfato	60 mM
NaF	25 mM
Na ₂ VO ₃	1 mM

-Solución complementaria para el ensayo de cinasa	
ATP	20 μM
γ ³² ATP	5 μCi
Sustrato a emplear histona H1	40 μg
DNA polimerasas 1 ó 2	c.b.p. 40 μL

En el caso de los ensayos en frío, la concentración de ATP fue aumentada a 25 μM y la cantidad de sustrato también aumento para cubrir el volumen final planteado.

-Solución amortiguadora para activación de DNA de alto peso molecular	
Tris-HCl pH 7.4	10 mM
MgCl ₂	50 mM
BSA	0.5 mg/mL
DNA de timo de ternera	0.5 mg/mL

-Solución amortiguadora para ensayo de actividad de DNA polimerasa	
Tri-HCl pH 7.4	50 mM
KCl	15 mM
MgCl ₂	8 mM
dATP	0.1 mM
dGTP	0.1 mM
dCTP	0.1 mM
glicerol	5%
2-mercaptoetanol	0.4 mM
ATP	1 mM
DNA activado	100 μg/mL
(metil- ³ H)-timidina 5'-trifosfato	5 μCi/mL

-Líquido de centelleo	
2,2'-p-fenil-bis-[5-feniloxazol] (POPOP, Merck)	0.1 g
2,5-difeniloxazol (PPO, Merck)	5 g
tolueno c.b.p	1 L

-Soluciones para geles de poliacrilamida

1) Solución de acrilamida al 30%	
acrilamida	4.11 M
metilen-bis-acrilamida	52 mM
2) Solución amortiguadora de separación (2X)	
Tris-HCl pH 8.8	1.95 M
SDS	14 mM
3) Solución amortiguadora de apilamiento (2X)	
Tris-HCl pH 6.8	650 mM
SDS	14 mM

Los geles se manejaron en porcentajes diversos dependiendo del peso molecular de las proteínas que se quería separar.

-Solución amortiguadora de carga

Tris-HCl pH 6.8	100 mM
SDS	4%
glicerol	20%
2-mercaptoetanol	200 mM
azul de bromofenol	0.2%

-Solución amortiguadora de electrodos (10X)

Tris-HCl pH 8.3	250 mM
glicina	1.9 M
SDS	1%

-Solución para transferencia

Tris-HCl pH 8.3	95 mM
metanol	20%
glicina	192 mM

-Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

NaCl	1.37 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM

-Solución para lavado de membranas

SDS	2%
EDTA	160 μ M
NaCl	500 mM
PBS	1x